

**Plenary sessions
and oral presentations**

*Sesje plenarne
i sesja doniesień ustnych*

Session 1

Combinational treatment of hepatocellular carcinoma in the era of targeted therapies

Skojarzone leczenie raka wątrobowokomórkowego w dobie leków ukierunkowanych molekularnie

[4]

Morphological and molecular background of hepatocellular carcinoma

Morfologiczno-molekularne podłoże rozwoju raka wątrobowokomórkowego

Anna Nasierowska-Guttmejer

Zakład Patomorfologii, Centralny Szpital Kliniczny MSWiA w Warszawie

Hepatocellular carcinoma (HCC) constitutes 80% of the primary neoplasms of the liver. HCC is the third cause of cancer-related deaths worldwide with about 600 000 patients dying from the disease annually. HCC develops on the background of the chronic inflammation and cirrhosis. Risk factors vary among geographical region. The majority of cases with HBV and HCV hepatitis develop in the countries with a high incidence of HCC. In regions with a low incidence of HCC (in developed countries), besides HCV hepatitis, alcoholic disease and non-alcoholic fatty liver disease are the prevalent causes. Both the epidemiological and molecular analysis showed that HBV hepatitis is a risk factor of carcinogenesis. Active viral replication in hepatocytes represented by hepatitis Be antigen in the serum is associated with an increase in risk to develop HCC. In contrast, hepatitis C virus is not integrated with DNA of the hepatocyte. Patients with HCV infection with HBV and HIV, daily consumption of alcohol (> 50 g alcohol per day), diabetes, obesity and age over 60 can progress to HCC. These risk factors lead to chronic inflammation and stimulation of apoptosis and increase cellular proliferation and hyperregeneration to response to cytokine stimulation. Finally, fibrosis and cirrhosis develop particularly by the synthesis of the extracellular matrix components from hepatic stellate cells. In this carcinogenesis the hyperplastic and dysplastic nodules are the preneoplastic conditions. The accumulation of genetic and epigenetic alterations leads to an activation of oncogenes and inhibition of tumor suppressor genes. The main promoters of hepatocarcinogenesis are cell proliferation and neo-angiogenesis. There are known several signaling pathways as MAPK, mTOR, Wnt/ β -catenin and several members of EGF family important for HCC cell proliferation and angiogenesis. Epidermal growth factor receptor (EGFR) is frequently expressed in HCC and its overexpression has shown to be an independent negative factor for early tumor progression and metastasis. These approaches and knowledge of hepatocarcinogenesis lead to an individualized anticancer therapy in advanced HCC cases.

Rak wątrobowokomórkowy stanowi 80% nowotworów pierwotnych wątroby. Jest on trzecią przyczyną zgonów na nowotwory złośliwe na świecie, co stanowi ok. 600 000 zgonów rocznie. W 70–90% przypadków rak wątrobowokomórkowy rozwija się na podłożu przewlekłego zapalenia lub marskości wątroby. Czynniki ryzyka zmieniają się w zależności od regionów geograficznych. W krajach o dużym ryzyku zachorowania główną przyczyną rozwoju raka jest zakażenie wirusem zapalenia wątroby typu B (HBV) i C (HCV), które dotyczą 2/3 chorych. W krajach o niskim ryzyku zachorowania czynnikami ryzyka poza zakażeniem HCV są choroba alkoholowa i niealkoholowe stłuszczenie wątroby. Badania epidemiologiczne i molekularne wskazały, że zakażenie wirusem B jest czynnikiem kancerogennym. HBV-DNA znajduje się w genomie hepatocytów zmienionych nowotworowo. Poza tym nasilenie replikacji wirusa zwiększa zagrożenie wystąpienia raka. Z kolei badania genetyczne nie potwierdziły integracji materiału genetycznego wirusa C z DNA hepatocytu. Zagrożenie rozwojem raka wątrobowokomórkowego u chorych z HCV wzrasta wraz ze współistnieniem zakażenia HBV, HIV, nadużywaniem alkoholu, cukrzycą, otyłością i wiekiem powyżej 60. roku życia. Powyższe czynniki ryzyka prowadzą do uszkodzenia hepatocytu, co z kolei powoduje kompensacyjną proliferację komórek wraz z regeneracją w odpowiedzi na stymulację cytokinami. W efekcie włóknienie i marskość rozwijają się w wyniku syntezy zewnątrzkomórkowej substancji z macierzystych komórek wątroby. Hiperplastyczne i regeneracyjne guzki wątroby są prekursorami w karcinogenezie raka wątroby. Akumulacja genetycznych i epigenetycznych zaburzeń prowadzi do aktywacji onkogenów i hamowania genów supresorowych. Głównymi promotorami hepatokarcinogenezy są proliferacja komórek i neoangiogeneza. Opisano różne szlaki sygnałowe, takie jak MAPK, mTOR, Wnt/ β -katenina oraz rodzinę naskórkowego czynnika wzrostu (EGF) odgrywające kluczową rolę w proliferacji raka wątrobowokomórkowego. Receptor naskórkowego czynnika wzrostu (*epidermal growth factor receptor* – EGFR) często jest wykrywany w komórkach raka, a jego nadekspresja jest związana ze złym rokowaniem, szybkim powstawaniem wznów i odległych przerzutów. Lepsze poznanie hepatokarcinogenezy budzi nadzieję na możliwości stosowania terapii celowanej i indywidualizacji w leczeniu zaawansowanego raka wątrobowo komórkowego.

[5]

Multi-disciplinary approach in hepatocellular carcinoma treatment

Interdyscyplinarne podejście do leczenia raka wątrobowokomórkowego

Piotr Małkowski¹, Dariusz Wasiak¹, Maciej Kosieradzki²

¹Department of Surgical and Transplantation Nursing, Medical University of Warsaw

²Department of General and Transplantation Surgery, Medical University of Warsaw

Hepatocellular carcinoma is the 3rd most frequent cancer worldwide and its mortality continually grows. It devel-

ops most often on the basis of chronic liver pathology, especially viral hepatitis and cirrhosis. Screening of groups at risk allows early diagnosis and decrease mortality. Majority of patients come from hepatology and surgery departments, where they are treated for viral hepatitis, liver insufficiency or complications of portal hypertension. Today finding of a characteristic augmentation of the lesion in an arterial phase and subsequent wash out of a contrast media in following phases of dynamic visual studies justifies diagnosis of HCC. Biopsy in such cases is unnecessary, it is performed however in dubious cases and tumors smaller than 2 cm. High competence of both radiologist and pathologist assessing focal lesion of cirrhotic liver is mandatory.

Unlike other neoplasms, symptoms in HCC patients are mostly from the primary disease which is cirrhosis with whole spectrum of its clinical consequences, particularly liver insufficiency. Hence, HCC classification must contain not only parameters of the tumor, but the stage of liver disease and general condition of a patient as well. Classification accepted by AASLSD (American Association for the Study of the Liver Diseases) and EASL (European Association for the Study of the Liver) is the one proposed by a hepatological center in Barcelona (BCLC). It addresses all aforementioned factors and discriminates between the patients who – considering tumor progression and liver function – qualify for liver resection, transplantation or other therapeutic options. Moreover, it allows for comparison of treatment results in various groups of patients, facilitating prognosis in each subgroup (of stage) and according to adopted treatment method.

Early stages of cancer in patients with preserved liver function are surgeons and transplantologists field of expertise. After meticulous assessment they perform liver resections, tumor thermoablations and/or liver transplantation. In more advanced stages radiologists perform chemoembolizations. In non-operable tumors with invasion of the portal vein and distant metastases chemo- and hormone therapy was shown to have no significant effect on patients' survival. Today, the only method significantly prolonging survival in patients with advanced-stage HCC is molecular therapy with sorafenib.

Conclusion: Patients with HCC require multi-disciplinary approach in both diagnosis, qualification for therapy and treatment itself. Treatment ought to be carried out in multi-disciplinary reference departments of surgery and transplantation of the liver.

Rak wątrobowokomórkowy (*hepatocellular carcinoma* – HCC) jest 3. co do częstości występowania nowotworem w świecie, którego śmiertelność stale rośnie. Najczęściej powstaje w przebiegu przewlekłych patologii wątroby, szczególnie wirusowego zapalenia wątroby (WZW) i marskości. Badania przesiewowe wykonywane w grupach ryzyka umożliwiają wczesne wykrycie raka oraz wpływają na zmniejszenie śmiertelności w jego przebiegu. Przeważająca większość chorych rekrutuje się z oddziałów hepatologicznych i chirurgicznych, do których trafiają z objawami WZW, niewydolności wątroby lub z powikłaniami nadciśnienia wrotnego. Obecnie stwierdzenie w wielofazowych dynamicznych badaniach obrazowych charakterystycznego wysycenia zmiany w fazie tętnicznej z następczym wypłukaniem środka cieniującego w fazach późniejszych pozwala na rozpoznanie

HCC. Biopsja w tych przypadkach jest zbędna. Wykonuje się ją w guzkach mniejszych niż 2 cm oraz w przypadkach wątpliwych. Podkreślenia wymaga konieczność wysokich kompetencji zarówno radiologów, jak i patomorfologów oceniających zmiany ogniskowej marskich wątroby.

W odróżnieniu od pacjentów z innymi nowotworami u chorych na HCC dominują objawy choroby zasadniczej, jaką jest marskość ze wszystkimi klinicznymi jej konsekwencjami, a przede wszystkim niewydolnością wątroby. Dlatego też klasyfikacja HCC musi uwzględniać nie tylko parametry samego guza, lecz także stopień zaawansowania marskości oraz stan ogólny chorego. Klasyfikacja, zaakceptowana przez AASLS (*American Association for the Study of the Liver Diseases*) oraz EASL (*European Association for the Study of the Liver*) jest klasyfikacją ośrodka hepatologicznego w Barcelonie (BCLC). Biorąca pod uwagę wszystkie wspomniane czynniki pozwala na wyselekcjonowanie chorych, którzy spełniają, pod względem zaawansowania guza oraz wydolności wątroby, kryteria pozwalające na zakwalifikowanie do resekcji, transplantacji wątroby czy też innych metod terapeutycznych. Pozwala ponadto na porównywanie wyników leczenia w poszczególnych grupach chorych, umożliwiając tym samym prognozowanie rokowania, w zależności od podgrupy (stopnia zaawansowania) oraz wdrożonego leczenia.

Wczesne postaci raka u chorych z wydolną funkcją wątroby są domeną: chirurgów i transplantologów, którzy po dokładnej kwalifikacji chorych wykonują resekcje wątroby, termoablacje guza lub przeszczepienie, oraz radiologów, którzy w bardziej zaawansowanych zmianach przeprowadzają jego chemoembolizację. Udowodniono, że w guzach nieoperacyjnych, naciekających żyłę wrotną, z odległymi przerzutami stosowanie chemo- i hormonoterapii nie ma znamiennego wpływu na przeżycie chorych. Obecnie jedynym leczeniem znamienne przedłużającym życie chorym z zaawansowanymi postaciami HCC jest terapia molekularna z zastosowaniem sorafenibu.

Wniosek: Chorzy na HCC na etapie diagnostyki, kwalifikacji do leczenia i samej terapii wymagają wielodyscyplinarnego podejścia. Leczenie chorych powinno się odbywać wielodyscyplinarnego referencyjnych na oddziałach chirurgii wielodyscyplinarnego transplantacji wątroby.

[6]

Sorafenib in the treatment of hepatocellular carcinoma – gold standard or medical experiment?

Sorafenib w leczeniu raka wątrobowokomórkowego – złoty standard czy eksperyment medyczny?

Andrzej Deptała

Zakład Profilaktyki Onkologicznej Wydziału Nauki o Zdrowiu,
Warszawski Uniwersytet Medyczny
Klinika Onkologii i Hematologii Centralnego Szpitala
Klinicznego MSWiA w Warszawie

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the third cause of death due to cancer worldwide. Despite decades of efforts by many

investigators, until recently there was no effective treatment for patients suffering from advanced HCC. Progress in the therapy of advanced/metastatic HCC has come with the clinical development of sorafenib – a multikinase inhibitor of proliferation and angiogenesis. Multicenter, prospective, placebo-controlled phase III trial SHARP (Sorafenib HCC Assessment Randomized Protocol Trial) was designed to evaluate the efficacy and safety of sorafenib administration in advanced/metastatic HCC. Final analysis of SHARP trial has shown that sorafenib improved overall survival (OS) of patients in comparison with placebo (median OS 10.7 vs. 7.9 months, HR = 0.69, $p < 0.001$). Median time to progression (TTP) was longer and disease control rate (DCR) was also higher in sorafenib arm (TTP 5.5 vs. 2.8 months, $p < 0.001$ and DCR 43% vs. 32%, $p = 0.002$, respectively). The total incidence of serious adverse events was similar in both arms (52% vs. 54%), however in sorafenib group the following G3/G4 adverse episodes were significantly more frequent: weight loss (2% vs. 0%), diarrhea (8% vs. 2%), and hand-foot skin reaction (8% vs. 1%). Comparable results concerning survival benefits due to sorafenib administration were demonstrated in the second phase III trial, i.e. Asia-Pacific (OS 6.5 vs. 4.2 months, HR = 0.68, $p = 0.014$; TTP 2.8 vs. 1.4 months, HR = 0.57, $p < 0.001$). The rate and the seriousness of adverse events did not differ from those noticed in the SHARP trial. Sorafenib has become a new standard for the treatment of advanced/metastatic HCC, and has served as a reference regimen for future clinical trials.

Rak wątrobowokomórkowy (*hepatocellular carcinoma* – HCC) jest trzecią pod względem częstości przyczyną zgonów na nowotwory złośliwe na świecie. Pomimo wysiłków wielu badaczy do niedawna nie istniało skuteczne leczenie zaawansowanych przypadków HCC. Postęp w terapii tego raka dokonał się z chwilą wprowadzenia do klinicznego stosowania sorafenibu – wielokinazowego inhibitora proliferacji i angiogenezy. Wieloośrodkowe, prospektywne, z randomizacją względem placebo badanie SHARP (Sorafenib HCC Assessment Randomized Protocol Trial) miało na celu zbadanie skuteczności i bezpieczeństwa stosowania sorafenibu u chorych na zaawansowanego/przerzutowego HCC. Po przeanalizowaniu wyników badania SHARP okazało się, że sorafenib w porównaniu z placebo wydłuża statystycznie znamienne przeżycie całkowite (OS) chorych na HCC (mediana OS odpowiednio 10,7 vs. 7,9 miesiąca, wskaźnik ryzyka = 0,69, $p < 0,001$). Czas przeżycia do progresji (TTP) oraz wskaźnik kontroli choroby (DCR) wypadły również na korzyść sorafenibu (TTP 5,5 vs 2,8 miesiąca, $p < 0,001$ oraz DCR 43% vs 32%, $p = 0,002$). Ogólna częstość występowania poważnych objawów niepożądanych w obu ramionach była podobna (52 vs 54%), jednakże, w grupie leczonej sorafenibem znamienne częściej występowały następujące zdarzenia niepożądane w stopniu G3/G4: utrata wagi ciała (2 vs 0%), biegunka (8 vs 2%) i skórna reakcja ręka-stopa (8 vs < 1%). Porównywalne wyniki w zakresie przeżyć uzyskano w drugim badaniu III fazy, tzw. badaniu Asia-Pacific, w którym zastosowanie sorafenibu poskutkowało statystycznie znamienym wydłużeniem OS w stosunku do placebo (6,5 vs 4,2 miesiąca, wskaźnik ryzyka = 0,68, $p = 0,014$) oraz istotnym wydłużeniem TTP (2,8 vs 1,4 miesiąca, wskaźnik ryzyka = 0,57, $p < 0,001$). Częstość występowania i rodzaj

poważnych objawów niepożądanych nie różniły się istotnie od tych, które obserwowano w badaniu SHARP. Sorafenib stał się nowym standardem w leczeniu zaawansowanego/przerzutowego HCC oraz lekiem referencyjnym przy konstruowaniu przyszłych badań klinicznych.

[7]

What beyond sorafenib – other targeted therapies, classical chemotherapy or symptomatic treatment?

Co oprócz sorafenibu? Nowe leki celowane, klasyczna chemioterapia, a może leczenie objawowe?

Marek Z. Wojtukiewicz

Klinika Onkologii Uniwersytet Medyczny w Białymstoku
Białostockie Centrum Onkologii

Leczenie chorych na zaawansowanego raka wątrobowokomórkowego (*hepatocellular carcinoma* – HCC) napotyka na wiele trudności. Wynika to częściowo z faktu, że nowotwory złośliwe wątroby są z reguły dobrze zróżnicowane i pierwotnie odporne na cytostatyki. Z drugiej strony duża część tych nowotworów rozwija się u chorych na marskość wątroby, której dysfunkcja zmienia homeostazę ustroju do tego stopnia, że dostępne dane farmakokinetyczne i farmakodynamiczne, dotyczące powszechnie znanych leków ukierunkowanych na cele molekularne i cytostatyków, są nieadekwatne. Jedną z metod leczenia chorych na HCC jest stosowanie sorafenibu, który – mimo iż blokuje wiele kinaz zaangażowanych w przeżycie komórki – nie wyczerpuje wszystkich możliwości interferowania z wieloma istotnymi szlakami enzymatycznymi, które nadal pozostają aktywne w komórkach nowotworowych. Obecnie, w fazie badań klinicznych znajdują się nie tylko leki blokujące funkcję receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR) – gefitinib, lapatinib, ale również cząsteczki blokujące inne układy receptorowe i enzymatyczne: receptor czynnika wzrostu śródbłonna naczyń (vascular endothelial growth factor receptor – VEGFR), receptor insulinopodobnego czynnika wzrostu (*insulin-like growth factor receptor* – IGF1R), COX-2, inhibitory deacylazy histonów i inhibitory proteasomu 26S. W kręgu zainteresowań badaczy znajduje się również możliwość genoterapii polegającej na ograniczeniu syntezy mRNA dla EGFR za pomocą cząsteczek interferującego RNA (iRNA). Alternatywną metodą leczenia nadal pozostaje klasyczna chemioterapia z udziałem dokso-rubicyny, oksaliplatyny i gemcytabiny. Decyzja dotycząca wyboru metody leczenia zawsze jednak powinna opierać się na dokładnej ocenie funkcji poszczególnych narządów, a zwłaszcza wątroby. Z powodu chorób współistniejących u części chorych na HCC możliwe jest bowiem jedynie leczenie objawowe.

Session 2

Molecular biology, diagnostics and cancer therapy***Biologia molekularna, diagnostyka i cele terapii nowotworów***

[8]

The Cancer Genome Atlas*Atlas Genomu Nowotworów***Maciej Wiznerowicz**

Gene Therapy Laboratory, Department of Cancer Diagnostics and Immunology at Greater Poland Cancer Centre and Department of Cancer Immunology, Chair of Medical Biotechnology, Poznan University School of Medical Sciences

The Cancer Genome Atlas (TCGA) project is a comprehensive and coordinated effort to accelerate our understanding of the molecular basis of cancer through the application of genome analysis technologies. The National Cancer Institute (NCI) and the National Human Genome Research Institute (NHGRI) launched TCGA as a 3-year pilot project in 2006, and have since beginning of 2010 initiated the second phase of the project to study at least 20 additional cancers over 5 years. This project aims to systematically explore the entire spectrum of genomic changes involved in human cancer. Specifically, the project is designed to comprehensively analyze DNA copy number changes, including large and small scale rearrangements, transcription profiles, epigenetic modifications, sequence variation, and sequence in both tumor tissue and case-matched germline DNA. The suite of analysis platforms will be applied to a common set of molecular analytes obtained from clinically annotated high-quality tumor biospecimens and case-matched normal tissue. The results of the molecular profiling will be correlated with patients' outcomes for identification of novel predictive biomarkers for current and future personalised therapies. In a long term perspective the TCGA's integrated database of molecular and clinical annotation will provide scientists with accelerated access to discovery with the end goal being better diagnostics, therapies, and preventive measures for cancer.

In May 2010 The Greater Poland Cancer Center (GPCC) become a part of TCGA network. Through the integrated effort of surgeons and pathologist a prospective collection of tumor samples from breast, stomach, colon, head&neck cancers and melanoma has been initiated. Up to the date over 200 high-quality tumor samples and matching normal tissue have been collected along with pathology and clinical annotations. Over 100 samples have been already sent to TCGA's centers and are currently being subjected to molecular profiling and bioinformatic analysis. Future efforts will include comprehensive proteomic analysis that will be performed in collaboration with the Belfer Institute for Applied Cancer Science at Dana Farber Cancer Institute/Harvard Medical School in Boston. System biology tools will be used to integrate genomic data obtained from TCGA

with the proteomic analysis to understand causalities in between changes in DNA, transcriptome and signal transduction pathways as well as identify novel drug targets and predictive biomarkers thus paving the way for novel personalised therapies for cancer.

[9]

Identification of new oncogenes and tumor suppressor genes associated with laryngeal squamous cell carcinoma by molecular biology

Identyfikacja nowych onkogenów i genów supresji nowotworowej związanych z płaskonabłonkowym rakiem krtani przy użyciu technik biologii molekularnej

Krzysztof Szyfter^{1,2}, Małgorzat Jarmuż¹, Maciej Giefig^{1,3}, J. Richter³, Magdalena Kostrzewska-Poczekaj¹, D. Brauze¹, N. Zemke¹, Kinga Pelińska¹, Reiner Siebert^{1,3}, Reidar Grenman⁴

¹Institut Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu

²Klinika Otolaryngologii, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

³Institut Genetyki Medycznej, Uniwersytet Chrystiana-Albrechta w Kilonii, Niemcy

⁴Katedra Otolaryngologii, Uniwersytet w Turku, Finlandia

The title question remains has become an attractive field of studies resulted from establishing of specificity of association between a given type and a panel of oncogenes and tumor suppressor genes (TSGs) A participation of an oncogene or TSG in progression of a specific tumor type could open a possibility to work up a new strategy of targeted therapy. The methods required to scan the whole genome were recently established.

The study was targeted on identification of new genes having oncogenic or suppressor activity not reported yet in laryngeal cancer. The study material were cell lines established from laryngeal cancer and primary laryngeal tumors. Scanning of the whole genome done by Agilent DNA platforms indicated regions with DNA gains and losses. For detailed analysis chromosome regions 11q13 (frequent amplification) and 19p13.3 (deletion) were selected. A heterogeneity of changes within 11q13 was shown and the minimal common amplified region was found to span ca. 1.8 Mbp localized on 11q13.3 band. Expression of genes coded in there was estimated by microarray and quantitative real time PCR. *CTTN* and *FADD/PPFIA1* genes were found to act as oncogene-candidates in laryngeal squamous cell carcinoma. While, in the group of 15 genes coded in 19p13.3, *GNG7* gene fulfilled the criteria of tumor suppressor gene at least in a part of laryngeal tumors.

Zagadnienie tytułowe stało się atrakcyjnym tematem badań w wyniku odkrycia, że panel onkogenów i genów supresorowych stanowi specyfikę danego nowotworu. Ponadto powiązanie konkretnego genu z określonym nowotworem kreuje możliwości opracowania nowych strategii

terapii celowanej. Pojawiły się również techniczne możliwości opierające się na skanowaniu całego genomu przy wykorzystaniu platform DNA.

Przedmiotem badań jest poszukiwanie genów wykazujących właściwości onkogenne lub supresorowe niezwiązane dotąd z przebiegiem płaskonabłonkowych raków krtani. Analizę prowadzono na ustabilizowanych liniach komórkowych wyprowadzonych z guzów krtani, a następnie na pierwotnym materiale klinicznym. Skanowanie całego genomu na pomocą platform Agilent DNA wskazało na obecność regionów wykazujących przyrost lub utratę materiału genetycznego. Do dalszych badań wybrano region chromosomowy 11q13 (częsta amplifikacja) oraz deletowany region 19p13.3. Region 11q13 wykazywał heterogenność zmian zawartości genowej, a najmniejszy wspólnie amplifikowany region obejmował ok. 1,8 megapazasad zlokalizowanych w prążku 11q13.3. Dla genów występujących w tych regionach oceniono ich ekspresję za pomocą mikromacierzy oraz PCR w czasie rzeczywistym. Geny *CTTN* i *FADD/PPFIA1* zostały określone jako potencjalne onkogeny w raku krtani. Natomiast z 15 genów kodowanych w deletowanym regionie 19p13.3 gen *GNG7* spełniał kryteria genokandydata supresji nowotworu w części nowotworów krtani.

[10]

Tumor cells of laryngeal carcinoma show expression and functional features of various Toll-like-receptors

Komórki raka krtani wykazują ekspresję oraz cechy funkcjonalne różnych wzorców molekularnych receptorów Toll-podobnych

Jan Sikora, Mariusz Kaczmarek, Magdalena Frydrychowicz, Bartosz Brzezicha, Mirosław Szczepański, Theresa Whiteside, Jan Żeromski

Department Clinical Immunology, University Medical Sciences, Poznań, Poland and Pittsburgh Cancer Institute, USA

Detected in the last decade of XX century Toll-like receptors (TLRs) soon became the subject of several investigators worldwide, as an important novel arm of innate immunity.

They have been shown to play crucial role in the recognition of unicellular pathogens such as viruses, bacteria, fungi and protozoa and mounting against them protective immune response. TLRs create link between innate and adaptive immunity. TLRs are abundant on cells of the immune system but have been also demonstrated on cells of other origin such as various epithelia, endothelia and other. We were able to show the expression of three TLRs (TLR2, 3 and 4) on tumor cells of human laryngeal carcinoma by means of immunohistochemistry (IHC), using tissue sections of surgical specimens.

In the current study we wished to search presence of TLR1-10 on protein and molecular level in larynx carcinoma cell lines and the impact of respective TLR ligands on TLR expression in the cells mentioned. Six established larynx

carcinoma cell lines from PCI bank have been used. Cell cytopins were subjected to ABC immunocytochemistry (ICC) with anti-TLR antibodies. RNA isolated from the cells was tested by RT-PCR reaction using respective TLR1-10 primers. Cells were cultured for 24 hrs in the presence of respective TLR ligands. Following culture cells were harvested and subjected to flow cytometry both, on intact and permeabilized cells, using fluorochrome labelled anti TLR1-10 monoclonal antibodies (Moabs). The cells were evaluated for mean fluorescence intensity (MFI) of membrane and cytoplasmic cell staining.

TLR reactivity in ICC varied in individual cell lines and the percent of positive cells ranged from 10 to 100. RT-PCR allowed to show mRNA for all TLRs tested in six cell lines studied. After short-term cell culture each cell line exhibited distinct pattern of expression of individual TLRs following interaction with respective ligand. Unexpectedly, cell culture with ligand resulted in the decrease of TLR expression in some cell lines. Cytoplasmic TLR staining had usually higher MFI value than membrane one, but after culture with ligand it became reversed. TLRs 7 and 9 showed highest expression in the majority of tumor cells tested. In conclusion, larynx carcinoma cell lines exhibit rather universal expression of TLRs, both on protein and molecular level. Culture of TLR expressing tumor cells with respective ligand has ambiguous effect on TLR expression but points out for potential reactivity of tumor cells with TLR agonists. This may have implications for attempts of TLRs agonist-mediated tumor immunotherapy in patients with laryngeal carcinoma.

Wykryte w latach 80. ubiegłego stulecia receptory Toll-podobne (*Toll-like receptor* – TLR) rozpoznające tzw. wzory molekularne związane z patogenami (*pathogen associated molecular patterns* – PAMPs) okazały się nowym istotnym czynnikiem odporności wrodzonej układu immunologicznego. Pozwalają bowiem wykryć obecność jednokomórkowych organizmów, takich jak wirusy, bakterie, grzyby czy pierwotniaki, dzięki występowaniu na tych patogenach różnych molekuł, których zwykle nie stwierdza się na komórkach organizmów wielokomórkowych. Są to różne cukry, lipopolisacharydy, glikolipidy, jednoniciowe kwasy nukleinowe i inne związki konieczne dla ich przeżycia i wzrostu. Aktywacja TLR po rozpoznaniu PAMP pobudza nie tylko mechanizmy obrony odporności wrodzonej, lecz także nabytej. Ich występowanie najczęściej dotyczy komórek układu odpornościowego, ale wykryto je także na nabłonkach zarówno pokrywnych, jak i gruczołowych. Receptory Toll-podobne występują także u człowieka. Wyróżnia się ok. 10–11 TLR w zależności od rodzaju rozpoznawanego PAMP (ligandu – agonisty). W uprzednich badaniach wykazaliśmy ekspresję 3 TLR (TLR2, 3, 4) na komórkach raka krtani u człowieka przy użyciu immunohistochemii (IHC) na skrawkach mrożonych guzów z materiału chirurgicznego. W obecnej pracy badaliśmy ekspresję TLR1-10 na poziomie białkowym i molekularnym, stosując komórki 6 ustalonych linii raka krtani. Ponadto komórki te poddano hodowli *in vitro* w obecności odpowiednich ligandów dla poszczególnych TLR i porównywano wpływ 24-godzinnej hodowli z ligandem i bez ligandu na ekspresję danego TLR przy użyciu przeciwciał monoklonalnych anty-TLR i cytometrii przepływowej.

Reaktywność TLR oceniana przy użyciu immunocytochemii (ICC) i przeciwciał anty-TLR na osadach komórko-

wych była widoczna na komórkach wszystkich badanych linii, ale odsetek komórek dodatnich wahał się od 10 do 100. W reakcji PCR stwierdzono mRNA dla wszystkich badanych TLR w 6 badanych liniach. Po hodowli z ligandem każda linia wykazywała odmienny wzór ekspresji danego TLR. Oceniany był odsetek komórek dodatnich oraz tzw. średnia intensywność fluorescencji (MFI) odpowiadająca ekspresji TLR na poszczególnych komórkach. Rozróżniano także ekspresję powierzchniową od cytoplazmatycznej. Ta ostatnia wykazywała zwykle wyższą MFI niż powierzchniowa. Najwyższą ekspresję w większości linii miały TLR7 i 9. Pod wpływem hodowli z ligandem zauważono transfer produktu białkowego TLR z cytoplazmy na powierzchnię komórki.

Podsumowując – powyższe dane wskazują na powszechne występowanie receptorów Toll-podobnych na komórkach raka krtani. Ich rola biologiczna pozostaje nieznana. Ich reaktywność i zmiany czynnościowe pod wpływem ligandów (agonistów) sugerują, że czynniki te mogą mieć potencjalny efekt modulujący wzrost i rozwój raka, co nasuwa możliwość ich zastosowania w immunoterapii tego nowotworu.

[11]

Design and generation of MLPA assay for parallel analysis of copy number and small-size mutations in EGFR gene

Opracowanie testu MLPA do jednoczesnej analizy zmienności liczby kopii i mutacji punktowych w genie EGFR

Piotr Kozłowski

European Centre of Bioinformatics and Genomics, Institute of Bioorganic Chemistry, PAS, Poznań

Cancer development is driven by the accumulation of somatic mutations, such as loss-of-function mutations in tumor suppressor genes and gain-of-function mutations in proto-oncogenes. Additionally, germline alterations in cancer-related genes may modify predisposition to cancers. *EGFR* is one of key protooncogenes and is frequently mutated in various types of cancer. Oncogenic variants that activate *EGFR* can be both copy number (*EGFR* amplification and vIII deletion) and small-size mutations (substitutions, in-frame deletions and in-frame insertions). The status of *EGFR* mutations is an important modifying factor in the effectiveness of tyrosine kinase inhibitor (TKI) treatment. Lung cancers with certain *EGFR* mutations (e.g., L858R and exon 19 in-frame deletions) are sensitive to TKI treatment, whereas the occurrence of the secondary mutation T790M causes resistance to TKIs.

However, due to the fact that copy number alterations and small-size mutations in *EGFR* are analyzed by different methods, testing for *EGFR* mutations is complicated and costly and usually does not provide information about the relationship between amplification and small-size mutations (i.e., what fraction of amplified copies contains small mutations).

Therefore, I developed multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) assay that allow combined analysis of

copy number and small-size mutations in *EGFR*. This assay was designed according to a strategy that utilizes exclusively synthetic probes and allows to develop MLPA assays in any region of the human genome. The important advantage of proposed analysis is its low cost of about \$5 per sample. The assay was tested and validated on several dozen samples from different types of cancer, i.e., lung, brain, and head and neck cancers.

Acknowledgement: The Ministry of Science and Higher Education, Grant No. N N302-278937; collaborators, Professor David Kwiatkowski from the Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, and Professor Kwok-Kin Wong from the Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA.

W trakcie rozwoju nowotworu w genomie komórek nowotworowych akumuluje się wiele mutacji somatycznych; wśród nich mutacje utraty funkcji w genach supresorowych oraz mutacje nabycia funkcji w protooncogenach. Ponadto germlinalne warianty sekwencji występujące w genach związanych z nowotworzeniem mogą modyfikować ryzyko występowania nowotworów. Jednym z kluczowych protooncogenów, który ulega częstym mutacjom w różnych typach nowotworów, jest gen receptora czynnika wzrostu nabłonka (*epidermal growth factor receptor* – *EGFR*). Wśród mutacji genu *EGFR* występują zarówno duże mutacje o charakterze zmienności liczby kopii (amplifikacja całego genu czy delecja vIII), jak i małe mutacje obejmujące jeden czy kilka nukleotydów (substytucje oraz delecje i insercje w ramce odczytu). Okazało się, że mutacje w genie *EGFR* są ważnym czynnikiem modyfikującym skuteczność terapeutyczną inhibitorów kinazy tyrozynowych (TKI). Podczas gdy pewne mutacje w domenie kinazy tyrozynowej (np. L858R i delecje w ramce odczytu w eksonie 19) powodują wrażliwość raka płuca na terapię TKI, to pojawienie się wtórnej mutacji T790M przywraca oporność nowotworu na TKI. Jednak ze względu na stosowanie różnych metod do wykrywania dużych i małych mutacji, analiza mutacji w genie *EGFR* jest kłopotliwa, kosztowna i zwykle nie pozwala na określenie wzajemnego stosunku zmienności liczby kopii i małych mutacji.

W celu uproszczenia analizy genu *EGFR* opracowałem test MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*) pozwalający na jednoczesną analizę zmienności liczby kopii i małych mutacji. Test ten został zaprojektowany wg strategii wykorzystującej wyłącznie krótkie syntetyczne sondy pozwalające na generowanie testów MLPA specyficznych do dowolnego miejsca w genomie. Ważną cechą proponowanej analizy jest jej niski koszt, który wynosi ok. 5 \$ za próbkę. W trakcie opracowywania i optymalizacji tego testu przeanalizowano dziesiątki próbek genomowego DNA z różnych typów nowotworów, w tym: raka płuca, mózgu oraz raka głowy i szyi.

Podziękowania: Grant Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego Nr N N302 278937; współpracownicy, profesor David Kwiatkowski z Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, i profesor Kwok-Kin Wong z Dana-Farber Cancer Institute, Boston, MA.

Session 3

Personalization of treatment and targeted therapies I

Personalizacja leczenia oraz terapie celowane I

[12]

Personalized medicine in cancer diagnosis and treatment

Medycyna spersonalizowana w diagnostyce i leczeniu nowotworów

Christoph C. Zielinski

Director, Clinical Division of Oncology and Chairman, Department of Medicine I, Comprehensive Cancer Center, Medical University Vienna – General Hospital, Austria

According to a recent declaration by the US Secretary of Health and Human Services, “personalized health care means knowing what works, knowing why it works, knowing who it works for, and putting that knowledge into practice for patients”. Accordingly, Dr. Blayney in his ASCO presidential address 2010 said that “we are moving away from classifying tumors on the basis of what they look like under the microscope and toward classifying them dynamically on the basis of which signalling pathway is active in driving the malignancy at certain points in the cancer continuum” (J Clin Oncol 2010). Thus, personalisation refers to diagnosis and treatment resulting in the fact that each patient receives the most appropriate therapy corresponding to the characteristics of his or her tumor.

The targeting of treatment in cancer is an old concept going back to the discovery of hormone receptors which is exploited today more than ever for the therapy endocrine-dependent tumors. The Cancer Gene Census has shown that tumors can be characterised by a multiplicity of various genetic alterations without the identification of a clear-cut pattern which would result in malignancy: As around 5% of malignant diseases are monogenic, 95% stem from mutations in a variety of genes, as well as from environment and life style factors leading to the need for mass-personalisation for diagnosis and treatment. In addition, a series of positive and negative predictive biomarkers regarding treatment efficacy and disease outcome have enriched the field. Examples for targeted treatment include antibodies and tyrosine kinase inhibitors directed at a multitude of various pathways of varying importance for each tumor. Cancers of the breast, the colon and the lung (particularly non-small cell lung cancer) represent good examples for the efficacy of this approach. This includes in breast cancer endocrine treatment as well as targeting HER-2/neu in the adjuvant and the advanced disease setting. In colon cancer, EGFR-targeted therapies limited in env. 40-50% by the presence of negative predictive biomarkers have generated an important step forward in our treatment options of this disease.

Finally, non-small cell lung cancer has become one of the most formidable examples for the efficacy of targeted treatment including mutations of EGFR as well as ALK translocations which comprise env. 5% of tumors. Targeting of the latter genetic alteration has led to overall response rates of up to 80% in appropriately characterized patients.

Currently, around 850 anticancer agents are in clinical development for malignant diseases where the development of targeted substances has largely substituted the emergence of previously highly favoured cytotoxic drugs. This development will continue as we watch the field of targeted and personalized treatment and diagnosis to further unfold.

[13]

Analysis of the frequency of pathological complete response after neoadjuvant chemotherapy with cisplatin in BRCA1 mutation carriers with breast cancer

Analiza częstości uzyskiwania całkowitych remisji patologicznych w leczeniu przedoperacyjnym cisplatyną BRCA1-zależnych raków piersi

Tomasz Byrski¹, Jacek Gronwald¹, T. Huzarski¹, Elżbieta Marczyk², Paweł Blecharz², O. Ashuryk¹, Cezary Cybulski³, Tadeusz Dębniak¹, A. Jakubowska¹, D. Zuziak³, R. Wiśniowski³, Dariusz Godlewski⁴, Steven A. Narod⁵, Jan Lubiński¹

¹Pomeranian Medical University, Szczecin

²Oncology Institute, Kraków

³Regional Oncology Center, Bielsko-Biała

⁴Center for Epidemiology and Prevention, Poznań

⁵Women's College Research Institute, Toronto, Ontario, Canada

Aim of study: The aim of this study was to evaluate the frequency of pathological complete response (pCR) in BRCA1 mutation carriers diagnosed with breast cancer treated with preoperative cisplatin chemotherapy.

Material and methods: Between December 2006 and November 2010 fifty five women with BRCA1 mutation and diagnosed with breast cancer stage I to III were enrolled. Patients were treated with cisplatin at dose 75 mg/m² every three weeks for four cycles. After chemotherapy mastectomy was performed and followed with conventional chemotherapy. Seven patients had prior chemotherapy for a previous cancer diagnosis. Four patients received prior chemotherapy for their current cancer diagnosis and than received therapy according our protocol.

In the group of 44 patients treated with cisplatin in first line of treatment – 15 met the standard criteria for neoadjuvant chemotherapy, and in 29 cases – the criteria were not met.

Pathologic complete response was determined by review of surgical specimens. Complete pathologic response was defined as no residual invasive disease in both the breast and axilla. Information was collected on clinical stage, grade, hormone receptor status and HER2 status prior to treatment.

Results: A pathologic complete response (pCR) was observed in 37/55 (67%) patients, partial response was observed in 17/55 (31%) patients and stable disease in 1/55 (2%) patient. After excluding those patients who were treated with chemotherapy in the past-pathological complete response was achieved in 34/44 (7,3%) patients. In the group of 15 patients who met the standard criteria for neoadjuvant chemotherapy and treated with cisplatin-monotherapy as a first line of treatment pathological complete response was achieved in 67% (10/15) patients. In group of remaining 29 patients who did not meet the criteria for neoadjuvant treatment the pathological complete response was achieved in 83% (24/29) patients.

Cel pracy: Celem pracy była ocena częstości uzyskiwania całkowitych remisji patologicznych (pCR) u pacjentek ze zdiagnozowanym BRCA1-zależnym rakiem piersi, u których zastosowano przedoperacyjną chemioterapię – cisplatynę w monoterapii.

Materiał i metody: Do badania włączono 55 pacjentek ze zdiagnozowanym rakiem piersi i potwierdzoną mutacją w genie *BRCA1*. Pacjentki w stopniach zaawansowania klinicznego I–III włączono do badania w okresie od grudnia 2006 r. do listopada 2011 r. Otrzymywały 4 cykle leczenia przedoperacyjnego cisplatyną w monoterapii w dawce 75 mg/m² podawanej dożylnie co 21 dni. Po 4 cyklach chemioterapii poddawane były zabiegowi chirurgicznemu (mastektomii), a następnie standardowej uzupełniającej chemioterapii. W tej grupie znalazło się 11 pacjentek leczonych wcześniej chemioterapią (7 pacjentek – z powodu pierwszego pierwotnego raka piersi leczonego w przeszłości chemioterapią i 4 pacjentki leczone z powodu obecnie zdiagnozowanego raka piersi innymi schematami chemioterapii przed wdrożeniem cisplatyny). W grupie 44 pacjentek leczonych cisplatyną pierwszorazowo 15 spełniało standardowe kryteria kwalifikacji do chemioterapii neoadiuwantowej, a w 29 przypadkach kryteria nie były spełnione. Histopatologicznie całkowitą remisją patologiczną rozpoznawano, gdy nie stwierdzono nacieku z komórek nowotworowych zarówno w gruczole piersiowym, jak i w pachowych węzłach chłonnych. Przed włączeniem do leczenia u każdej pacjentki zdiagnozowano stopień zaawansowania klinicznego, stopień złośliwości morfologicznej, stan receptorów hormonalnych i receptora HER2.

Wyniki: W wyniku zastosowania cisplatyny w monoterapii u 37 z 55 pacjentek (67%) uzyskano całkowitą remisję patologiczną, częściową odpowiedź uzyskano u 17 z 55 pacjentek (31%), a stabilizację u jednej pacjentki (1 z 55). Po wykluczeniu tych pacjentek, które w przeszłości leczone były chemioterapią, okazało się, że całkowitą remisję patologiczną uzyskano u 34 z 44 pacjentek (77,3%). W grupie 15 pacjentek leczonych pierwszorazowo cisplatyną w monoterapii i spełniających standardowe kryteria włączenia do chemioterapii neoadiuwantowej całkowitą remisję patologiczną uzyskano u 67% pacjentek (10 z 15), a u pozostałych 29 pacjentek odsetek uzyskanych całkowitych remisji patologicznych wyniósł 83% (24 z 29).

[14]

Bevacizumab in the first line ovarian cancer. Dilemma

Bewacizumab w leczeniu I rzutu raka jajnika. Dylemat

Radostaw Mądry, Janina Markowska

Klinika Onkologii, Uniwersytet Medyczny
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

In 2005, Monk *et al.* published the first report of bevacizumab activity (humanized monoclonal antibody against all isoforms of vascular endothelial growth factor – VEGF) in a patient with advanced ovarian cancer. Phase II studies have demonstrated the existence of drug activity in various combinations. In 2010, the results of phase III trials using BEV for the first line treatment of ovarian cancer have been published. The results of both studies (GOG218 and ICON7), despite the assumptions of which was statistically significant prolongation of survival time to progression (PFS) disappointed. PFS in GOG218 study was 14.1 months vs. 10.3 in control group ($p < 0.0001$). Similarly the ICON7 study PFS was 19.0 months in the study group vs. 17.3 in control group ($p = 0.0041$). These results once again posed the question about the place of antiangiogenic therapy with the use of bevacizumab in ovarian cancer treatment. Using the available literature data BEV efficacy in OC patients treatment was compared with another drug, which is also attributed antiangiogenic activity – paclitaxel. In the consolidating treatment according to Markman (JCO 2003) in patients receiving paclitaxel in monotherapy after a first-line treatment by 12 vs. 3 months PFS was respectively, 28 vs. 21 months ($p = 0.0023$). Similarly, paclitaxel administered every week in the first-line treatment according Katsumata *et al.* (Lancet 2009) significantly prolonged the PFS of 28 months ($p = 0.0015$) vs. 17.2 in the control group. In all the cited studies, there was no effect on survival. Currently, there are available schemes which give better results compared with the BEV in the both first-line treatment as well as consolidating therapy. Criticism of research results of GOG218 and ICON7 should not affect the use of bevacizumab beyond first-line treatment, where its effectiveness was demonstrated.

W 2005 r. Monk i wsp. opublikowali pierwsze doniesienie o aktywności bewacizumabu (BEV) [humanizowanego przeciwciała monoklonalnego skierowanego przeciwko wszystkim izoformom naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (*vascular endothelial growth factor* – VEGF)] u pacjentki z zaawansowanym rakiem jajnika. Badania II fazy wykazały istnienie aktywności leku w różnych kombinacjach. W 2010 r. przedstawiono wyniki badań III fazy z zastosowaniem bewacizumabu w leczeniu I rzutu raka jajnika. Wyniki obu badań (GOG218 i ICON7) pomimo osiągniętego założenia, jakim było istotne statystycznie wydłużenie czasu do progresji (*progression-free survival* – PFS), rozczarowały. Czas do progresji w badaniu GOG218 wynosił odpowiednio 14,1 miesiąca w grupie badanej vs 10,3 w grupie kontrolnej ($p < 0,0001$). Podobnie w badaniu ICON7 PFS wynosił 19 miesięcy w grupie badanej vs 17,3 w grupie

kontrolnej ($p = 0,0041$). Wyniki te spowodowały ponownie pytania o miejsce leczenia antyangiogenne, w tym z zastosowaniem bewacizumabu u chorych na raka jajnika. Za pomocą dostępnych danych literaturowych porównano zastosowanie bewacizumabu u chorych leczonych z powodu raka jajnika z wynikami badań z zastosowaniem innego leku również „oskarżanego” o działanie antyangiogenne – paklitakselu.

W leczeniu konsolidującym wg Markmana (JCO 2003) w grupie chorych otrzymujących paklitaksel w monoterapii po zakończeniu leczenia I rzutu przez 12 miesięcy vs 3 miesiące PFS wynosił odpowiednio 28 vs 21 miesięcy ($p = 0,0023$).

Również zastosowanie paklitakselu podawanego co tydzień w leczeniu I rzutu wg Katsumata i wsp. (Lancet 2009) wydłużyło istotnie PFS do 28 miesięcy ($p = 0,0015$) vs 17,2 w grupie kontrolnej. We wszystkich tych badaniach nie wykazano wpływu na czas przeżycia.

Obecnie dostępne są schematy dające lepsze wyniki leczenia w porównaniu z BEV zarówno w leczeniu I rzutu, jak i w leczeniu konsolidującym po I linii. Krytyka wyników badań GOG218 i ICON7 nie powinna mieć wpływu na stosowanie bewacizumabu poza leczeniem I rzutu, gdzie wykazał swoją skuteczność.

[15]

Możliwości leczenia inhibitorami receptorów naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR) chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca

Rodryg Ramlau

Wielkopolskie Centrum Pulmonologii i Torakochirurgii w Poznaniu

Ze względu na częste pobudzenie szlaku naskórkowego czynnika wzrostu (*epidermal growth factor* – EGF) w niedrobnokomórkowym raku płuca (NDRP) jest to obiecujący kierunek leczenia przeciwnowotworowego cząsteczkami molekularnie ukierunkowanymi.

Cetuksimab to rekombinowane przeciwciało monoklonalne, blokujące wiązanie EGF. Wykazano skuteczność zastosowania tego leku w celowanej terapii I linii u chorych na zaawansowanego NDRP, z potwierdzoną immunohistochemicznie ekspresją EGFR. W badaniu klinicznym III fazy zaobserwowano z cetuksimabem, natomiast nie stwierdzono różnic związanych z czasem wolnym od progresji. Odpowiedź terapeutyczna nie była zależna od rozpoznania histologicznego. Lek nie został zarejestrowany do stosowania u chorych na NDRP z powodu niewielkiej korzyści terapeutycznej oraz znaczącej toksyczności.

Erlotinib i gefitinib – niskocząsteczkowe inhibitory kinazy tyrozynowej (IKT) – nie wykazały efektywności terapeutycznej w połączeniu z chemioterapią jako leczenie I linii u chorych na zaawansowanego NDRP. Po przeprowadzeniu analizy molekularnej potwierdzającej obecność mutacji genu EGFR (egzon 19 lub 21) zaobserwowano większą skuteczność u chorych na NDRP w porównaniu ze standardową

chemioterapią. Gefitinib został zarejestrowany w tym wskazaniu jako możliwość leczenia w I linii, w połączeniu z chemioterapią po jednoznacznym stwierdzeniu obecności wspominanych mutacji.

Wyniki dwóch badań klinicznych (*European Randomised Trial of Tarceva vs. Chemotherapy* – EURTAC, OPTIMAC) mające określić miejsce erlotinibu w leczeniu I linii u chorych z potwierdzoną obecnością mutacji genu EGFR, zostaną przedstawione w tym roku.

Ogłoszone wyniki badań klinicznych TITAN i HORG (*Hellenic Oncology Research Group*) udowodniły równoważność w zakresie skuteczności erlotinibu w porównaniu z monoterapią pemetreksesem w II linii leczenia chorych na NDRP.

Obecnie prowadzone są obiecujące badania kliniczne z użyciem inhibitorów kinazy tyrozynowej EGFR drugiej generacji, które hamują nieodwracalnie jej aktywność.

[16]

Tyrosine kinase inhibitors and cardiovascular system

Inhibitory kinaz tyrozynowych a układ sercowo-naczyniowy

Sebastian Szmít^{1,2}

¹Department of Oncology, Military Institute of Medicine

²First Department of Cardiology, Medical University of Warsaw

Low molecule targeted therapeutics were supposed to be less toxic than traditional chemotherapeutics. It has occurred that tyrosine-kinase inhibitors (TKI) are acting on kinases which are expressed in heart and vascular system. The blocking of several kinases may affect the time of functioning of cardiomyocytes. In clinical practice we observe development of heart failure and hypertension during the TKI treatment.

There were described two molecular mechanisms of cardiotoxicity associated with TKIs. The first one is direct acting of the medicament. The kinase on which the TKI is acting is present in the neoplastic cells and also in the vessel walls. This type of cardiotoxicity is specific for imatinib. The second type is toxicity associated with TKI blocking other kinases which primarily were not the blocked. This is due to limited selectivity of most of TKIs. The best example is sunitinib.

It is still not fully understood if the heart failure induced by TKIs is due to loss of cardiomyocytes (mostly irreversible) or due to inappropriate function of cardiomyocytes (potentially reversible). The other problem is retention of fluids and arrhythmias induced by TKIs.

The real paradox of cardiooncology is hypertensive reaction due to antineoplastic treatment. The rise of blood pressure induced by TKIs may be positive prognostic and predictive factor.

From the practical point of view of cardiologists and oncologists is to recognize of early myocardial dysfunction and to start the optimal cardiologic treatment. There are still discussions about cardioprotective managements. The

main element seems to be the optimal treatment of hypertension induced by TKIs.

Drobnocząsteczkowe terapie celowane miały być mniej toksyczne niż tradycyjne chemioterapeutyki. Okazało się jednak, że inhibitory kinaz tyrozynowych (TKI) oddziałują na kinazy ulegające ekspresji w sercu i układzie naczyniowym. Hamowanie niektórych kinaz może nawet upośledzać przeżycie kardiomiocytów. Dlatego stosując TKI, obserwuje się rozwój nadciśnienia tętniczego oraz niewydolności serca.

Opisano dwa typy molekularnych mechanizmów kardiotoxyczności związanej z TKI. Pierwszy to toksyczność wynikająca bezpośrednio z mechanizmu działania leku. Kinaza, która jest punktem uchwytu dla TKI, występuje zarówno w nowotworze, jak i w układzie naczyniowym. Taka kardiotoxyczność jest znamieną dla imatinibu. Drugi to toksyczność związana z tym, że TKI hamują dodatkowo kinazy, które w założeniu nie miały być dla nich punktem uchwytu. Ten typ toksyczności jest związany z ograniczoną selektywnością większości TKI. Najlepszym przykładem jest sunitinib.

Nierozstrzygnięty pozostaje nadal problem, czy indukowana przez TKI niewydolność serca jest powodowana przez utratę kardiomiocytów (i w dużej mierze jest nieodwracalna) czy tylko przez nieprawidłową funkcję kardiomiocytów (zatem jest potencjalnie odwracalna). Kolejnym problemem jest ryzyko nadmiernego zatrzymywania płynów oraz zaburzenia rytmu serca indukowane przez TKI.

Prawdziwym paradoksem kardioonkologii okazuje się występowanie nadciśnienia tętniczego. Wzrost ciśnienia indukowany przez niektóre TKI może być bardzo korzystnym czynnikiem prognostycznym i predykcyjnym.

Z punktu widzenia praktykującego kardiologa i onkologa, najważniejsze jest jak najwcześniejsze rozpoznanie dysfunkcji serca oraz jej optymalne leczenie. Trwają dyskusje na temat kardioprotekcji farmakologicznej. Kluczowym zagadnieniem wydaje się optymalne leczenie nadciśnienia tętniczego indukowanego przez TKI.

Session 4

Oral presentations

Doniesienia ustne

[17]

Leukemic stem cells – hypotheses and facts

Macierzyste komórki białaczkowe – hipotezy i fakty

Danuta Duś

[18]

Analysis of suppressor genes *PTEN*, *APC* and *DCC* expression in endometrial carcinomaAnaliza ekspresji genów supresorowych *PTEN*, *DCC*, *APC* w raku endometrium

Patrycja Grosman-Dziewiszek, Dariusz Samulak, Agnieszka Gomułkiewicz, Piotr Dziegiel, Maciej Zabel

Background: Suppressor genes play a crucial role in cancerogenesis process, not only in initiation, but also in progression level of development endometrial carcinoma. Underexpression some of them, for example *PTEN*, can be connected with estrogen receptors activation and can be useful in respond to trasuzumab or mTOR inhibitors therapy prediction. Moreover, they can be involved in signaling pathways regulation in cancer stem cells forming.

Aim of study: The aim of this study was to determine the expression of suppressor genes *PTEN*, *DCC* and *APC* in relation to estrogen (ER) and progesterone (PgR) receptors expression and the degree of histological maturity of carcinoma (grading) in endometrial carcinoma.

Material and methods: Specimens of endometrial cancer ($n = 123$) and normal endometrium tissue ($n = 14$) embedded into paraffin blocks and frozen constituted the research material. The expression of ER and PgR both p53 and bcl-2 proteins were evaluated by means of a immunohistochemical method. The level of the expression of *HER2/neu*, *PTEN*, *H-ras*, *COX-2*, *APC*, *E-cadherin*, *DCC* genes was tested by means of real-time PCR method with Applied Biosystems TaqMan Array 96-WellPlates.

Results: We observed the increased expression of suppressor genes *PTEN*, *APC* and *DCC* in G1 and G2 groups. Only the expression of *DCC* gene in G3 group was increased compared to the control group, *PTEN* and *APC* showed decreased expression. We demonstrated also the lower expression of *APC* gene in positive correlation to ER expression. The statistical evaluation was prepared and correlation between the expression of hormone receptors and analyzed genes and p53 and bcl-2 proteins was observed.

Conclusions: Most of patients show less or more stronger lower expression of *PTEN* and *APC* suppressor genes. The suppressor genes evaluation in endometrial car-

cinoma could improve selection of treatment methods and increase effectiveness of the treatment through the personalization. Specially in recurrent, advanced or metastatic endometrial cancer.

Wstęp: Geny supresorowe odgrywają ważną rolę w procesie kancerogenezy nie tylko na etapie inicjacji, lecz także progresji raka endometrium. Obniżona ekspresja niektórych z nich, np. *PTEN*, może mieć związek z aktywacją receptorów estrogenowych oraz służyć przewidywaniu odpowiedzi na terapię trastuzumabem lub inhibitorami mTOR. Ponadto mogą być zaangażowane w regulację szlaków sygnałowych związanych z powstawaniem nowotworowych komórek macierzystych.

Cel pracy: Celem pracy było zbadanie poziomu ekspresji genów supresorowych *PTEN*, *DCC* i *APC* w odniesieniu do ekspresji receptorów estrogenowych (ER) i progesteronowych (PgR) oraz stopnia złośliwości G w raku endometrium.

Materiał i metody: Materiał do badań stanowiły wycinki raka endometrium ($n = 123$) oraz niezmięnionej nowotworowo tkanki ($n = 14$) w postaci bloczków parafinowych i zamrożonej tkanki. Metodą immunohistochemiczną oceniono ekspresję ER i PgR oraz białka p53 i bcl-2. Ekspresję genów *HER2/neu*, *PTEN*, *H-ras*, *COX-2*, *APC*, *E-cadheriny*, *DCC* oznaczono metodą *real-time* PCR przy użyciu przygotowanych na zamówienie TaqMan Array 96-WellPlates Applied Biosystems.

Wyniki: Zaobserwowano obniżoną ekspresję genów supresorowych *PTEN*, *APC* i *DCC* w grupach G1 i G2. W grupie G3 *PTEN* i *APC* wykazywały obniżoną ekspresję, tylko ekspresja genu *DCC* w stosunku do grupy kontrolnej była zwiększona. Wykazano także obniżenie ekspresji genu *APC* korelujące ze wzrostem ekspresji receptorów estrogenowych. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej stwierdzając zależność pomiędzy stężeniem receptorów dla hormonów a ekspresją badanych genów oraz białek p53 i bcl-2.

Wnioski: Obniżona ekspresja genów supresorowych *PTEN* i *APC* występuje w różnym stopniu nasilenia u większości pacjentek. Ocena ekspresji genów supresorowych w raku endometrium mogłaby umożliwić odpowiedni dobór metod leczenia a także znacząco zwiększyć skuteczność terapii, poprzez jej personalizację, zwłaszcza w przypadku zaawansowanych nowotworów z przerzutami.

[19]

Co-occurrence of *MGMT* gene promoter methylation and amplification of *EGFR* gene in malignant gliomasOcena współwystępowania metylacji promotora genu *MGMT* i amplifikacji genu *EGFR* w złośliwych glejakach operowanych w Klinice Neurochirurgii CM UJ

Dariusz Adamek

Background: The way to improve the efficiency of chemotherapy of malignant gliomas may be combined

administration of alkylating agents and those targeted on epithelial growth factor receptor (EGFR). The patients eligible to such therapy should show hypermethylation of MGMT (O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase) promoter as well as amplification of EGFR.

Aim of study: Preliminary assessment of frequency of MGMT hypermethylation and amplification of EGFR co-occurrence in malignant gliomas in patients diagnosed and operated in Medical College in Kraków.

Material and methods: 21 consecutive cases of glioblastoma multiforme (W – 65%, M – 35%, age average 51 years). The methylation status of the MGMT promoter was determined by methylation-specific PCR (MS-PCR). Before MS-PCR, genomic DNA was treated with sodium bisulphite, purified, denaturated, precipitated and eluted. EGFR amplification was investigated using FISH method.

Results: With the regards of MGMT methylation status and the occurrence of EGFR amplification, four groups of tumors (patients) were established: I – hypermethylation and amplification (4/21 – 19,04%). II – hypermethylation no amplification (6/21 – 28,6%), III – no hypermethylation with amplification (4/21 – 19,04%), IV – no hypermethylation, no amplification (7/21 – 33,3%).

Conclusions: Theoretically almost one fifth (19%) of patients with glioblastoma multiforme i.e. those featuring MGMT hypermethylation and EGFR amplification, could potentially take advantage from bimodal chemotherapy with alkylating agent and EGFR blocker. Our results confirm other reports indicating that there no relation between MGMT methylation and EGFR amplification.

Financial support by Grant No K/ZDS/001044 Jagiellonian Univ.

Wstęp: Sposobem na poprawienie skuteczności chemioterapii w złośliwych glejakach może być skojarzenie leczenia lekami alkilującymi i działającymi poprzez receptor naskórkowego czynnika wzrostu (*epithelial growth factor receptor* – EGFR). Kwalifikacja do takiego leczenia wymagałaby oceny statusu metylacji promotora MGMT (O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase) i amplifikacji genu *EGFR*.

Cel pracy: Ocena częstości współwystępowania metylacji promotora MGMT i amplifikacji genu *EGFR* w złośliwych glejakach u pacjentów diagnozowanych i operowanych w ośrodku krakowskim.

Materiał i metody: Materiał stanowiło 21 kolejnych przypadków *glioblastoma multiforme* (kobiety – 65%, mężczyźni – 35%, średnia wieku 51 lat). Metylację promotora MGMT określono za pomocą MS-PCR (*methylation-specific PCR*). Reakcja MS-PCR została wykonana dla dwóch par startów – amplifikujących zmetylowane DNA oraz primerów specyficznych dla niezmetylowanej matrycy. Oceny amplifikacji genu *EGFR* wykonano metodą FISH.

Wyniki: Wśród przebadanych 21 przypadków nowotworów można wyróżnić 4 grupy pod względem statusu MGMT i amplifikacji *EGFR*: I – hipermetylacja i amplifikacja genu (4/21 – 19,04%), II – hipermetylacja bez amplifikacji (6/21 – 28,6%) oraz III – brak metylacji z amplifikacją (4/21 – 19,04%) i IV – brak metylacji bez amplifikacji (7/21 – 33,3%).

Wnioski: Teoretycznie blisko jedna piąta chorych na *glioblastoma multiforme* mogłoby potencjalnie skorzystać

z zastosowania dwumodalnej chemioterapii z zastosowaniem leku alkilującego i blokera *EGFR* (odsetek przypadków zarówno z hipermetylacją MGMT i amplifikacją genu *EGFR*). Nasze rezultaty potwierdzają doniesienia innych autorów, iż nie można stwierdzić związku pomiędzy metylacją MGMT a amplifikacją *EGFR*.

Praca sfinansowana z programu K/ZDS/001044, Uniw. Jagielloński

[20]

Heme oxygenase-1 is a key player in differentiation of melanoma cells

Oksygenaza hemowa 1 odgrywa istotną rolę w różnicowaniu komórek czerniaka

Halina Waś¹, Anna Tejchman¹, Milena Mazan¹, Paweł Dominik¹, Jerzy Kotlinowski¹, Anna Zebzda², Józef Dulak¹, Alicja Józkowicz¹

¹Department of the Medical Biotechnology, Faculty of Biochemistry, Biophysics and Biotechnology, Jagiellonian University, Krakow

²Transplantation Centre, Jagiellonian University, Krakow

Heme oxygenase-1 (HO-1) is an inducible enzyme that catalyzes heme degradation. In our previous experiments we demonstrated that HO-1 exhibited protumoral effects in murine melanoma cells. The aim of the present study was to examine mechanisms responsible for these actions.

Melanoma cell line B16(F10) were transduced with retroviral vectors encoding for luciferase, GFP and HO-1 [B16(F10)-luc-GFP-HO-1]. B16(F10)-luc-GFP cells were used as a control. B16(F10)-luc-GFP-HO-1 cells displayed strongly de-differentiated phenotype. They were smaller, less granular and showed less dendritic morphology. Furthermore, B16(F10)-luc-GFP-HO-1 exhibited weaker pigmentation. Of importance, expressions of genes related to melanin synthesis and melanoma differentiation: tyrosinase, TRP-1 and TRP-2, gp-100 and MART-1 were strongly reduced in HO-1 overexpressing cells. Interestingly, hypoxia (2% of oxygen) enhanced de-differentiating actions of HO-1 resulting in further inhibition of investigated genes. On the other hand, levels of genes linked to cell "stemness": CD34, CD44, Nestin and Nodal were significantly upregulated in HO-1 overexpressing cells. Finally, those cells were more prone than control cells to display cancer-stem cell like phenotype in response to serum deprivation. Therefore, we hypothesized that melanoma differentiation might be dependent on oxidative status. Indeed, H₂O₂ increased expression of tyrosinase in melanoma cells in dose-dependent manner, whereas N-acetylcysteine (ROS scavenger) reversed this effect and additionally reduced pigmentation of B16(F10)-luc-GFP cells.

Altogether, these data suggest that modulation of oxidative status by HO-1 leads to de-differentiation of melanoma cells, what may facilitate their more aggressive phenotype.

Oksygenaza hemowa 1 (HO-1) to indukowalny enzym, który rozkłada hem. W naszych wcześniejszych doświadczeniach wykazaliśmy, że HO-1 ma własności pronowotworowe. Celem prezentowanych badań było poznanie odpowiedzialnych za nie mechanizmów.

Jako modelu użyto komórek mysiego czerniaka B16(F10) stransdukowanych wektorami retrowirusowymi kodującymi geny GFP, lucyferazy i HO-1 [B16(F10)-luc-GFP-HO-1], natomiast jako komórek kontrolnych – linii B16(F10)-luc-GFP. Komórki B16(F10)-luc-GFP-HO-1 wykazywały silnie odróżniony fenotyp: były mniejsze, mniej ziarniste i charakteryzowały się mniej dendrytyczną morfologią. Dodatkowo komórki B16(F10)-luc-GFP-HO-1 były słabiej upigmentowane. Co ważne, ekspresja genów związanych z syntezą melaniminy oraz różnicowaniem czerniaka: tyrozynazy, TRP1, TRP-2, GP-100 oraz MART-1 była zredukowana w komórkach z nadekspresją HO-1. Hipoksja (2% tlenu) nasilała odróżniujące własności HO-1, prowadząc do dalszego zahamowania ekspresji ww. genów. Poza tym poziom genów związanych z „macierzystością” komórek: CD34, CD44, Nestin i Nodal był wyższy w komórkach B16(F10)-luc-GFP-HO-1. W końcu komórki te częściej niż komórki kontrolne wykazywały fenotyp podobny do nowotworowych komórek macierzystych w odpowiedzi na obniżenie zawartości surowicy w pożywce. W związku z tym postawiliśmy hipotezę, że status oksydacyjny pełni ważną rolę w różnicowaniu czerniaka. Rzeczywiście, H₂O₂ zwiększał ekspresję tyrozynazy, podczas gdy *N*-acetylocysteina (zmiatacz wolnych rodników tlenowych) odwracała ten efekt i dodatkowo zmniejszała pigmentację komórek B16(F10)-luc-GFP.

Uzyskane wyniki sugerują, że modulacja statusu oksydacyjnego przez HO-1 prowadzi do odróżnicowania komórek czerniaka, co może promować ich bardziej agresywny fenotyp.

[21]

Podoplanin expression by cancer-associated fibroblasts as an unfavorable marker of prognosis in invasive ductal breast carcinoma

Ekspresja podoplaniny w fibroblastach towarzyszących guzom jako niekorzystny czynnik prognostyczny w raku przewodowym gruczołu piersiowego

Bartosz Puła^{1,2}, Aleksandra Jethon¹, Aleksandra Piotrowska^{1,2}, Agnieszka Gomułkiewicz^{1,2}, Tomasz Owczarek³, Jacek Calik⁴, Andrzej Wojnar⁴, Wojciech Witkiewicz², Janusz Ryś⁵, Maciej Ugorski^{3,6}, Piotr Dzięgiel^{1,2,4,7}, Marzena Podhorska-Okołów^{1,2}

¹Department of Histology and Embryology, Medical University, Wrocław

²Regional Specialist Hospital, Research and Development Centre, Wrocław

³Department of Biochemistry, Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Environmental and Life Sciences, Wrocław

⁴Lower Silesian Oncology Center, Wrocław

⁵Department of Tumour Pathology, Centre of Oncology Maria Skłodowska-Curie Memorial Institute, Krakow

⁶Laboratory of Glycobiology and Cell Interactions, Ludwik Hirsfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, Wrocław

⁷Department of Histology and Embryology, Medical University, Poznan

Background: It has recently been shown that podoplanin, a mucin-type glycoprotein, is expressed by cancer cells and cancer-associated fibroblasts (CAFs) and promotes cancer cell migration and invasiveness.

Aim of the study: The aim of the study was to determine the role of podoplanin expression in tumour stroma of invasive ductal carcinoma of the breast (IDC).

Material and methods: Podoplanin expression was analyzed in 117 cases of IDC and 27 cases of diffuse cystic mastopathy, as well as breast cancer cell lines using IHC and real-time PCR.

Results: In 82.1% of analyzed tumors, podoplanin was found only in CAFs. Only 2 out of 117 IDC cases (1.7%) were characterized by expression of this glycoprotein in cancer cells. None of the 27 cases of diffuse cystic mastopathies or stroma surrounding normal ducts showed podoplanin expression. Podoplanin-positive CAFs correlated with tumour size ($p = 0.0125$), grade of malignancy ($p = 0.0058$), lymph node metastasis ($p = 0.0149$), LVI ($p = 0.0486$) and Ki-67 expression in cancer cells ($p = 0.0128$). Cases with high podoplanin expression (> 50% of positive stroma) in tumour stroma were significantly associated with negative estrogen status ($p = 0.0201$). Univariate analysis showed that podoplanin expression by CAFs was associated with patients poor outcome ($p = 0.0202$).

Conclusions: Our results suggest that podoplanin expression by CAFs could be an unfavorable marker of prognosis IDC.

Wstęp: Ostatnie badania wykazały, że podoplanina (D2-40), małocząsteczkowa glikoproteina typu mucyn, eskpre-

sjonowana jest przez komórki nowotworowe oraz fibroblasty towarzyszące guzom (CAF), zwiększając ich zdolności migracyjne i inwazyjne.

Cel pracy: Celem badań było określenie roli ekspresji podopłaniny w podścielisku raka przewodowego gruczołu piersiowego.

Materiały i metody: Ekspresja podopłaniny została przebadana w 117 przypadkach raka przewodowego gruczołu piersiowego oraz w 27 przypadkach mastopatii, jak również w nowotworowych liniach raka gruczołu piersiowego z użyciem metod immunohistochemicznych i reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (*real-time* PCR).

Wyniki: W 82,1% przypadków zaobserwowano ekspresję podopłaniny w CAF. Jedynie w 2 spośród 117 przypadków wykazano ekspresję podopłaniny w komórkach nowotworowych. Nie odnotowano ekspresji podopłaniny w podścielisku w żadnym przypadku 27 mastopatii oraz w podścielisku otaczającym prawidłowe komórki gruczołowe. Ekspresja podopłaniny w CAF korelowała pozytywnie z wielkością guza ($p = 0,0125$), stopniem złośliwości ($p = 0,0058$), obecnością przerzutów w węzłach chłonnych ($p = 0,0149$), obecnością zatorów komórek nowotworowych w naczyniach limfatycznych ($p = 0,0486$) i z ekspresją antygenu Ki-67 w komórkach nowotworowych ($p = 0,0128$). Przypadki z wysoką ekspresją podopłaniny w CAF (> 50% dodatniego podścieliska) związane były z brakiem ekspresji receptorów estrogenowych. Analiza jednoczynnikowa wykazała, że ekspresja podopłaniny w CAF była związana z gorszym przeżyciem pacjentów ($p = 0,0202$).

Wnioski: Uzyskane wyniki wskazują, że ekspresja podopłaniny w CAF może być niekorzystnym czynnikiem prognostycznym w raku gruczołu piersiowego.

[22]

Liposomes as carriers of anticancer drugs

Liposomy jako nośniki leków przeciwnowotworowych

Izabela Czopek, Agnieszka Kos, Maria Żądło, Sławomir Maślanka, Alicja Hałas, Natalia Młynarczyk, Wiesław W. Sułkowski

University of Silesia, Institute of Chemistry, Department of Environmental Chemistry and Technology, Katowice

Background: In Poland lung cancer belongs to a group of cancers with the worst prognosis. The possibility of recovery is primarily dependent on how disease is advanced at the time of diagnosis. The importance of liposomes in the treatment of cancer is connected with cytotoxicity of drugs. It is believed that liposomes are one of the best drug carriers. During the study, spectroscopy UV/VIS has been used. This scientific method allowed to determine the existence of competition in the incorporation of cytostatic drugs into liposomes.

Aim of the study: The goal of the study was research on embedding medicines drugs: etoposide and vinorelbine to liposomes. The research was to verify their competitiveness in embedding into liposomes in multimedicines therapy of lung cancer.

Material and methods: To receive liposomal membranes the following has been used: dipalmitoylphosphatidylcholine 99% (DPPC), buffer PBS, chloroform, dichloromethane, chloroform-d, dimethyl sulfoxide (DMSO), deuterium oxide (D_2O).

Liposomes were prepared using method of a dry film. The appropriate amount of phospholipids was dissolved in an organic solvent followed by evaporation of the solvent in a rotary evaporator. After evaporation solvent, a buffer at pH 7.4 was added and then shaken in a shaker to obtain a milky liquid.

The UV/VIS spectrum was performed on duo spectrometer in the range of 200 nm to 500 nm. In order to estimate the concentrations of drugs incorporated in liposomes several phased dialysis were carried out.

Results: The study on liposomes using UV-VIS method was performed in the temperature range of 298-320K. Based on the electronic spectra and Vin Eto it was concluded that while increasing the temperature the determined absorbance maxima (Eto λ max = 287 nm; Vin λ max = 268 nm) were not moved. The Eto concentration in liposomes DPPC/Eto/Vin was $1.667 \cdot 10^{-3}$ M, which equals to 45.96% of incorporation, while the concentration of DPPC in liposomes Vin/Eto/Vin was $2.897 \cdot 10^{-3}$ M, which is 73.00% of incorporation.

Conclusion: The dry film method allows to obtain the liposomes that are able to transport drugs: etoposide and vinorelbine. The application of UV-Vis spectroscopy allows to determine the existence of competition in the incorporation to liposomes of both drugs.

Wstęp: W Polsce rak płuc należy do grupy nowotworów o najgorszym rokowaniu. Możliwość wyleczenia jest przede wszystkim uzależniona od stopnia zaawansowania choroby w chwili jej rozpoznania. Duże znaczenie ma wykorzystanie liposomów w leczeniu chorób nowotworowych, co jest związane z dużą cytotoxycznością stosowanych leków. Uważa się, że liposomy są jednym z lepszych nośników leków przeciwnowotworowych.

W badaniach wykorzystano spektroskopię UV/VIS. Metoda badawcza pozwoliła na ustalenie występowania konkurencji we wbudowaniu się do liposomów leków cytostaticznych.

Cel pracy: Wbudowanie do liposomów leków: etopozidu i winorelbiny, oraz zbadanie kompetencji we wbudowywaniu się do liposomów tych leków, stosowanych łącznie w terapiach wielolekowych nowotworów płuc.

Materiał i metody: Do otrzymywania błon liposomalnych stosowano: dipalmitoylofosfatydocholiny 99% (DPPC), bufor PBS, chloroform, dichlorometan, chloroform-d, dimetylo-sulfotlenek (DMSO), tlenek deuteru (D_2O).

Liposomy przygotowano metodą suchego filmu. Odpowiednią ilość fosfolipidów rozpuszczono w rozpuszczalniku organicznym, następnie odparowano rozpuszczalnik w wyparce rotacyjnej. Po odparowaniu rozpuszczalnika dodano bufor o pH 7,4 i wytrząsano w wytrząsarce do uzyskania mlecznej zawiesiny.

Widma UV/VIS wykonano na spektrometrze dwuwiązkowym w zakresie od 200 nm do 500 nm. W celu oszacowania stężenia leków wbudowanych do liposomu przeprowadzono kilkuetapową dializę.

Wyniki: Badania liposomów metodą UV-VIS prowadzono w zakresie temperatury 298–320 K. Na podstawie uzyskanych widm elektronowych Eto i Vin stwierdzono, że wyznaczone maksima absorpcji (Eto λ_{\max} = 286 nm; Vin λ_{\max} = 268 nm) nie ulegają przesunięciom wraz ze wzrostem temperatury.

Stężenie Eto w liposomach DPPC/Eto/Vin wynosiło $1,667 \cdot 10^{-3}$ M, co stanowi 45,96% wbudowania, podczas gdy stężenie Vin w liposomach DPPC/Eto/Vin wynosiło $2,894 \cdot 10^{-3}$ M, co stanowi 73,00% wbudowania.

Wnioski: Metoda suchego filmu pozwala na otrzymanie liposomów zdolnych do transportu leków: etopozydu i winorelbiny. Zastosowanie spektroskopii UV/VIS pozwala na ustalenie występowania konkurencji we wbudowaniu się do liposomów obydwóch leków.

[23]

Combination of DNA vaccine against endoglin and cyclophosphamide effectively inhibit tumor growth

Kombinacja szczepionki DNA skierowanej przeciwko endoglinie i cyklofosfamidu skutecznie hamuje wzrost guzów nowotworowych

Magdalena Jarosz, Sylwia Malina, Tomasz Cichoń, Magdalena Głowska-Kosińska, Ryszard Smolarczyk, Stanisław Szala

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

Blood vasculature has an influence on tumor progression. Survival of neoplastic cells depends on the presence of tumor's own network of blood vessels. Immunotherapy directed against proteins specific for endothelial cells of tumor blood vessels can break tolerance to self-antigens and inhibit tumor growth.

In this study, we tested immune response against the endoglin (CD105), a protein highly specific for tumor endothelium. To improve therapeutic effect we combined this endoglin-based DNA vaccine with cyclophosphamide (CTX).

The recombinant pcDNA3.1(+)/mCD105 plasmid, was inserted into *Salmonella typhimurium* bacteria. The DNA vaccine was delivered orally to mice at weekly intervals. CTX was administered metronomically (every six days). T-lymphocyte levels in immunized mice were determined in spleens and tumors. Number of vessels in tumors was assessed by immunohistochemical staining. The obtained results were analyzed statistically using the Mann-Whitney U-test.

The tested DNA vaccine effectively induced immune response (CD4+, CD8+, NK) in the immunized mice. It inhibited growth of experimental tumors and lowered the number of B16-F10 metastases. In combination with CTX endoglin-based DNA vaccine appeared an effective at reducing microvessel density and the level of regulatory T-lymphocytes in tumors. Such combination therapy inhibited tumor growth more effectively than either treatment alone.

In conclusion: The endoglin-based DNA vaccine constructed by us inhibits the formation of tumor blood vasculature. The combination therapy with cyclophosphamide yielded more significant inhibition of tumor growth, reduction of tumor microvessel density and the level of regulatory T-lymphocytes. An antiangiogenic therapy combined with immunotherapy has proved to be an effective therapeutic tool.

Naczynia krwionośne mają istotny wpływ na progresję nowotworów. Wzrost i przeżycie komórek nowotworowych jest zależne od własnej sieci naczyń krwionośnych. Immunoterapia skierowana przeciwko białkom swoistym dla komórek śródbłonkowych naczyń nowotworowych łamie tolerancję przeciwko własnym antygenom i hamuje wzrost guzów nowotworowych.

Celem pracy było uzyskanie odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko naczyniom nowotworowym. W tym celu wykorzystano doustną szczepionkę DNA skierowaną przeciwko endoglinie (CD105), białku wysoce swoistemu dla komórek śródbłonkowych naczyń nowotworowych. Uzyskany efekt terapeutyczny wzmocniono za pomocą cyklofosfamidu (CTX).

Szczepionkę DNA skonstruowano z użyciem zrekombinowanego plazmidu pcDNA3.1(+)/mCD105 wprowadzonego do bakterii *Salmonella typhimurium*. Szczepionkę podawano doustnie w odstępach tygodniowych, natomiast cyklofosfamid w systemie metronomowym (co 6 dni). Poziom limfocytów T oznaczano w śledzionach, a także guzach myszy immunizowanych. Liczbę naczyń w guzach nowotworowych oznaczano immunohistochemicznie. Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono przy pomocy testu U Manna Whitneya.

Szczepionka DNA indukuje odpowiedź odpornościową u immunizowanych myszy (CD4+, CD8+, NK). Hamuje wzrost guzów oraz zmniejsza liczbę przerzutów czerniaka B16-F10. Szczepionka DNA w skojarzeniu z CTX zmniejsza liczbę naczyń krwionośnych i limfocytów T regulatorowych w guzach nowotworowych. Terapia skojarzona skuteczniej hamuje wzrost guzów niż każda z terapii z osobna.

Skonstruowana przez nas szczepionka DNA swoiście hamuje tworzenie naczyń nowotworowych. W kombinacji z cyklofosfamidem hamuje wzrost guzów nowotworowych, zmniejsza liczbę naczyń i limfocytów T_{reg}. Kombinacja strategii antyangiogennej z immunoterapią okazuje się skutecznym rozwiązaniem terapeutycznym.

[24]

The evaluation of the prognostic value of CYFRA 21-1 and IGF-1 in patients with advanced non-small cell lung cancer

Ocena wartości prognostycznej stężenia CYFRA 21-1 oraz IGF-1 u chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca w zaawansowanym stadium

Barbara Mastłyk¹, Regina Deja¹, Anna Drosik², Agata Gawryszuk³, Dorota Butkiewicz⁴, Monika Pietrowska⁴, Marzena Gawkowska-Suwińska⁵, Bożena Jochymek³, Katarzyna Galwas-Kliber⁶, Sławomir Blamek³, Piotr Widłak⁴, Rafał Suwiński⁶

¹Department of Analytics and Clinical Biochemistry, Memorial Cancer Center and Institute of Oncology, Gliwice Branch

²Clinical Oncology Clinic, Memorial Cancer Center and Institute of Oncology, Gliwice Branch

³Radiotherapy Department, Memorial Cancer Center and Institute of Oncology, Gliwice Branch

⁴Center for Translational Research and Molecular Biology of Cancer, Memorial Cancer Center and Institute of Oncology, Gliwice Branch

⁵III Radiotherapy Clinic, Memorial Cancer Center and Institute of Oncology, Gliwice Branch

⁶II Radiotherapy Clinic, Memorial Cancer Center and Institute of Oncology, Gliwice Branch

Background: Lung cancer is diagnosed in the advanced III-IV clinical stage in a significant percentage of patients. The patients in this stage are an extremely heterogeneous group. Their treatment outcome can be determined by number of prognostic factors. CYFRA 21-1 and IGF-1 have been reported to have the prognostic value in these patients. CYFRA 21-1, cytokeratin-19 fragment, is a component of the cytoskeleton of epithelial cells showing overexpression in epithelial cells of non-small cell lung cancer (NSCLC). IGF family proteins are involved in regulation of cell growth and their differentiation, and they are associated with the hypoxia and angiogenesis.

Aim of the study: Aim of the study was to evaluate the prognostic value of CYFRA 21-1 and IGF-1 markers in patients with advanced NSCLC.

Material and methods: The study group included patients treated at the Institute of Oncology due to advanced (III-IV) NSCLC. The serum levels of the markers were measured before treatment – level of IGF-1 (174 patients) by ELISA (DRG Instruments), CYFRA 21-1 (58 patients) by ECLIA method (Roche Diagnostics). The survival curves were calculated using the Kaplan-Meier method. The influence of the markers on overall survival was analyzed by a Cox model, with the median value as a cut-off point for comparison.

Results: In the analyzed group the serum levels of CYFRA 21-1 were within the range of 0.6-30.3 ng/ml (median 2.49 ng/ml), the IGF-1 levels were within the range of 31.3-309.2 ng/ml (median 96.2 ng/ml).

We observed a statistically significant unfavorable influence of a high initial serum level of CYFRA 21-1 on patients survival ($p < 0.01$). Patients in whom the pre-treatment levels of CYFRA 21-1 were < 2.49 ng/ml showed 70% of survival rate after 1 year of follow-up, when in patients with levels

above this value the survival rate was 43%. We did not observe a significant effect of the IGF-1 levels on patients survival ($p = 0.43$).

Conclusions: Our data show that, additionally to classical prognostic factors, the measurements of CYFRA 21-1 serum levels before treatment provide a valuable information in advanced NSCLC prognosis.

Wstęp: Rak płuca rozpoznawany jest w III-IV stopniu zaawansowania klinicznego u znacznego odsetka chorych. Chorzy w tym stadium stanowią wyjątkowo zróżnicowaną grupę, a rokowanie w indywidualnych przypadkach pozwalają sprecyzować tzw. czynniki prognostyczne. CYFRA 21-1 oraz IGF-1 wskazywane są w piśmiennictwie jako potencjalne czynniki rokownicze. CYFRA 21-1, fragment cytokeratyny 19, stanowi składnik cytoszkieletu komórek nabłonkowych, o wzmożonej ekspresji w komórkach nabłonkowych niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP). Białka rodziny IGF biorą udział w regulacji wzrostu i różnicowania komórek, związane są z procesami hipoksji i angiogenezy.

Cel pracy: Ocena wartości prognostycznej CYFRA 21-1 oraz IGF-1 u chorych na NDRP w zaawansowanym stadium.

Materiał i metody: Badaniem objęto grupę chorych leczonych w Instytucie Onkologii z powodu zaawansowanego (III-IV stopień), nieoperacyjnego NDRP. Stężenie markerów oznaczono w surowicy chorych przed rozpoczęciem leczenia, IGF-1 (174 chorych) metodą ELISA (DRG Instruments), CYFRA 21-1 (58 chorych) metodą ECLIA (Roche Diagnostics). Krzywe przeżycia wyznaczono metodą Kaplana-Meiera. Wpływ stężenia markerów na przeżycie całkowite analizowano metodą Coxa, przyjmując za punkt odcięcia ich medianę.

Wyniki: Stężenie CYFRA 21-1 w analizowanej grupie mieściło się w zakresie 0,6–30,3 ng/ml (mediana 2,49 ng/ml), stężenie IGF-1 w zakresie 31,3–309,2 ng/ml (mediana 96,2 ng/ml).

Wykazano istotny statystycznie niekorzystny wpływ dużego wyjściowego stężenia CYFRA 21-1 w surowicy na przeżycie chorych ($p < 0,01$) oraz brak takiego wpływu w przypadku IGF-1 ($p = 0,43$). U chorych, u których przed rozpoczęciem leczenia stężenie CYFRA 21-1 było $< 2,49$ ng/ml, przeżycie chorych po 1 roku obserwacji osiągało 70%, natomiast przy stężeniu powyżej tej wartości 43%.

Wnioski: Wartość stężenia CYFRA 21-1 u chorych przed rozpoczęciem leczenia dostarcza dodatkowych, obok klasycznych czynników prognostycznych, wartościowych informacji dotyczących rokowania u chorych na NDRP w zaawansowanym stadium.

[25]

Liposomes application for transport vanadium (IV) complexes in antitumor therapy

Zastosowanie liposomów do transportu związków wanadu (IV) w terapii antynowotworowej

Alicja Hałas, Izabela Czopek, Danuta Pentak, Agnieszka Kos, S. Maślanka, Natalia Młynarczyk, Wiesław W. Sułkowski

University of Silesia, Institute of Chemistry, Department of Environmental Chemistry and Technology, Katowice

Background

In addition to vanadium complexes effect on growth, development and differentiation of certain species and antidiabetic activity, vanadium derivatives may also affect cells and induce apoptosis, proliferation or neoplastic transformation. The activity depends on the model of experiments and their conditions. Vanadium compounds may exert a promoting or inhibitory effect as pro- or anticarcinogenic factors. i.e. induce growth or inhibit viability and proliferation of neoplastic cells, but also normal cells. Therefore, it is appropriate incorporation of vanadium compounds to the membranes of liposomes – providing targeted media transport active substances. The main advantages of liposomes are: a gradual release of active substances, protection of sensitive tissues and organs from high concentrations of the drug supply and selective reduction or elimination of side effects of the drug. It has been demonstrated that $\text{VO}(\text{acac})_2$ and $\text{VO}(\text{mal})_2$ are superior to vanadate in their high activity and extremely low toxicity [1]. The interaction of vanadium with phospholipids of the plasma membrane might have important consequences for the functional properties of the cells [2]. Due to the amphiphilic nature of these complexes interact with the lipid phase is related to their transition to the membranes. There are several methods of determining the partition coefficient between the membrane of medicinal substances and the environment outside the membrane (buffer). Lipophilicity of therapeutic substances is often described by the partition coefficient P ($\log P$). Studies on the distribution coefficient of complexes of vanadium (IV) between the liposome membrane, and were preceded by a buffer partition coefficient measurements in the system octanol/buffer. The partition coefficient of the drug substance between two immiscible with each phase is given by the ratio of concentrations in these phases [3]. The concentration of complexes of vanadium (IV) in aqueous phase (buffer) was determined by EPR. On the spectra of complexes of vanadium (IV) is visible eight resonances, which is associated with the impact of a single electron with spin DXY nuclear vanadium (IV) $I = 7/2$. Linear dependence of the amplitude of the fourth line of the EPR spectra of aqueous solutions of complexes of vanadium (IV) on the concentration allows the determination of concentration curves. Based on the equation of the curves and the amplitude of EPR spectra of the complex can determine the concentration of vanadium (IV) in the sample. Application of spin CTPO tag enables the detection of low-

er concentrations of the complex of vanadium (IV) [4]. Tag CTPO spin was previously used for measuring the concentration of oxygen and transition metal ions $\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$, $\text{Cu} - \text{EDTA}$, $\text{Ni}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ $\text{Ni} - \text{EDTA}$. The paper uses a large multi-layered liposomes of egg yolk phosphatidylcholine EYPC which closed vanadium complex $\text{VO}(\text{acac})_2$. If it is possible to put a spin label in restricted domains such as a membrane, its bimolecular collision frequency with other paramagnetic in this specific environment can be recorded. In the T_1 -sensitive methodology applied to lipid bilayer membranes using a saturation recovery EPR technique [5]. During bimolecular collisions of the nitroxide fragment with transition metal ions the dominant magnetic interaction is Heisenberg exchange. As a result, T_1 of the nitroxide is shortened. The transport parameter $2P(x)$ used for the oxygen transport. Profiles of the transport parameter across the membrane allow one to understand the movement within the lipid bilayer membranes and calculate the permeability coefficient across model and biological membranes [6].

Aim of the study

The objective of the work was application of spin labels to measure the membrane transport of a vanadium (IV) complexes and the interaction with the multilamellar vesicles prepared from egg yolk phosphatidylcholine (EYPC).

Experimental

Chemicals

Spin labels CTPO, 12-SASL, lipids EYPC were purchased from Sigma Aldrich, acetylacetonate vanadium (IV) complex complex, organic solvents: n-octanol pure for analysis (99%), CH_2Cl_2 with high purity analytical grade reagent were purchased from POCH. All other chemicals were of analytical grade and all solutions were prepared in the double-distilled de-ionized water. Solutions of vanadium complex in phosphate buffer (pH = 7.4) were prepared just before used.

Preparation of EYPC liposomes multilayer thin film hydration technique lipid

Quartz tubes were placed in 140 μl of EYPC lipid solution in chloroform at a concentration of 50 mg/ml. Lipid solutions were dried with nitrogen first and then in a desiccator for 12 hours. For the dried lipid was added 250 ml of solution of vanadium complex of the 0.002 M in borate buffer. The resulting mixture was shaken at a temperature above the phase transition temperature ($T = 22^\circ\text{C}$). Then, in order to thicken the centrifuge centrifuged for 15 minutes (7000 rpm) at about 4°C . Lipid precipitate was filtered through filter paper with pore diameter 400 nm. The precipitate obtained from the lipids and the filtrate was collected into quartz capillary samples for EPR measurements.

Preparation of EYPC liposomes with built-in spin label 12-SASL

Done EYPC lipid chloroform solution with a concentration of 50 mg/ml. To 140 ml chloroform solution of EYPC was added 5 ml chloroform solution of the marker 12-SASL with a concentration of 0.001 M (1 mol% relative to total lipid). Lipid solution was dried with a marker first stream of nitrogen, and then in a desiccators for 12 hours. For the dried

lipid was added 250 ml of solution of the complex of vanadium (IV) with acetylacetone at a concentration of 0.001 M (mixture 1) and 0.0005 M (mixture 2) in borate buffer or 250 ml borate buffer (mixture 3). The resulting mixture was shaken at a temperature above the phase transition temperature ($T = 22^{\circ}\text{C}$), in order to thicken the centrifuge centrifuged for 15 minutes (7000 rpm) at about 4°C . Samples for EPR measurements were collected in quartz capillaries of the residual multi-EYPC liposomes deoxygenated stream of nitrogen for 5 minutes. Measurements were performed at constant temperature, in closed capillaries. Registered spectrum center line marker for increasing microwave power supplied on the sample (0.26 mW to 200 mW).

Demonstration of acetylacetonate vanadium(IV) in EYPC membranes from measurements of saturation curves of EPR signal flag 12-SASL power microwave

In order to determine the EPR signal saturation curve tracer 12-SASL microwave power, the center line of the spectrum recorded this tag for increasing microwave power given to the sample. Measurements were performed in sealed quartz kapilarkach. For the measurements used samples of mixtures with different concentrations of the complex of vanadium (IV): a mixture of 1 – 0.001 M $\text{VO}(\text{acac})_2$, a mixture of 2 – 0.0005 M $\text{VO}(\text{acac})_2$, a mixture of 3 – without the complex $\text{VO}(\text{acac})_2$.

Determination of the partition coefficient between the acetylacetonate vanadium(IV) EYPC membrane and the aqueous phase outside the membrane

For 30 ml of chloroform solution of EYPC lipid whose concentration was: 50 mg/ml. Chloroform solution of EYPC lipid was placed in quartz tubes after six 5ml each. Lipid solution was dried in test tubes with nitrogen and then in a desiccator for 12 hours. For each tube of dried lipid precipitate was added 250 ml of solution of vanadium complex $\text{VO}(\text{acac})_2$ 0,002 M in borate buffer to two test tubes with sediment hydrated lipids with a solution of the complex of vanadium (IV) added 250 ml of sodium sulphate (IV) sodium borate buffer. Mixture in each tube was shaken temperature 22°C to thicken, the centrifuge centrifuged for 15 minutes (7000 rpm) at about 4°C . Lipid precipitate was filtered through filter paper. To the precipitate was added 200 ml of lipid solution CTPO marker in borate buffer at a concentration of 0.0001 M. The filtrate and sediment samples were collected for lipid measurements of the EPR.

Results

EPR spectra of the vanadyl complexes in solution gave eight-line hyperfine splitting patterns due to an unpaired electron of the ^{51}V nucleus ($I = 7/2$), supporting the presence of mononuclear vanadyl species in each complex. Hyperfine splitting constants (A_0) spectra of complexes are, respectively 98.438 for $\text{VO}(\text{acac})_2$ and 104.690 for $\text{VO}(\text{mal})_2$. Spectral line width is constant for all concentrations and amounts $\Delta B = 10,71$ mm for $\text{VO}(\text{acac})_2$ and 14mm for $\text{VO}(\text{mal})_2$. On the set of calibration curves can be seen that the ERP signal amplitude is proportional to the concentra-

tion of the complex [$r = 0.992 \text{VO}(\text{mal})_2$ 0.999 $\text{VO}(\text{acac})_2$]. Knowing its value can estimate the approximate concentration of the corresponding compound of vanadium in solution. Recorded EPR spectrum of the central line of the spin marker in borate buffer CTPO without vanadium (IV) and various concentrations of the complex of vanadium (IV), $\text{VO}(\text{acac})_2$ [0.00008 M – 0.0008 M] and $\text{VO}(\text{mal})_2$ [0.00008 M – 0.001 M]. It was shown that the method of indirect determination of the concentration of ions in the complex wanadylowych based on an analysis of the spectrum of spin CTPO marker is more sensitive and is capable of measuring small concentrations of vanadium complex than the direct method. It was shown that the compounds of vanadium (IV) pass from the aquatic environment of the octanol. The value of the partition coefficient depends on temperature. On the basis of changes in the nature of saturation curves of the power of the microwave signal ERP marker 12 – SASL under the influence of the complex $\text{VO}(\text{acac})_2$, showed the presence of vanadium in the middle of the film. It was observed that the interaction between the complex of vanadium (IV) and a flag can be redox chemical reaction. Vanadium complex with acetylacetone builds in EYPC lipid hydrocarbon chain complex $\text{VO}(\text{acac})_2$ in the settlement is in the lipid membranes of liposomes, multi-layer inside the membrane (73%) or at the surface membrane in the aqueous phase (37%).

References

1. Yang X, Wang K, Lu J, Crans DC. Membrane transport of vanadium compounds and the interaction with the erythrocyte membrane. *Coordination Chemistry Reviews* 2003; 237: 103-11.
2. Kotchevar AT, Ghosh P, Uckun FM. Interactions of vanadocene(IV)-chelated complexes with artificial membranes. *J Phys Chem* 1998; 102: 10925-30.
3. Bahadur PN, Wan-Ying Shiu, Boocock DGB, Mackay D. Temperature dependence of octanol-water partition coefficient for selected chlorobenzenes. *J Chem Eng Data* 1997; 42: 685-8.
4. Subczyński WK, Swartz H. EPR Oximetry in Biological and Model Samples. 2005; .
5. Garribba E, Micera G, Sanna D. *Inorg Chim Acta* 2006; 359: 4470-6.
6. Subczyński WK, Hyde JS, Kusumi A. *Biophys* 1989; 86: 4474-8.

Wstęp

Pochodne wanadu prócz oddziaływania na wzrost, rozwój i różnicowanie niektórych gatunków oraz posiadania własności przeciwcukrzycowych mogą również wpływać na komórki i indukować ich apoptozę, proliferację czy transformację nowotworową. Działanie to zależy od modelu doświadczenia oraz jego warunków. Związki wanadu mogą działać promująco lub hamująco jako czynniki pro- lub antynowotworowe, tj. wywoływać wzrost lub hamować przeżywalność i proliferację komórek geoplastycznych. Działają na komórki zwierzęce i ludzkie, wpływając jednak nie tylko na komórki nowotworowe, lecz także prawidłowe. Dlatego celowe jest wbudowanie związków wanadu do błon liposomów – nośników zapewniających ukierunkowany transport substancji aktywnych. Głównymi zaletami liposomów są: stopniowe uwalnianie substancji aktywnych, ochrona wrażliwych tkanek oraz narządów przed dużymi stężeniami leku, selektywna podaż oraz zmniejszenie lub eliminacja efektów ubocznych działania leku. Z literatury wiadomo, że kompleks wanadu (IV) z acetyloacetone $\text{VO}(\text{acac})_2$

oraz kompleks wanadu (IV) z maltolem $\text{VO}(\text{mal})_2$ wyróżniają się spośród wielu związków wanadu wysoką aktywnością farmakologiczną i jednocześnie niską toksycznością [1]. Ze względu na amfifilowy charakter tych kompleksów ich oddziaływanie z fazą lipidową wiąże się z ich przechodzeniem do błon [2]. Znanych jest kilka metod wyznaczania współczynnika podziału substancji leczniczych między błonę i środowisko na zewnątrz błony (bufor). Lipofilowość substancji leczniczych opisywana jest często przez współczynnik podziału P ($\log P$). Badania nad współczynnikiem podziału kompleksów wanadu (IV) między błonę liposomu oraz bufor poprzedzono pomiarami współczynnika podziału w układzie oktanol/bufor. Współczynnik podziału substancji leczniczej między dwie niemieszające się ze sobą fazy dany jest przez iloraz stężeń substancji w tych fazach [3]. Stężenie kompleksów wanadu (IV) w fazie wodnej (bufor) wyznaczono metodą EPR. Na widmach kompleksów wanadu (IV) widocznych jest 8 linii rezonansowych, co wiąże się z oddziaływaniem pojedynczego elektronu d_{xy} ze spinem jądrowym wanadu (IV) $I = 7/2$. Liniowa zależność amplitudy czwartej linii widma EPR wodnych roztworów kompleksów wanadu (IV) od stężenia pozwala na wyznaczenie krzywych stężeniowych. Na podstawie równań krzywych oraz wartości amplitudy widma EPR można wyznaczyć stężenie kompleksu wanadu (IV) w próbce. Zastosowanie znacznika spinowego CTPO umożliwia detekcję mniejszych stężeń kompleksu wanadu (IV). Znacznik spinowy CTPO był wcześniej stosowany do pomiarów stężenia tlenu oraz dla jonów metali przejściowych $\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$, $\text{Cu} - \text{EDTA}$, $\text{Ni}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$ $\text{Ni} - \text{EDTA}$ [4]. W pracy zastosowano liposomy wielowarstwowe duże z fosfatydylocholinoi żółtka jaja kurzego EYPC, w których zamykano kompleks wanadu $\text{VO}(\text{acac})_2$. W celu wykazania obecności kompleksu w błonach liposomów EYPC zastosowano metodę ciągłego nasycania sygnału EPR znacznika spinowego 12-SASL mocą mikrofal. Z piśmiennictwa wiadomo, że prowadzono badania, w których stosowano jako znacznik spinowy kwas stearynowy z przyłączonym wolnym rodnikiem nitroksylowym w różnych pozycjach wzdłuż alkilowego łańcucha w celu zbadania penetracji jonów metali $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ i Ni^{2+} do błon fosfatydylocholinowych [5]. Podczas dwucząsteczkowych zderzeń pomiędzy paramagnetycznymi jonami metali (krótki czas relaksacji spinowo-spinowej) ze znacznikami spinowymi (długi czas relaksacji spinowo-spinowej) czas relaksacji znacznika spinowego T_1 ulega skróceniu. Różnica w wielkości czasu relaksacji znacznika w obecności oraz pod nieobecność jonów metali określa dostępność jonów dla grup nitroksylowych znacznika w błonie [6].

Cel pracy

Ilościowe zamykanie kompleksów wanadu (IV) w liposomach wielowarstwowych EYPC.

Materiał i metody

Do badań zastosowano: znaczniki spinowe CTPO, 12-SASL, lipidy EYPC (Sigma Aldrich), kompleksy wanadu (IV): kompleks wanadu (IV) z acetyloacetone, kompleks wanadu (IV) z maltolem, rozpuszczalniki organiczne: n-oktanol czysty do analizy (99%), chloroform o wysokiej czystości (POCH), bufor boranowy o $\text{pH} = 7,4$ (odpowiada pH osocza

krwi) przygotowany w wodzie podwójnie destylowanej bezpośrednio przed użyciem.

Preparatyka liposomów wielowarstwowych EYPC techniką hydratacji cienkiego filmu lipidowego

W próbkach kwarcowych umieszczono 140 μl roztworu lipidu EYPC w chloroformie o stężeniu 50 mg/ml. Roztwory lipidów suszono najpierw strumieniem azotu, a następnie w eksykatorze przez 12 godz. Do wysuszonych lipidów dodano 250 μl roztworu kompleksu wanadu o stężeniu 0,002 M w buforze boranowym. Otrzymane mieszaniny wytrząsano w temperaturze powyżej temperatury przejścia fazowego ($T = 22^\circ\text{C}$). Następnie w celu zagęszczenia wirowano na wirówce przez 15 min (7000 obrotów/minutę) w temperaturze ok. 4°C . Osad lipidów przesączono przez sączek z bibuły filtracyjnej o średnicy porów 400 nm. Z uzyskanego osadu lipidów oraz z przesączu pobierano do kapilar kwarcowych próbki do pomiarów EPR.

Preparatyka liposomów wielowarstwowych EYPC z wbudowanym znacznikiem 12-SASL

Sporządzono chloroformowy roztwór lipidu EYPC o stężeniu 50 mg/ml. Do 140 μl chloroformowego roztworu EYPC dodano 5 μl chloroformowego roztworu znacznika 12 – SASL o stężeniu 0,001 M (1% mol w stosunku do całości lipidów). Roztwór lipidów ze znacznikiem suszono najpierw strumieniem azotu, a następnie w eksykatorze przez 12 godz. Do wysuszonych lipidów dodano 250 μl roztworu kompleksu wanadu (IV) z acetyloacetone o stężeniu 0,001M (mieszanina 1.) oraz 0,0005 M (mieszanina 2.) w buforze boranowym lub 250 μl buforu boranowego (mieszanina 3.). Otrzymane mieszaniny wytrząsano w temperaturze powyżej temperatury przejścia fazowego ($T = 22^\circ\text{C}$), w celu zagęszczenia wirowano na wirówce przez 15 min (7000 obrotów/minutę) w temperaturze ok. 4°C . Probki do pomiarów EPR pobierano do kapilar kwarcowych z osadu liposomów wielowarstwowych EYPC odtlenowanych strumieniem azotu przez 5 min. Pomiary prowadzono w stałej temperaturze, w zamkniętych kapilarach. Zarejestrowano widma centralnej linii znacznika dla wzrastających mocy mikrofal podawanych na próbkę (0,26 mW ÷ 200 mW).

Wyznaczenie krzywych stężeniowych dla próbek wodnych kompleksów wanadu (IV)

Widma EPR wodnych roztworów kompleksów wanadu (IV) są izotropowe. Mierząc amplitudę czwartej linii widma wodnych próbek kompleksu o znanych stężeniach w przypadku braku jej poszerzenia można wykreślić krzywe stężeniowe [zależność amplitudy (mm) od stężenia kompleksu (M)]. Równania krzywych pozwalają ustalić stężenie próbek kompleksu wanadu (IV) na podstawie pomiaru amplitudy. Roztwory kompleksów wanadu (IV) przygotowano przez rozpuszczenie stałych substancji w buforze boranowym, odpowiednio $\text{VO}(\text{acac})_2$ [66,20 mg] i $\text{VO}(\text{mal})_2$ [127,85 mg]. Zmierzono amplitudę czwartej linii widma EPR dla stężeń odpowiedniego kompleksu wanadu (IV): $\text{VO}(\text{acac})_2$ (0,0002–0,005 M) i $\text{VO}(\text{mal})_2$ (0,0007–0,005 M). Jony wandytowe wpływają na widmo znacznika spinowego CTPO, powodując zanik struktury nadsubtelnej widma EPR znacz-

nika. Można wykreślić zależność parametru α wyznaczonego na podstawie analizy widma EPR znacznika od stężenia kompleksu wanadu (IV). Znacznik spinowy CTPO o stężeniu 0,0001 M dodano do roztworów kompleksów wanadu (IV) w stosunku objętościowym CTPO do kompleksu 1 : 1. Zarejestrowano widma EPR znacznika spinowego CTPO dla różnych stężeń kompleksów wanadu (IV) VO(acac)₂ (0,00008–0,0008 M) i VO(mal)₂ (0,00008–0,001 M). Z tak otrzymanych roztworów pobrano po 0,1 ml próbek do próbek. Każdą z próbek odtleniono 5 min strumieniem azotu, aby uniknąć wpływu tlenu na widmo znacznika, a następnie umieszczono w zamkniętej kapilarce. Na podstawie równania

$$\alpha = \frac{b + c}{2a}$$

obliczono wartość parametru α w zależności od stężenia kompleksu wanadu (IV) w badanej próbce.

Wykazanie obecności acetyloacetonianu wanadylu w błonie EYPC na podstawie pomiarów krzywych nasycenia sygnału EPR znacznika 12-SASL mocą mikrofal

W celu wyznaczenia krzywych nasycenia sygnału EPR znacznika 12-SASL mocą mikrofal zarejestrowano widma centralnej linii tego znacznika dla wzrastających mocy mikrofal podawanych na próbkę. Pomiarów wykonano w zamkniętych kapilarkach kwarcowych. Do pomiarów wykorzystano próbki pobierane z mieszanin o różnym stężeniu kompleksu wanadu (IV): mieszanina 1. – 0,001 M VO(acac)₂, mieszanina 2. – 0,0005 M VO(acac)₂, mieszanina 3. – bez kompleksu VO(acac)₂.

Wyznaczenie współczynnika podziału acetyloacetonianu wanadylu między błonę EYPC oraz fazę wodną na zewnątrz błony

Sporządzono 30 ml chloroformowego roztwór lipidu EYPC, którego stężenie wynosiło: 50 mg/ml. Chloroformowy roztwór lipidu EYPC umieszczono w 6 probówkach kwarcowych po 5 ml w każdej. Roztwór lipidów suszono w probówkach strumieniem azotu, a następnie w eksykatorze przez 12 godz. Do każdej z próbek z wysuszonym osadem lipidów dodano 250 μ l roztworu kompleksu wanadu VO(acac)₂ o stężeniu 0,002 M w buforze boranowym. Do dwóch próbek z uwodnionym osadem lipidów z roztworem kompleksu wanadu (IV) dodano 250 μ l roztworu siarczuanu (IV) sodu w buforze boranowym. Mieszaniny we wszystkich probówkach wytrząsano w temperaturze 22°C, w celu zagęszczenia odwirowano na wirówce przez 15 min (7000 obrotów/minutę) w temperaturze ok. 4°C. Osad lipidów przesączono przez sączek z bibuty filtracyjnej. Do osadu lipidów dodano 200 μ l roztworu znacznika CTPO w buforze boranowym o stężeniu 0,0001 M. Z przesączu oraz z osadu lipidów pobierano próbki do pomiarów EPR.

Wyniki

Związki wanadu na czwartym stopniu utlenienia są substancjami paramagnetycznymi. Widma EPR ich roztworów wodnych składają się z ośmiu linii rezonansowych. Obserwowane linie są wynikiem oddziaływań jądra ⁵¹V o spinie 7/2 z pojedynczym, niesparowanym elektronem wanadu.

Stałe rozszczepienia nadsubtelnego (A0) wynoszą odpowiednio 98,438 dla VO(acac)₂ i 104,690 dla VO(mal)₂. Szerokość linii widma jest stała dla wszystkich stężeń i wynosi $\Delta B = 10,71$ mm dla VO(acac)₂ i 14 mm dla VO(mal)₂. Zarejestrowano widma EPR kompleksów wanadu (IV) o znanym stężeniu oraz zmierzono amplitudę czwartej linii widma. Amplituda sygnału EPR próbek kompleksu wanadu (IV) zarejestrowanych w buforze boranowym jest wprost proporcjonalna do stężenia wanadu (IV) w próbce [$R = 0,992$ VO(mal)₂, $R = 0,999$ VO(acac)₂]. Na podstawie wyznaczonych równań krzywych oraz amplitudy sygnału EPR można wyznaczyć stężenia kompleksu wanadu (IV) w próbkach.

Zarejestrowano widmo EPR centralnej linii znacznika spinowego CTPO w buforze boranowym bez wanadu (IV) oraz dla różnych stężeń kompleksu wanadu (IV) VO(acac)₂ (0,00008–0,0008 M) i VO(mal)₂ (0,00008–0,001 M). Wykazano, że metoda pośrednia wyznaczania stężenia jonów wanadylowych w kompleksie na podstawie analizy widma znacznika spinowego CTPO jest bardziej czuła i pozwala na pomiar mniejszych stężeń kompleksu wanadu niż metoda bezpośrednia. Wykazano, że związki wanadu (IV) przechodzą ze środowiska wodnego do oktanolu. Wartość współczynnika podziału zależy od temperatury. Na podstawie zmian w charakterze krzywych nasycenia sygnału ERP mocą mikrofal znacznika 12 – SASL pod wpływem kompleksu VO(acac)₂ wykazano obecność wanadu w środku błony. Zaobserwowano, że oddziaływanie między kompleksem wanadu (IV) i znacznikiem może być reakcją chemiczną typu redoks. Kompleks wanadu z acetyloacetonem wbudowuje się w łańcuch węglowodorowy lipidu EYPC. Kompleks VO(acac)₂ w osadzie lipidów znajduje się w błonach liposomów wielowarstwowych, wewnątrz błony (73%) lub przy powierzchni błony w fazie wodnej (37%).

Piśmiennictwo

1. Yang X, Wang K, Lu J, Crans DC. Membrane transport of vanadium compounds and the interaction with the erythrocyte membrane. *Coordination Chemistry Reviews* 2003; 237: 103-11.
2. Kotchevar AT, Ghosh P, Uckun FM. Interactions of vanadocene(IV)-chelated complexes with artificial membranes. *J Phys Chem* 1998; 102: 10925-30.
3. Bahadur PN, Wan-Ying Shiu, Boocock DGB, Mackay D. Temperature dependence of octanol-water partition coefficient for selected chlorobenzenes. *J Chem Eng Data* 1997; 42: 685-8.
4. Subczyński WK, Swartz H. EPR Oximetry in Biological and Model Samples. 2005; .
5. Garribba E, Micera G, Sanna D. *Inorg Chim Acta* 2006; 359: 4470-6.
6. Subczyński WK, Hyde JS, Kusumi A. *Biophys* 1989; 86: 4474-8.

[26]

Nanoparticles for diagnosis and systems of drug delivery in contemporary oncology

Nanocząstki do diagnostyki i systemów dostarczania leków we współczesnej onkologii

Maciej Jarzębski¹, Tomasz Śliwa, Tobiasz Deptuła

¹Międzyuczelniane Centrum NanoBioMedyczne w Poznaniu, Wydział Fizyki Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Development of interdisciplinary science of nanotechnology carries a great promise for the development of a new effective drug delivery systems in oncology. In a designing process of new effective drugs it is very important to create not only therapeutic agent but also the carrier.

The purpose of this study is to show the latest applications of the new pharmaceutical substances for drug delivery systems which would meet quality requirements for high selectivity, direct delivery to the destination, low side effects and no interactions with other drugs.

Delivering drugs to their destination is a huge challenge. For several years, intensive research had lead to a development of new polymeric materials that could carry therapeutic substance under certain conditions (pH, temperature) and release the drug at a well defined destination. Despite a partial solution to this problem, there is also a system of "guidance" to the drug destination. One of the promising material is iron oxide Fe_3O_4 exhibiting magnetic properties.

In this paper we present an overview of the recently investigated substances for targeted drug delivery which could be used as carriers of therapeutic substances i.e. in tumor treatment. The new type of complex had been described: the drug - polymer (carrier) - magnetic molecules (guide molecule).

Rozwój interdyscyplinarnej nauki, jaką jest nanotechnologia, niesie ze sobą duże nadzieje na opracowanie nowych skutecznych metod walki z chorobami onkologicznymi. Przy projektowaniu nowych skutecznych leków istotnym czynnikiem jest nie tylko substancja terapeutyczna, lecz także nośnik.

Celem niniejszej pracy jest wskazanie najnowszych obszarów, w których poszukuje się nowych substancji, mogących sprostać wysokim kryterium, jakie musi spełniać farmaceutyk, przed wprowadzeniem do powszechnego lub eksperymentalnego użytku *in vivo*.

Wymagania stawiane systemom celowego dostarczania leków (*targeted drug delivery system*), to wysoka selektywność, działanie w miejscu przeznaczenia, brak (znikome) efekty uboczne oraz brak interakcji z innymi lekami. Ogromne wyzwanie stanowi sam proces dostarczania leków w miejsce przeznaczenia. Od szeregu lat trwają intensywne badania mające na celu opracowanie nowych materiałów polimerowych, które mogłyby łączyć ze sobą substancję terapeutyczną, a w określonych warunkach (zmiana pH, temperatury) uwolnić lek. Pomimo częściowego rozwiązania tego problemu, istotny jest system „naprowadza-

nia” terapeutyka do miejsca przeznaczenia. Obiecującym materiałem jest m.in. tlenek żelaza Fe_3O_4 wykazujący właściwości magnetyczne.

W pracy przedstawiono przegląd najczęściej badanych związków chemicznych, możliwych do zastosowania jako nośniki substancji terapeutycznej, m.in. w chorobach nowotworowych. Pokazano również koncepcje tworzenia struktur bardziej złożonych: lek – polimer (nośnik) – molekula magnetyczna (cząstka naprowadzająca).

[27]

Photodynamic reaction in combination with electroporation in human melanoma cells *in vitro*

*Reakcja fotodynamiczna w połączeniu z elektroporacją na ludzkich komórkach czerniaka *in vitro**

Nina Skołucka¹, Anna Choromańska¹, Jolanta Saczko¹, Julita Kulbacka¹, Agnieszka Chwilkowska¹, Małgorzata Drąg-Zalesińska², Teresa Wysocka²

¹Wrocław Medical University, Department of Medical Biochemistry, Wrocław

²Wrocław Medical University, Department of Histology and Embryology, Wrocław

Background: The photodynamic therapy (PDT) is the method of selective tumor treatment, which uses the photosensitive dye and the suitable wavelength of light. Photosensitizer accumulation is dependent on the type of malignant cells, physical and chemical properties of the dye. It localizes in the plasma or subcellular membranes, making these structures especially sensitive to the photooxidative damage.

Objective: The application of electroporation on the cell membrane in combination with cytotoxic drugs could increase their transport into cells. The application of electroporation with drugs with inhibited transport is known as electrochemotherapy (ECT). Electrochemotherapy and PDT are low- invasive and targeted methods. Proper therapy conditions could limit necessity of surgical interventions, as well as give the better prognoses in treatment the tumors.

Material and methods: The current study examined an effect of combining both methods applied *in vitro*. Photodynamic reaction enhanced by electroporation was tested on the human melanoma cells (MEWO). The electroporation parameters were: 1000 V/cm, 100 ms by 8 impulses for every cases. As electrodes we used thin stainless-steel parallel plates, 4 mm gap. The Photofrin was used for the photodynamic reaction *in vitro* as a photosensitizer. The cells were incubated for 18 h with 20 μ g/ml of Ph in DMEM. Than cells were irradiated 10 min with the light intensity of 10 mW/cm² using a lamp with polarized light and red filter (632.8 nm). The photodynamic activity of an electro-photodynamic reaction with the Photofrin (Ph) was evaluated in relation to the standard photodynamic method by alkaline comet assay as an examination of DNA fragmentation

associated with apoptosis. The photosensitizer localization after 18 hours in MEWO cells was also examined.

Results and conclusions: It was observed that photodynamic reaction based Ph induced apoptosis in MEWO cells. Mitochondrial and endoplasmic localization of Ph showed that apoptosis might be associated with the extrinsic pathway or cell stress-related. The experiments proved that electroporation effectively supports photodynamic method.

Wstęp: Terapia fotodynamiczna (*photodynamic therapy* – PDT) jest selektywną metodą leczenia nowotworów, która wykorzystuje światłoczuły barwnik i źródło światła o odpowiedniej długości fali. Akumulacja fotouczulacza zależy od rodzaju komórek nowotworowych oraz fizycznych i chemicznych właściwości barwnika. Fotouczulacz lokalizuje się w cytoplazmie lub błonach organelli komórkowych, dzięki czemu są one szczególnie podatne na zniszczenie w wyniku powstania stresu oksydacyjnego po terapii fotodynamicznej.

Cel pracy: Zastosowanie elektroporacji błon w połączeniu z lekami cytotoksycznymi trudno przenikającymi przez błony komórkowe może zwiększyć ich transport do wnętrza komórek. Elektroporacja z użyciem cytostatyków znana jest jako elektrochemioterapia (ECT). Elektrochemioterapia i PDT należą do ukierunkowanych i małoinwazyjnych metod. Optymalne warunki leczenia mogą ograniczyć konieczność interwencji chirurgicznej, jak również wpłynąć na lepsze rokowania w leczeniu nowotworów.

Materiał i metody: Badano wpływ reakcji fotodynamicznej w połączeniu z elektroporacją w warunkach *in vitro*. Badania prowadzona na ludzkich komórkach czerniaka pigmentowanego (MEWO). Zastosowano następujące parametry elektroporacji: 1000 V/cm, 100 μ s, 8 impulsów dla każdej z próby. Komórki elektroporowano w kuwetach, z elektrodami ze stali nierdzewnej. Szerokość pomiędzy równoległymi elektrodami wynosiła 4 mm. Jako fotouczulacza użyto Photofrin (Ph). Komórki inkubowano przez 18 godzin z 20 mg/ml Ph w DMEM. Komórki naświetlano przez 10 min, przy użyciu lampy z spolaryzowanym światłem i czerwonego filtra (632,8 nm) o mocy 10 mW/cm². Aktywność fotodynamiczną po zastosowaniu elektrofotodynamicznej reakcji z fotouczulaczem porównywano ze standardową metodą fotodynamiczną, używając metody kometowej. Zbadano również lokalizację fotouczulacza po 18 godz. w komórkach czerniaka.

Wyniki i wnioski: Stwierdzono, że reakcja fotodynamiczna z zastosowaniem Ph indukuje apoptozę w komórkach MEWO. Lokalizacja Ph w błonach mitochondrium i retikulum endoplazmatycznym może świadczyć o aktywacji wewnątrzkomórkowego szlaku apoptotycznego. Badania wykazały, że elektroporacja skutecznie wspomaga metodę fotodynamiczną.

[28]

Sorafenib in hepatocarcinoma: effectiveness and appropriateness of drugs using the Italian RFOM Registry

Sorafenib w leczeniu raka wątroby: skuteczność oraz stosowność leków przy użyciu włoskiego rejestru RFOM

Marta P. Trojnia¹, Angelo C. Palozzo¹,
Magdalena Mazurek², Antonio Jirillo²

¹Pharmacy Department, Oncology Research Institute (Istituto Oncologico Veneto, IRCCS), Padua, Italy

²Unit of Valuation and Introduction of New Drugs in Cancer Therapies, Oncology Research Institute (Istituto Oncologico Veneto IRCCS), Padua, Italy

Background: Primary liver cancer is the fifth most common cancer worldwide and the third most common cause of death from cancer, resulting in more than 600 000 deaths per year. The major risk factors for hepatocellular carcinoma are chronic hepatitis B or hepatitis C virus infection, alcoholic cirrhosis, and nonalcoholic steatohepatitis. Sorafenib (Nexavar) is an orally active multikinase inhibitor that is approved in the EU for the treatment of hepatocellular carcinoma. Monotherapy with sorafenib prolongs overall survival and delays the time to progression in patients with advanced hepatocellular carcinoma who are not candidates for potentially curative treatment or transarterial chemoembolization.

The requirement for every new drug approval is demonstration of net clinical benefit, but even RCT (randomized clinical trial) could fail to demonstrate relevance in modifying the natural history of a disease. Italian Agency on Drugs (AIFA) has activated a web-based national registry of oncology drugs (RFOM) as an appraisal on new drugs introduced into the Italian market. RFOM database has been used as a data source for effectiveness and appropriateness in retrospective evaluation.

Aim of the study: Median time of treatment and PFS (progression free survival) may be achieved from clinical practice as a valuable indicator of effectiveness using RFOM data source. The aim of the study is to assess median time of treatment in real life compared to data of selected patients in the registration study for sorafenib in hepatocarcinoma.

Material and methods: In the Istituto Oncologico Veneto, the hospital pharmacists deal with different information archives. The registers were examined to establish the real-life-use of an innovative drug. Sorafenib in hepatocellular carcinoma has been analysed from 2007 to 2010 (22 months). Every patient was checked for diagnosis, length of treatment, toxicity and outcomes, and results allocated in a table of frequency to obtain an actuarial end-treatment curve. For the efficacy/effectiveness comparison we used registration RCT's Kaplan-Meier analysis of PFS to achieve a PFS actuarial monthly curve.

Results: 118 patients (median age = 67 years, M = 90, F = 28) were analyzed. At least 50% of patients ended therapy within 2 months (median of treatment). At this time 66 cards were completed reporting 56% progressions and 12% deaths.

Conclusion: In this analysis median PFS of 2 months (progression/death) was calculated on 46 patients. The data agreed perfectly with the median of treatment. The effectiveness value (2 months median) found in our postmarketing analysis is suggestive of differences with the efficacy in term of PFS (4.1 months) described in the regulatory trial of sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. This practice allows to appraise innovation in a postmarketing setting and helps to determine the price of reimbursement of new drugs through the risk sharing method.

Wstęp: Pierwotny rak wątroby jest piątym co do częstości występowania nowotworem na świecie i trzecią najczęstszą przyczyną zgonu z powodu raka (ponad 600 000 zgonów rocznie). Do głównych czynników ryzyka rozwoju raka wątrobowokomórkowego należą: przewlekłe zapalenie wątroby typu B, wirusowe zapalenia wątroby typu C, alkoholowa marskość wątroby oraz bezalkoholowe stłuszczeniowe zapalenie wątroby. Sorafenib (Nexavar) jest aktywnym doustnym inhibitorem licznych kinaz zatwierdzonym w UE w leczeniu raka wątrobowokomórkowego. Leczenie sorafenibem wydłuża całkowity czas przeżycia i opóźnia progresję choroby u pacjentów w zaawansowanym stadium raka wątroby, którzy nie są kandydatami do potencjalnie radykalnego leczenia lub chemoembolizacji przez tętniczej.

Wymogiem zatwierdzenia nowego leku jest wykazanie korzyści klinicznej netto, ale nawet RCT (badanie kliniczne z randomizacją) może nie być niezawodnym wyznacznikiem w modyfikacji naturalnego przebiegu choroby. Włoska Agencja ds. Leków (AIFA) uruchomiła internetowy krajowy rejestr leków onkologicznych (RFOM) dla celów lepszej analizy nowych leków wprowadzonych na rynek włoski. Baza danych RFOM została użyta jako źródło danych do oceny skuteczności i stosowności. Można wykorzystać ją w praktyce klinicznej.

Cel pracy: Mediana całkowitego czasu leczenia i PFS (przeżycie bez progresji choroby) otrzymane na podstawie praktyki klinicznej stanowią cenny wskaźnik efektywności w bazie danych RFOM. Celem badania jest ocena mediany czasu leczenia w prawdziwym życiu w porównaniu z danymi wybranych pacjentów w badaniu rejestracyjnym dotyczącym zastosowania sorafenibu w leczeniu raka wątroby.

Materiał i metody: W Istituto Oncologico Veneto farmaceutyci szpitala korzystają z różnych archiwów. Przeanalizowano rejestry w celu ustalenia rzeczywistego wykorzystania innowacyjnego leku. Sorafenib w leczeniu raka wątrobowokomórkowego został przeanalizowany od 2007 do 2010 (22 miesięcy). Każdy pacjent był sprawdzany pod kątem diagnozy, czasu trwania leczenia, toksyczności i skutków, a wyniki zostały ujęte w tabeli częstotliwości w celu uzyskania aktuarialnej krzywej ukończenia terapii. W celu porównania „*efficacy/ effectiveness*” wykorzystano czas wolny od progresji (*progression free survival* – PFS) otrzymany metodą Kaplana-Meiera z badania rejestracyjnego w celu otrzymania aktuarialnej miesięcznej krzywej PFS.

Wyniki: Przeanalizowano dane 118 chorych (średni wiek – 67 lat, mężczyźni – 90, kobiety – 28). Co najmniej 50% pacjentów zakończyło terapię w ciągu 2 miesięcy (mediana leczenia). Jednocześnie 66 kart wykazało 56% progresji i 12% zgonów.

Wnioski: W niniejszej analizie mediana PFS wynosząca 2 miesiące (progresja/zgon) została obliczona na podstawie 46 pacjentów. Dane odpowiadają medianie czasu leczenia. Wartość efektywności (mediana 2 miesiące) wynikająca z naszej analizy po wprowadzeniu leku na rynek wskazuje na różnice w skuteczności, jeśli chodzi o PFS (4,1 miesiąca), opisaną w badaniu rejestracyjnym dotyczącym sorafenibu w leczeniu pierwotnego raka wątroby w zaawansowanym stadium. Taka praktyka pozwala na ocenę innowacyjności produktu po jego wprowadzeniu na rynek i przyczynia się do ustalenia efektywnej wartości nowych leków poprzez metodę „*risk sharing*”.

Session 5

Cancer genetics and biology

Genetyka i biologia nowotworów

[29]

Selenoprotein genotypes as well as selenium levels in organisms are critical features of human cancer risk

Genotypy selenoprotein, a także stężenia selenu w organizmie jako kluczowe czynniki ryzyka wystąpienia raka u ludzi

Katarzyna Jaworska^{1*}, Katarzyna Durda¹, Satish Gupta^{1*}, Magdalena Muszyńska¹, Grzegorz Sukiennicki¹, Tomasz Grodzki², Piotr Waloszczyk², Ewa Jaworowska³, Jakub Lubiński³, Józef Kładny⁴, Grażyna Wilk⁵, Barbara Górecka⁵, Andrzej Sikorski⁶, Adam Gołąb⁶, Dominika Wokołorczyk¹, Cezary Cybulski¹, Oleg Oszurek¹, Aleksandra Tołoczko-Grabarek¹, Tomasz Huzarski¹, Anna Jakubowska¹, Jan Lubiński¹

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

²Lung Diseases Hospital, Szczecin

³Department of Otolaryngology and Laryngological Oncology, Pomeranian Medical University, Szczecin

⁴Clinics of Surgery, Pomeranian Medical University, Szczecin

⁵Department of Radiology, Pomeranian Medical University, Szczecin

⁶Clinics of Urology, Pomeranian Medical University, Szczecin

*Postgraduate School of Molecular Medicine, Warsaw Medical University

Aim of the study

Assessment of common cancer risk (cancers of the lung, breast, prostate, larynx) depending on genomic variants in selected selenoproteins (GPX1, GPX4, TXNRD2, Sep15) using the model of Polish population (Slavic ethnicity with relatively high level of genetic homogeneity) characterized by low level of Se (> 95% of individuals with plasma/serum level < 100 µg/l).

Material and methods

Patients

Breast cancer: Initial series consisted of 131 females with consecutive breast cancers diagnosed at our centre. Cases with BRCA1 mutations or diagnosed with any malignancy in the past were excluded. For each case included for the studies search for pairs was performed among unaffected individuals registered in our centre. Finally, 108 pairs (108/131 – 82%) matched for year of birth (± 3 years), sex, total number of breast cancers and of any malignancies among first degree relatives were created.

Prostate cancer: Initial series consisted of 105 men with consecutive prostate cancers diagnosed at our centre. Cases diagnosed with any malignancy in the past were excluded. For each cases included for the studies search for pairs was performed among unaffected individuals registered in our centre. Finally, 82 pairs (82/105 – 78%) matched for year

of birth (± 3 years), sex; total number of prostate cancers and of any malignancies among 1st degree relatives were created.

Lung cancer: Initial series consisted of 95 persons with consecutive lung cancers resected at our centre. Cases diagnosed with any malignancy in the past were excluded. For each case included for the studies search for pairs was performed among unaffected individuals registered in our centre. Finally, 83 pairs (83/95 – 87%) were matched for year of birth (± 3 years), sex, total number of lung cancers and of any malignancies among 1st degree relatives and smoking – number of pack/years ($\pm 10\%$) were created.

Larynx cancer: Initial series consisted of 113 persons with consecutive laryngeal cancer diagnosed at our centre. Cases diagnosed with any malignancy in the past were excluded. For each case included for the studies search for pairs was performed among unaffected individuals registered in our centre. Finally, 91 pairs (91/113 – 81%) were matched for year of birth (± 3 years), sex, total number of laryngeal cancers and of any malignancies among 1st degree relatives and number of pack/years ($\pm 10\%$) were created.

Measurement of Se level

Selenium concentration in blood plasma was determined using graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS). The measurement accuracy was $\pm 5\%$ µg Se/l.

Molecular analyses

For molecular analyses 4 most polymorphic SNPs localized in selenoprotein genes tested in our Center were selected:

- GPX1: rs1050450 > C/T, 200Leu/Pro,
- GPX4: rs713041 > C/T 220Leu/Leu,
- TXNRD2: rs1139793 > G/A, 370Thr/Ile,
- SEP15: rs5845 > G/A.

Genotyping was performed using TaqMan assays.

Results

Association on subgroups identified depending on plasma Se concentration

Results of analysis of distribution of cases and controls in quartiles representing subgroups depending on plasma Se concentration and without stratification by DNA variants are summarized in table 1.

No significant differences between quartiles have been found for breast and prostate cancers. On contrary, very large differences have been observed for cancers of the lung and larynx. Differences between first and fourth quartiles were strongly significant for both sites: cancer of the lung – $p < 0.0001$, OR – 13.17; CI: 4.6-47.6; cancer of the larynx – $p < 0.0001$; OR – 5.6; CI: 2.3-13.80. Very interesting was observation of extremely low frequency of above cancers in persons with plasma Se concentration above 90 µg/l. Such Se level was not found even in one patient with cancer of the lung but in 15 persons from unaffected controls.

Associations in subgroups identified depending on plasma Se concentration and on DNA variants of selenoprotein genes

Breast cancer: Statistically significant data were found for genotype TXNRD2 GG which was showing decreased

risk (OR = 0.27) of breast cancer for females with Se concentration ~ 60-80 µg/l. Selected results have been presented in table 2.

Table 1. Association between Se plasma concentration and risk of cancers independently on variants of selenoprotein genes

Cancer site	Quartile	Se concentration range [µg/l]	Cases [% - No]
BREAST	I	26.3-59.1	59.3% (32/54)
	II	59.2-68.8	50.0% (27/54)
	III	68.9-79.5	38.9% (21/54)
	IV	79.5-129.3	51.8% (28/54)
PROSTATE	I	22.0-61.4	51.2% (21/41)
	II	61.4-70.2	60.0% (24/41)
	III	70.3-79.4	43.9% (18/41)
	IV	79.6-136.8	40.0% (16/41)
LUNG	I	29.0-56.41	80.9% (34/42)
	II	56.5-66.6	53.6% (22/41)
	III	66.9-77.1	40.5% (17/42)
	IV	77.2-112.7	24.4% (10/41)
LARYNX	I	28.4-58.9	69.6% (32/46)
	II	59.2-69.8	62.2% (28/45)
	III	69.9-80.0	39.1% (18/46)
	IV	80.3-117.4	28.9% (13/45)

Prostate cancer: Statistically significant data were found for genotype GPX4 nCC – lower risk (OR = 3.01) of prostate cancer was associated with quartiles with Se level ~ > 70 µg/l. Selected results have been presented in table 3.

Lung cancer: Within 8 analyzed genotypes, 4 showed differences between quartiles with the lowest (I) and highest (IV) Se level with $p < 0.00625$ (difference significant also after Bonferroni correction): GPX1 nCC (OR = 7.12), Sep15 GG (OR = 6.46), GPX4 nCC (OR = 4.85), TXNRD2 non GG (OR = 8.67). Selected results have been presented in table 4.

Laryngeal cancer: Statistically significant differences after Bonferroni correction between quartiles with the lowest (I) and highest (IV) Se level have been identified for Sep15 GG (OR = 11.54), GPX4 nCC (OR = 11.20) i GPX1 nCC (OR = 10.00). Selected results have been presented in table 5.

Conclusions

1. Depending on concentration, selenium can induce or protect against cancer.
2. The effect of selenium is related to genotypes and selenium level in organism/diet.
3. The results of association studies require validation based on prospective observation of larger groups of patients.
4. The optimal selenium concentration can appear to be suboptimal or even harmful for patients carrying particular genotypes in selenoprotein genes.

Table 2. Selected results of breast cancer risk analyses depending on Se concentration and genotypes of selenoprotein genes

Genotype	Quartiles compared	Se concentration range (µg/l)	Cases/Controls in compared groups	Fisher's Exact Test		
				p	OR	CI
TXNRD2 GG	II/III vs I/IV	59.6-79.2 vs. 40.2-59.0 and 79.3-106.4	21/35 vs. 38/17	0.0012*	0.27	0.12-0.59
Sep 15 nGG	I/II vs III/IV	26.3-68.8 vs. 68.9-129.3	28/16 vs. 17/30	0.0119	3.09	1.31-7.26
GPX1 CC	I/II vs III/IV	40.2-69.8 vs. 69.9-107.9	32/18 vs. 22/29	0.0465	2.34	1.052-5.22
GPX4 CC	I/II vs III/IV	26.3-74.1 vs. 74.2-129.3	14/18 vs. 22/11	0.08	0.39	0.14-1.06

* statistically significant difference after Bonferroni correction

Table 3. Selected results of prostate cancer risk analyses depending on Se concentration and genotypes of selenoprotein genes

Genotype	Quartiles compared	Se concentration range (µg/l)	Cases/Controls in compared groups	Fisher's Exact Test		
				p	OR	CI
GPX4 nCC	I/II vs III/IV	22.0-71.4 vs. 71.6-136.8	33/17 vs. 20/31	0.0096*	3.01	1.34-6.77
Sep 15 GG	I/II vs III/IV	22.0-70.8 vs. 71.2-116.9	24/14 vs. 14/24	0.0383	2.94	1.16-7.47

*statistically significant difference after Bonferroni correction for quartiles with at least 25 individuals

Table 4. Selected results of lung cancer risk analyses depending on Se concentration and genotypes of selenoprotein genes

Genotype	Quartiles compared	Se concentration range (µg/l)	Cases/Controls in compared groups	Fisher's Exact Test		
				p	OR	CI
GPX1 nCC	I vs. III	29.6-59.9 vs. 69.6-86.9	19/6 vs. 8/18	0.0019	7.12	2.06-24.61
Sep 15 GG	I vs. III	29.0-56.4 vs. 68.3-86.7	24/4 vs. 13/14	0.0041	6.46	1.76-23.72
GPX4 nCC	I vs. III	29.0-59.3 vs. 71.6-87.7	25/7 vs. 14/19	0.0051	4.85	1.64-14.36
TXNRD2 nGG	I vs. III	29.6-55.4 vs. 68.3-86.7	18/3 vs. 9/13	0.0040	8.67	1.95-38.42

Table 5. Selected results of laryngeal cancer risk analyses depending on Se concentration and genotypes of selenoprotein genes

Genotype	Quartiles compared	Se concentration range ($\mu\text{g/l}$)	Cases/Controls in compared groups	Fisher's Exact Test		
				<i>p</i>	OR	CI
Sep 15 GG	I vs. IV	28.4-57.5 vs. 81.5-113.9	17/7 vs. 4/19	0.0004	11.54	2.87-46.42
GPX4 nCC	I vs. IV	32.8-59 vs. 82.0-117.4	21/9 vs. 5/24	< 0.0001	11.20	3.24-38.72
GPX1 nCC	I vs. IV	32.8-57.5 vs. 79.3-113.9	15/11 vs. 3/22	0.001	10.00	2.38-42.03

Cel pracy

Ocena ryzyka tzw. częstych raków (płuca, sutka, prostaty, krtani) w zależności od wariantów genomowych w wybranych selenoproteinach (GPX1, GPX4, TXNRD2, Sep15) z wykorzystaniem modelu polskiej populacji (słowiańskie pochodzenie etniczne ze względnie wysokim poziomem homogenności genetycznej) charakteryzującej się małym stężeniem selenu (ponad 95% osób ze stężeniem w osoczu/surowicy < 100 $\mu\text{g/l}$).

Materiał i metody

Pacjenci

Rak piersi: Wyjściową serię stanowiło 131 kobiet z kolejnymi rakami piersi rozpoznanymi w naszym ośrodku. Do serii raków nie włączano osób z mutacją konstytucyjną genu BRCA1. Do każdej chorej włączonej do badań wynaleziono w rejestrze naszego ośrodka osobę bez raka i stanowiącą parę. Ostatecznie utworzono 108 par (108/131 – 82%) dobranych pod względem: roku urodzenia (± 3 lata), płci, całkowitej liczby raków piersi i jakichkolwiek nowotworów złośliwych wśród krewnych I stopnia.

Rak prostaty: Wyjściową serię stanowiło 105 mężczyzn z kolejnymi rakami prostaty rozpoznanymi w naszym ośrodku. Dla każdego pacjenta włączonego do badań wynaleziono w rejestrze naszego ośrodka osobę bez raka i stanowiącą parę. Ostatecznie utworzono 82 pary (82/105 – 78%) dobrane pod względem: roku urodzenia (± 3 lata), płci, całkowitej liczby raków prostaty i jakichkolwiek nowotworów złośliwych wśród krewnych I stopnia.

Rak płuca: Wyjściową serię stanowiło 95 osób z kolejnymi rakami płuc operowanymi w naszym ośrodku. Dla każdego pacjenta włączonego do badań wynaleziono w rejestrze naszego ośrodka osobę bez raka i stanowiącą parę. Ostatecznie utworzono 83 pary (83/95 – 87%) dobrane pod względem: roku urodzenia (± 3 lata), płci, całkowitej liczby raków płuc i jakichkolwiek nowotworów złośliwych wśród krewnych I stopnia oraz palenia tytoniu – liczby paczkołata ($\pm 10\%$).

Rak krtani: Wyjściową serię stanowiło 113 osób z kolejnymi rakami krtani rozpoznanymi w naszym ośrodku. Dla każdego pacjenta włączonego do badań wynaleziono w rejestrze naszego ośrodka osobę bez raka i stanowiącą parę. Ostatecznie utworzono 91 par (91/113 – 81%) dobrane pod względem: roku urodzenia (± 3 lata), płci, całkowitej liczby raków krtani i jakichkolwiek nowotworów złośliwych wśród krewnych I stopnia oraz palenia tytoniu – liczby paczkołata ($\pm 10\%$).

Pomiary stężenia selenu

Stężenie selenu w osoczu lub surowicy oceniano, stosując technikę GFAAS (graphite furnace atomic absorption

spectrometry). Dokładność pomiaru wynosiła $\pm 5\%$ $\mu\text{g Se/l}$.

Analizy molekularne

Do badań molekularnych wybrano 4 SNPs-y charakteryzujące się najwyższą polimorficznością wśród genów selenoproteinowych zbadanych w naszym ośrodku:

- GPX1: rs1050450 > C/T, 200Leu/Pro,
- GPX4: rs713041 > C/T 220Leu/Leu,
- TXNRD2: rs1139793 > G/A, 370Thr/Ile,
- SEP15: rs5845 > G/A.

Analizy molekularne wykonano za pomocą techniki TaqMan.

Wyniki

Asocjacja w podgrupach zidentyfikowanych w zależności od poziomu selenu w osoczu

Wyniki analizy rozkładu raków i kontroli w ćwiartkach (quartiles) reprezentujących podgrupy w zależności do poziomu selenu w osoczu i bez stratyfikacji na podstawie wariantów DNA zestawiono w tabeli 1.

Nie stwierdzono znaczących różnic między ćwiartkami dla raków piersi i prostaty. Przeciwnie, bardzo znaczne różnice zaobserwowano dla raków płuca i krtani. Różnice między I i IV ćwiartką były bardzo znaczące dla obu lokalizacji: rak płuca – $p < 0,0001$, OR – 13,17; CI: 4,6–47,6; rak krtani –

Tabela 1. Asocjacja między stężeniem selenu w osoczu a ryzykiem wystąpienia raków niezależnie od wariantów genów selenoproteinowych

Lokalizacja raka	Ćwiartka	Zakres stężenia selenu ($\mu\text{g/l}$)	% raków (liczba)
piers	I	26,3–59,1	59,3% (32/54)
	II	59,2–68,8	50,0% (27/54)
	III	68,9–79,5	38,9% (21/54)
	IV	79,5–129,3	51,8% (28/54)
prostata	I	22,0–61,4	51,2% (21/41)
	II	61,4–70,2	60,0% (24/41)
	III	70,3–79,4	43,9% (18/41)
	IV	79,6–136,8	40,0% (16/41)
płuco	I	29,0–56,41	80,9% (34/42)
	II	56,5–66,6	53,6% (22/41)
	III	66,9–77,1	40,5% (17/42)
	IV	77,2–112,7	24,4% (10/41)
krtani	I	28,4–58,9	69,6% (32/46)
	II	59,2–69,8	62,2% (28/45)
	III	69,9–80,0	39,1% (18/46)
	IV	80,3–117,4	28,9% (13/45)

$p < 0.0001$; OR – 5,6; CI: 2,3–13,8. Bardzo interesująca była obserwacja ekstremalnie niskiej częstości powyższych raków u osób ze stężeniem selenu w osoczu powyżej 90 $\mu\text{g/l}$. Przy takich wartościach selenu nie stwierdzono ani jednego raka płuca, natomiast 15 osób z grupy kontrolnej.

Asocjacje w podgrupach zidentyfikowanych w zależności od stężenia selenu w osoczu i wariantów DNA w genach selenoproteinowych

Rak piersi: Statystycznie istotne dane uzyskano dla genotypu TXNRD2 GG, w którym stwierdzono obniżone ryzyko (OR – 0,27) dla raka piersi u kobiet ze stężeniem selenu ok. 60–80 $\mu\text{g/l}$. Wybrane wyniki analiz zestawiono w tabeli 2.

Rak prostaty: Statystycznie istotne różnice znaleziono dla genotypu GPX4 nCC – obniżone ryzyko (OR – 3,01) raka prostaty było zasocjowane z ćwiartkami o poziomie selenu $\sim > 70 \mu\text{g/l}$. Wybrane wyniki analiz zestawiono w tabeli 3.

Rak płuca: Wśród 8 analizowanych genotypów w 4 stwierdzono różnice pomiędzy grupami o najwyższym (III)

i najniższym (I) poziomie Se z $p < 0.00625$ (różnica istotna statystycznie po poprawce Bonferroniego): GPX1 nCC (OR – 7,12), Sep15 GG (OR – 6,46), GPX4 nCC (OR – 4,85), TXNRD2 non GG (OR – 8,67). Wybrane wyniki analiz zestawiono w tabeli 4.

Rak krtani: Najwyższe różnice (istotne statystycznie również po poprawce Bonferroniego, $p < 0.00625$) pomiędzy ćwiartkami o największym (IV) i najmniejszym (I) stężeniu selenu stwierdzono dla, Sep15 GG (OR – 11,54), GPX4 nCC (OR – 11,20) i GPX1 nCC (OR – 10,00). Wybrane wyniki analiz zestawiono w tabeli 5.

Wnioski

1. W zależności od stężenia selen może wywołać raka lub mu zapobiegać.
2. Działanie selenu zależy od genotypu i stężenia selenu w organizmie lub diecie.
3. Wyniki badań asocjacyjnych wymagają potwierdzenia poprzez obserwację prospektywną dużych grup pacjentów.

Tabela 2. Ryzyko raka piersi w zależności od stężenia Se i wariantów DNA w genach selenoproteinowych – wybrane wyniki

Genotyp	Porównywane ćwiartki	Zakres stężenia selenu ($\mu\text{g/l}$)	Raki/kontrole w porównywanych grupach	Test zgodności Fishera		
				p	OR	CI
TXNRD2 GG	II/III vs I/IV	59,6–79,2 vs 40,2–59,0 i 79,3–106,4	21/35 vs 38/17	0,0012*	0,27	0,12–0,59
Sep 15 nGG	I/II vs III/IV	26,3–68,8 vs 68,9–129,3	28/16 vs 17/30	0,0119	3,09	1,31–7,26
GPX1 CC	I/II vs III/IV	40,2–69,8 vs 69,9–107,9	32/18 vs 22/29	0,0465	2,34	1,052– 5,22
GPX4 CC	I/II vs III/IV	26,3–74,1 vs 74,2–129,3	14/18 vs 22/11	0,08	0,39	0,14–1,06

* Różnica istotna statystycznie po poprawce Bonferroniego przy ćwiartkach liczących co najmniej 25 osób

Tabela 3. Ryzyko raka prostaty w zależności od stężenia Se i wariantów DNA w genach selenoproteinowych – wybrane wyniki

Genotyp	Porównywane ćwiartki	Zakres stężenia selenu ($\mu\text{g/l}$)	Raki/kontrole w porównywanych grupach	Test zgodności Fishera		
				p	OR	CI
GPX4 nCC	I/II vs III/IV	22,0–71,4 vs 71,6–136,8	33/17 vs 20/31	0,0096*	3,01	1,34–6,77
Sep 15 GG	I/II vs III/IV	22,0–70,8 vs 71,2–116,9	24/14 vs 14/24	0,0383	2,94	1,16–7,47

* Różnica istotna statystycznie po poprawce Bonferroniego przy ćwiartkach liczących co najmniej 25 osób

Tabela 4. Ryzyko raka płuca w zależności od stężenia Se i wariantów DNA w genach selenoproteinowych – wybrane wyniki

Genotyp	Porównywane ćwiartki	Zakres stężenia selenu ($\mu\text{g/l}$)	Raki/kontrole w porównywanych grupach	Test zgodności Fishera		
				p	OR	CI
GPX1 nCC	I vs III	29,6–59,9 vs 69,6–86,9	19/6 vs 8/18	0,0019	7,12	2,06–24,61
Sep 15 GG	I vs III	29,0–56,4 vs 68,3–86,7	24/4 vs 13/14	0,0041	6,46	1,76–23,72
GPX4 nCC	I vs III	29,0–59,3 vs 71,6–87,7	25/7 vs 14/19	0,0051	4,85	1,64–14,36
TXNRD2 nGG	I vs III	29,6–55,4 vs 68,3–86,7	18/3 vs 9/13	0,0040	8,67	1,95–38,42

Tabela 5. Ryzyko raka krtani w zależności od stężenia Se i wariantów DNA w genach selenoproteinowych – wybrane wyniki

Genotyp	Porównywane ćwiartki	Zakres stężenia selenu ($\mu\text{g/l}$)	Raki/kontrole w porównywanych grupach	Test zgodności Fishera		
				p	OR	CI
Sep 15 GG	I vs IV	28,4 - 57,5 vs 81,5 - 113,9	17/7 vs 4/19	0,0004	11,54	2,87–46,42
GPX4 nCC	I vs IV	32,8 - 59,5 vs 82,0 - 117,4	21/9 vs 5/24	< 0,0001	11,20	3,24–38,72
GPX1 nCC	I vs IV	32,8 - 57,5 vs 79,3 - 113,9	15/11 vs 3/22	0,001	10,00	2,38–42,03

4. Stężenia selenu oceniane jako optymalne dla większości pacjentek mogą okazać się sub-optymalne lub wręcz niekorzystne dla podgrup pacjentek o szczególnych genotypach.

[30]

Diagnostic significance of testing for mutations in the CHEK2 gene

Znaczenie diagnostyczne testów wykrywających nosicielstwo mutacji genu CHEK2

Cezary Cybulski¹, Dominika Wokolorczyk¹, Anna Jakubowska¹, Tomasz Huzarski¹, Tomasz Byrski², Jacek Gronwald³, Tadeusz Dębniak¹, Bohdan Górski¹, Steven A. Narod³, Jan Lubiński¹

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

²Pomeranian Medical University, Szczecin, Poland

³Women's College Research Institute, Toronto, Ontario, Canada

Mutations in *CHEK2* predispose to a range of cancer types including breast cancer. A meta-analysis of all association studies estimated the risk of breast cancer among carriers of 1100delC to be increased by 2.7-fold (9) and increased by 4.7-fold among carriers with a positive family history of breast cancer (Weischer M *et al.* CHEK2*1100delC genotyping for clinical assessment of breast cancer risk: meta-analysis of 26,000 patients cases and 27,000 controls. *J Clin Oncol* 2008; 26: 542-548). We estimated the risk of breast cancer in a woman who has a CHEK2 mutation depending on her family history of breast cancer. Our data suggest that carriers of a truncating mutation of CHEK2 (IVS2+1G>A, del5395, 1100delC) have 2.9 – fold increased risk of breast cancer in the Polish population. The risk was higher for women with at least one first-degree relative with breast cancer (OR = 5.0), and for women with at least one second-degree relative with breast cancer (OR = 4.1). If both a first- and second-degree relative was affected with breast cancer, the odds ratio was 6.4. We estimate the lifetime risks for carriers of CHEK2 truncating mutations to be from 24% to 38% depending family history of breast cancer in first- and second degree relatives. *CHEK2* mutation screening detects a clinically meaningful risk of breast cancer.

Mutacje genu *CHEK2* predysponują do nowotworów wielu narządów w tym do raka piersi.

Według metaanalizy (Weischer M i wsp. CHEK2*1100delC genotyping for clinical assessment of breast cancer risk: metaanalysis of 26 000 patients cases and 27 000 controls. *J Clin Oncol* 2008; 26: 542-548) ryzyko raka piersi u nosicieli mutacji genu *CHEK2* 1100delC jest zwiększone 2,7-krotnie i jest wyższe u nosicieli, u których w rodzinie występował rak piersi – zwiększone 4,7-krotnie.

Określiśmy ryzyko wystąpienia raka piersi w zależności od rodzaju mutacji oraz od wywiadu rodzinnego. Nasze badania wskazują, że nosicielstwo mutacji skracających białko (IVS2+1G>A, del5395, 1100delC) związane jest z 2,9-krotnym zwiększeniem ryzyka rozwoju choroby u kobiet w pol-

skiej populacji. Ryzyko było zwiększone 5-krotnie, gdy rak piersi występował u co najmniej jednego krewnego I stopnia, 4,1-krotnie, gdy rak piersi występował u jednego lub więcej krewnych II stopnia, 6,4-krotnie, gdy rak piersi występował u krewnych I i II stopnia. Na podstawie tych danych szacujemy, że ryzyko wystąpienia raka piersi u nosicielki mutacji skracających białko CHEK2 wynosi 24–38% w zależności od występowania raka piersi u krewnych I i/lub II stopnia. Badanie mutacji genu *CHEK2* wykrywa istotnie klinicznie ryzyko rozwoju raka piersi.

[31]

Genes of metastasizing in ovarian carcinoma

Geny przerzutowania w raku jajnika

Anna Markowska¹, K. Jaszczyńska-Nowinka², Janina Markowska²

¹Department of Perinatology and Female Diseases, Poznan University of Medical Sciences

²Chair and Department of Oncology, Poznan University of Medical Sciences

Metastasizing is a typical trait of malignant tumours and the main cause of death due to cancer. Not every separation of a cancer cell from a tumour mass and penetration of lymphatic or haemopoetic systems results in the development of a metastasis. Alterations must develop in the environment of the cancer, to assure anchorage of the cell and its proliferation. Relatively well recognised genes linked to metastasizing include:

BRMS1, locus 11q13.1-q13.2

Expression of mRNA for *BRMS1* is most pronounced in a healthy gonad and it is very low in an advanced ovarian cancer with metastases to lymph nodes. Metastases linked to *BRMS1* are associated with:

- a decrease in cell adhesion,
- regulation of fascin protein, linked to cell motility,
- modification of phenotypes associated with metastases,
- effect on cell nucleus-dependent inhibition of suppressor signalling.

The gene may provide a target for targeted therapy.

SDF1, locus 10 q11.1

The best recognised isoform involves SDF-1 α ; it acts through its CXCR4 receptor. The SDF-1/CXCR4 complex plays a key role in metastasizing of CXCR4-positive tumour cells.

SDF-1/CXCR4:

- promotes development of cancer by induction of angiogenesis,
- stimulates proliferation of ovarian cancer cells,
- inhibits apoptosis,
- induces resistance of cancer cells to chemotherapy,
- directs CXCR4-positive cancer cells to the organs with expression of SDF-1.

In targeted therapy monoclonal antibodies to CXCR4 inhibit cancer cells metastasizing to lungs and lymph nodes.

MET, locus 7q31,

which codes for MET protein, known as c-Met.

- Its over-expression is associated with metastases of ovarian cancer, in particular to para-aortal lymph nodes,

- expression of MMP-2 and MMP-9 used to be associated with the disintegration of the basement membrane.

Inhibitors of Met kinases may provide a targeted therapy.

SURVIVIN gene, locus 17q25

Product of the gene involving a protein which belongs to the family of apoptosis inhibitors.

Survivin is not manifested in normal cells and, therefore, the proliferation of neoplastic cells may be selectively inhibited by targeted therapy which blocks expression of the gene.

KISS-1, locus 1q32

Activity of kisspeptin in ovarian cancer takes place due to:

- inhibition of tumour cell migration,
- directing of cells to the apoptotic pathway,
- inhibition of cancer cell ability to form colonies.

Stimulation of kisspeptin activity is contemplated in targeted therapy.

KAI1, locus 11p11.2

A decreased expression of the metastasis-suppressing protein is linked to an unfavourable prognosis in ovarian cancer. Development of metastases occurs due to :

- inhibition of cell motility,
- effect on E-cadherin,
- interaction with integrins,
- effect on NF- κ B.

A targeted therapy involves attempts to increase expression of the gene through interactions with its microenvironment.

NM-23-H1, locus 17q21

The gene codes for proteins with activity of NDP-kinases, which participate in DNA repair.

Most of studies indicate that its augmented expression is associated with metastases of ovarian cancer to lymph nodes.

No reports on targeted therapy have been published till now.

Przerzutowanie jest cechą charakterystyczną nowotworów złośliwych i główną przyczyną zgonów z powodu raka.

Nie każde oddzielenie komórki raka od masy guza i penetracja do układu limfatycznego czy też krwionośnego skutkuje rozwojem przerzutu. Muszą nastąpić zmiany w środowisku raka, aby komórka mogła się zakotwiczyć i następnie namnożyć.

Wśród dość dobrze poznanych genów związanych z przerzutowaniem znane są:

Gen BRMS1, lokalizacja 11q13.1-q13.2

Ekspresja mRNA dla *BRMS1* jest najwyższa w zdrowej gonadzie i bardzo niska w zaawansowanym raku jajnika z przerzutami do węzłów chłonnych. Przerzutowanie drogą *BRMS1* wiąże się z:

- obniżeniem adhezji komórek,
- regulacją białka *fascin* związaneego z ruchliwością komórek,
- modyfikacją fenotypów związanych z przerzutami,
- wpływem na jądrowe zahamowanie supresorowej sygnalizacji.

Gen może być tarczą terapii celowanej.

Gen SDF1, lokalizacja 10 q11.1

Bardziej poznana izoformą jest *SDF-1 α* ; działa poprzez swój receptor *CXCR4*. Kompleks *SDF-1/CXCR4* odgrywa klu-

czową rolę w przerzutowaniu komórek nowotworowych *CXCR4* dodatnich.

SDF-1/CXCR4:

- promuje wzrost raka poprzez indukcję angiogenezy,
- stymuluje proliferację komórek raka jajnika,
- hamuje apoptozę,
- powoduje oporność komórek raka na chemioterapię,
- naprowadza komórki raka *CXCR4* dodatnie do narządów z ekspresją *SDF1*.

W terapii celowanej – przeciwciała monoklonalne przeciwko *CXCR4* hamują przerzutowanie komórek raka do płuc i węzłów chłonnych.

Gen MET, lokalizacja 7q31

Kodujące białko *MET*, znane jak *c-Met*.

- nadekspresja związana jest z przerzutowaniem raka jajnika, zwłaszcza do węzłów paraortalnych,
- ekspresja *MMP-2* i *MMP-9* kojarzona jest z dezintegracją błony podstawnej.

Inhibitory kinaz *Met* mogą być terapią celowaną.

Gen SURWIWINY lokalizacja 17q25

Produktem jego jest białko należące do rodziny inhibitorów apoptozy. *Surwiwina* nie występuje w prawidłowych komórkach i dlatego też można selektywnie hamować proliferację komórek nowotworowych w terapii celowanej przez blokowanie ekspresji genu.

Gen KISS-1, lokalizacja 1q32

Działanie kisspeptyny w raku jajnika odbywa się na drodze:

- hamowania migracji komórek nowotworowych,
 - kierowania komórek na szlak apoptozy,
 - upośledzenia zdolności komórek raka do tworzenia kolonii.
- Wzmocnienie aktywności kisspeptyny rozważane jest w terapii celowanej.

Gen KAI1, lokalizacja 11p11.2

Obniżona ekspresja białka supresji przerzutów wiąże się z niekorzystną prognozą w raku jajnika. Przerzutowanie odbywa się poprzez:

- hamowanie ruchliwości komórek,
- wpływ na E-kadherinę,
- związek z integrynami,
- wpływ na NF- κ B.

Terapia celowana próby wzmożonej ekspresji przez interakcję z mikrośrodowiskiem.

Gen NM-23-H1, lokalizacja 17q21

Koduje białka o aktywności kinaz-NDP biorące udział w naprawie DNA.

Większość prac wskazuje, że zwiększenie ekspresji związane jest z przerzutami do węzłów chłonnych w raku jajnika. Nie ma badań w kierunku terapii celowanej.

[32]

Implications of cancer-associated systemic inflammation for biomarker discovery

Swoistość markerów nowotworowych w kontekście stanu zapalnego towarzyszącego rozwojowi nowotworów złośliwych

Magdalena Chechlińska

Centrum Onkologii – Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie w Warszawie

There is a need for new, reliable cancer biomarkers for screening, diagnostic and prognostic purposes, prediction of treatment response and monitoring of cancer patients. With the rapid development of new technologies, thousands of potential cancer biomarkers have emerged and still only a few have found their way to clinical application.

Accumulating evidence shows that not only local but also systemic inflammatory reactions are implicated in cancer and interfere with the molecular image of the disease. We have shown that many of the so-called tumour markers are inducible in normal peripheral blood mononuclear cells. The difficulty in tumour biomarker research lies in determining which markers are specifically linked to cancer, and do not just reflect unspecific secondary changes or accompanying diseases. Thus, a reliable control to differentiate cancer-specific changes is of utmost importance, especially when employing molecular technologies, highly sensitive but, as such, of significantly decreased specificity. Unfortunately, most modern biomarker studies, such as those employing proteomics, circulating tumour cell and free nucleic acid assessments, epigenetics and metabonomics, seem to ignore inflammation as an inherent component of cancer disease, and examine cancer patients' samples against those of healthy, inflammation-free persons. Then, the prognostic value of differentially expressed markers is often regarded as an indirect proof of their cancer specificity, but it is the systemic inflammatory response in cancer patients which frequently relates to clinical parameters, and mere measurements of the inflammatory factors present prognostic value.

It should be strongly emphasised that the absence of a marker gene expression in healthy donors' samples does not provide grounds for firm conclusions on cancer specificity. All potential cancer biomarkers should be validated against their expression in inflammatory conditions, and their independent predictive value should be examined in the context of unspecific parameters of systemic inflammation. Otherwise we will end up using advanced technologies to assess the inflammatory reactions in cancer patients.

Od lat trwają poszukiwania nowych markerów nowotworowych. Do potencjalnych ich zastosowań należą: skryning, wczesne wykrywanie, pierwotna diagnoza, ocena klinicznego zaawansowania i rokowania, przewidywanie odpowiedzi na leczenie oraz monitorowanie chorych. Wraz z rozwojem biologii molekularnej i wysokoczułych technik

badawczych pojawiają się setki potencjalnych markerów, jednak wciąż nieliczne znajdują zastosowanie kliniczne.

Procesowi nowotworzenia towarzyszy stan zapalny, występujący nie tylko lokalnie, ale również w postaci zmian ogólnoustrojowych. Liczne dane pokazują, że reakcje zapalne zmieniają molekularny obraz choroby nowotworowej. W badaniach własnych wykazano, że wiele tzw. markerów nowotworowych ulega ekspresji w aktywowanych komórkach jednonądrczastych krwi zdrowych dawców. Stąd zasadniczą trudność w poszukiwaniu markerów nowotworowych stanowi odróżnienie cząsteczek swoistych dla nowotworu od takich, które obrazują nieswoiste zmiany wtórne lub choroby towarzyszące. Dlatego w ocenie przydatności markerów nowotworowych istotny jest dobór odpowiednich kontroli. Ma to szczególne znaczenie przy stosowaniu technik molekularnych, których wysoka czułość skutkuje znacznym obniżeniem swoistości. Niestety, w badaniach z zastosowaniem takich nowoczesnych podejść, jak proteomika, poszukiwanie krążących komórek nowotworowych i wolnych kwasów nukleinowych, epigenetyka czy metabonomika często ignoruje się aspekt zapalny choroby nowotworowej i jako punkt odniesienia powszechnie stosuje się materiał od zdrowych dawców, a wartość rokowniczą markerów uznaje się często za pośredni dowód ich swoistości. Jednak zazwyczaj to uogólniona odpowiedź zapalna koreluje z cechami klinicznymi i poziom parametrów zapalnych ma wartość rokowniczą. Brak ekspresji określonego markera w próbkach od osoby zdrowej zdecydowanie nie upoważnia do wnioskowania na temat jego swoistości nowotworowej.

Potencjalne markery nowotworowe powinny być oceniane względem ich ekspresji w stanach zapalnych, a ich wartość jako czynników niezależnych powinna być oceniana w kontekście nieswoistych markerów stanu zapalnego. W przeciwnym razie za pomocą wysublimowanych, kosztownych technik uzyskuje się ocenę stanu zapalnego u chorych na nowotwory.

Session 6

Cancer biology I***Biologia nowotworów I***

[33]

All STAT proteins associate with mitochondria in different cell types*Wszystkie rodzaje białek STAT łączą się z mitochondriami w różnych typach komórek***Pravin B. Sehgal**

Departments Cell Biology & Anatomy, and Medicine, New York Medical College, Valhalla, USA

Mitochondrial dysfunction (the “Warburg effect”) and hyperactivation of STAT3 are now well established hallmarks of cancer. At the EFIS 2000 conference in Poznan (organized by Prof. Andrzej Mackiewicz), we raised the possibility, at that time using cell fractionation methods, of the association of STAT3 with mitochondria in Hep3B hepatoma cells. In the last two years widely disparate reports have appeared concerning the association of STAT3 and other STAT proteins with mitochondria. We have therefore re-visited this question. In the present study the association of all seven STAT proteins with the mitochondrial and endosomal compartments was evaluated in human Hep3B hepatocytes, human pulmonary arterial endothelial (HPAEC) and smooth muscle (HPASMC) cells. Hep3B-cell-fractionation data confirmed the constitutive presence of STAT3 and detectable PS-STAT3, but not of PY-STAT3, in Percoll-sucrose gradient analyses corresponding to mitochondria-enriched fractions; however markers for additional cytoplasmic membrane elements were observed in the same fractions. IL-6 markedly increased the association of STAT3, PY-STAT3 and PS-STAT3 with these fractions. Approximately 1% of cytoplasmic STAT3 was constitutively associated with such fractions; this increased to 20-25% upon IL-6 stimulation (the cytoplasmic pool of STAT3 molecules was estimated at 4×10^8 per cell). In the cytoplasm, STAT3-GFP and STAT3-DsdRed were both visible in association with endosomes in IL-6-treated Hep3B cell but none with mitochondria. Nevertheless, immunofluorescence imaging of cultures washed with a digitonin-sucrose buffer prior to fixation (to remove bulk soluble STAT proteins) confirmed the association of STAT3 with mitochondria in Hep3B, HPAEC and HPASMC cells. These imaging studies also disclosed the association of STAT1, STAT2, STAT4, STAT5a, STAT5b and especially STAT6 with mitochondria although with variability between cell types and even among mitochondria within the same cell. STAT6-GFP imaging confirmed the colocalization with mitochondria. These data confirm the association of STAT3 with mitochondria and extend this associative property to all STAT proteins, especially STAT6.

[34]

Targeting cancer stem cells – salinomycin as an example*Terapia celowana z zastosowaniem nowotworowych komórek macierzystych – na przykładzie salinomycyny***Hui Wang¹, Oliver Rothfuss¹, Petra Bareiss², Claudia Lengerke², Marek Los³**¹Interfaculty Institute of Biochemistry, Department of Molecular Medicine, University of Tübingen, Tübingen, Germany²Division of Hematology and Oncology, University of Tübingen Medical Center II, Tübingen, Germany³Department of Clinical and Experimental Medicine (IKE), Integrative Regenerative Medicine Center (IGEN), University of Linköping, Linköping, Sweden

Malignant tumors are composed of cells with varying potential for renewal and proliferation. Accumulating evidence suggest that a subset of cells within tumor, called cancer stem cells (CSCs) are responsible for tumor growth, metastasis development, and recurrence upon therapy. Cancer stem cells are also sufficient to initiate full re-grow of tumors in tumor-transfer experiments in animal models, and they are more resistant to conventional forms of therapy. Thus, several labs search for molecules that show preferential- or selective toxicity towards CSCs. Recent reports show that, human breast cancer stem-like cells are more sensitive to the treatment with an antibiotic salinomycin. However, the mechanism of salinomycin-induced cell death is not well-defined. Salinomycin is a polyether antibiotic and acts in different biological membranes as an ionophore with a preference for potassium. To decipher molecular mechanism(s) of salinomycin toxicity, we have used serum-free mammosphere culture to enrich for cancer stem cells in four breast cancer cell lines: MCF7, SKBR3, BT474 and MDA-MB468. Furthermore, we have utilized model cell lines that either lack- or over-express regulators or effectors of cell death, including: the p53-, Bax/Bak-, and Apaf1-deficient cell lines, as well as Bcl-2, Bcl-xL and caspase-3 over-expressed cell lines. We have found that, salinomycin-induced cell death was p53- and caspase-independent, however, Bax/Bak, Bcl-2, Bcl-xL and Apaf1 were involved. Our data indicate that multiple cell death pathways were engaged upon salinomycin treatment, including apoptosis, necrosis and autophagy. The involvement of mitoptosis, the irreversible changes of mitochondrial structure, and detrimental impairment of crucial mitochondrial functions have also readily been documented. Thus, better understanding of molecular mechanisms of Salinomycin’s anticancer-stem cell activity may assist the discovery of new generation of anticancer drugs that target CSC.

[35]

From stem cells to cancer: novel regulators of micro-RNAs

Od komórek macierzystych do nowotworu: nowe regulatory mikro-RNA

Józef Dulak

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

MicroRNA have been recently identified as the crucial regulators of gene expression and cell differentiation. Among almost 1000 microRNAs identified so far numerous have been recognized as exerting the cell-specific effects. Their expression can be associated with specific tumors growth, and both oncomirs, tumor-suppressor miRNAs or angiomiRs are playing a role in tumor development and progression.

Recently we have demonstrated that heme oxygenase-1, an antioxidant enzyme known to affect various tumors growth and angiogenesis is a potent regulator of microRNA expression. Its deregulated expression, affecting the generation of specific microRNAs can influence the stem/progenitor cells differentiation leading to their uncontrolled proliferation and formation of tumors. The significance of those interactions for development of rhabdomyosarcoma will be discussed.

[36]

Control of tumor angiogenesis normalization to favor reversal of hypoxia

Kontrola neoangiogenezy nowotworowej prowadzi do odwrócenia hipoksji

Claudine Kieda

Centre de biophysique moléculaire CNRS UPR 4301 45071, Orléans

The oxygen partial pressure (PO_2) which is a key component of the physiological state of an organ, results from the balance between oxygen delivery and consumption. Oxygen is transported by red blood cells circulating in a well-organized vasculature. O_2 delivery depends of the metabolic requirements and functional status of each organ and tissue, characterized by its own "tissue normoxia" or "physioxia" status. This state is severely disturbed in pathological conditions as cancer, diabetes, coronary heart disease, stroke etc., associated with decrease in PO_2 : "hypoxia". Monitoring of tissue oxygen grade has both prognostic and therapeutic values. The discrepancy between *in vivo* and *in vitro* tissue and cells oxygen status has detrimental effects on experimental outcomes. "Tissue normoxia" values are ranging between 11% and 1% O_2 while current *in vitro* experimentations are usually performed in 19.95% O_2 thus, an artificial context which might be dangerously misleading, especially when dealing with cancer models and drug activity [1].

Solid tumors are hypoxic and attempt to develop their blood supply by inducing angiogenesis. Tumor oxygen delivery is impaired because vessels are anarchic and leaky, thus contributing to tumor cells spreading. Counteracting hypoxia in tumors is a highly challenging issue.

An allosteric effector of haemoglobin (ITPP), which enters red blood cells (RBCs), selectively enhances O_2 delivery into hypoxic areas [2]. We show, in mouse melanoma, that ITPP-RBCs increase the survival time, eradicate lung metastasis and reduce tumor growth. ITPP-RBCs effect is based on reversing hypoxia-induced proangiogenesis and glycolysis genes expression. This proof-of-concept using ITPP introduces strategic means to effectively normalize intra-tumor vessels providing us with efficient tumor treatment which allows drugs entry and avoids selection of drug-resistant cells.

Hypoxia compensation by an allosteric effector, enhancing the capacity of hemoglobin to release bound oxygen, reestablishing higher oxygen tension in the hypoxic environment, inhibits hypoxia-induced angiogenesis and gives a promising strategy for cancer therapies by restoring physiological level of oxygenation into hypoxic tumor. This could be a strong co factor for drug efficacy. It could be beneficially used to potentialize drugs that are preferentially acting on endothelial cells in the tumor as antivascular agents.

References

1. Carreau A, El Hafny-Rahbi B, Matejuk A, Grillon C, Kieda C. Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter?: Small molecules and hypoxia. *J Cell Mol Med*, doi:10.1111/j.1582-4934.2011.01258.x.
2. Kieda C, Greferath R, Crola da Silva C, Fylaktakidou KC, Lehn JM, Nicollau C. Suppression of hypoxia-induced HIF-1 α and of angiogenesis in endothelial cells by myo-inositol trispyrophosphate-treated erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 15576-15581.

[37]

Pleiotropic effects of plasminogen activator inhibitor-1 in cancer

Pleiotropowe działanie inhibitora aktywatora plazminogenu typu 1 (PAI-1) w chorobie nowotworowej

Czesław S. Cierniewski, Joanna Boncela

Medical University of Lodz and Institute of Medical Biology, Polish Academy of Science, Lodz

Concurrent increased protein expression of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and urokinase-type plasminogen activator (uPA) is a powerful marker of poor prognosis in many different types of solid tumour (ovarian, breast, colorectal cancers). One could expect that PAI-1, being an inhibitor of uPA, will neutralize proteolytic activity in the vicinity of cancer cells and thus will show anti-metastatic activity. Surprisingly, the mechanisms linking PAI-1 expression to tumour malignancy appear to be distinct from that involving its direct role in inhibition of cell surface plasminogen activation. These mechanisms promote cell proliferation, migration and/or de-

adhesion, and involve interactions between PAI-1 and vitronectin or integrins–uPAR–uPA, LDLRs or some other intracellular proteins.

Interestingly, several observations show that PAI-1 may influence different pathways leading to the programmed cell death either promoting or inhibiting this process. For example, recently we provided evidence that PAI-1 interacts with proteasome and affects its activity. Increased PAI-1 expression induced formation of aggresomes and inhibited proteasome activity as evidenced by (a) blocking degradation of degron analyzed after cotransfection of HeLa cells with pCMV-PAI-1 and pd2EGFP-N1, (b) preventing cleavage of natural proteasome substrates such as p53 and I κ B α . Since proteasome inhibition in most cell types has been shown to sway the balance favoring pro-apoptotic signaling, we believe that the upregulated PAI-1 in endothelial cells by modulating proteasome activity may promote apoptosis. Taking all together, we hypothesize that the ability of PAI-1 to interact with proteasome may provide an additional mechanism explaining its opposing effects on endothelial cells and, thus, on vascular remodeling.

Zgodnie z licznymi obserwacjami, równoczesne zwiększone stężenia inhibitora aktywatorów plazminogenu typu 1 (PAI-1) oraz aktywatora plazminogenu typu urokinazowego (uPA) wskazują na złe rokowania choroby nowotworowej. Dotyczy to zwłaszcza raka jajnika, piersi i jelita grubego. Aktywator plazminogenu typu 1 jest swoistym inhibitorem uPA, a więc przy jego dużym stężeniu należałoby spodziewać się zahamowania aktywności proteolitycznej w pobliżu komórek nowotworowych i ograniczenia ich potencjału metastatycznego. Powiązanie dużych stężeń PAI-1 z podwyższoną złośliwością nowotworów nie wynika jednak z jego aktywności inhibitorowej, lecz z wpływu PAI-1 na proliferację komórek, adhezję i migrację, a także apoptozę. Aktywator plazminogenu typu 1 jest białkiem wielofunkcyjnym i oddziałuje nie tylko z u-PA, ale także z witronektyną, kompleksami integryny–uPAR–uPA, receptorem LDLR i z innymi białkami wewnątrzkomórkowymi. Dzięki takim interakcjom PAI-1 modyfikuje przebieg różnych szlaków biochemicznych, również tych, które wiodą do apoptozy. Co więcej, w zależności od warunków może wykazywać zarówno działanie antyapoptotyczne, jak i proapoptotyczne.

W celu wyjaśnienia tak różnorodnych aktywności PAI-1 od wielu lat poszukujemy białek, które z nim oddziałują. Ostatnio wykazaliśmy, że PAI-1 reaguje z proteasomem i hamuje jego aktywność w komórkach śródbłonna. Po zastosowaniu mikroskopii elektronowej oraz zidentyfikowaniu białek przeciwciałami obciążonymi cząstkami złota wykazaliśmy, że PAI-1 indukuje tworzenie wielkich kompleksów proteasomu, które nazywane są aggresomami. Powstaniu tych kompleksów towarzyszyło zahamowanie aktywności proteolitycznej proteasomu a w efekcie tego, akumulacja naturalnych substratów proteasomu, w tym białka p53 oraz I κ B α . W związku z tym, że zablokowanie proteasomu prowadzi zwykle do przesunięcia równowagi w kierunku sygnalizacji proapoptotycznej można sądzić, że podwyższona ekspresja PAI-1 w komórkach śródbłonna nasila zmiany proapoptotyczne. Tak więc reakcja PAI-1 z proteasomem może stanowić mechanizm odpowiedzialny za przeciwstawne efekty tego białka obserwowane w różnych

komórkach, tj. akumulacja PAI-1 we wnętrzu komórek wywołuje zmiany proapoptotyczne, podczas gdy jego uwalnianie działa antyapoptotycznie.

Session 7

Immunotargeting***Immunoterapia celowana***

[38]

Vaccination with salmonella of melanoma metastatic patients*Immunizacja szczepionką opartą na salmonelli chorych na przerzutowego czerniaka***Elisabetta Pennacchioli**

European Institute of Oncology, Milan, Italy

A major obstacle for the development of effective immunotherapy is the ability of tumours to escape the immune system. The possibility to kill tumour cells because they are recognized as infected rather than as malignant, could help to overcome immune-escape mechanisms. Here we report a conceptually new approach of cancer immunotherapy based on *in vivo* infection of tumours and killing of infected tumour cells. Attenuated but still invasive *Salmonella typhimurium* (ST) can be successfully exploited to invade melanoma cells that can present antigenic determinants of bacterial origin and become targets for anti-ST specific T cells. Therefore, tumour cells are killed because they are recognized as infected. Preclinical studies on tumour-bearing mice showed that intratumoral ST-infection is able to induce the recruitment of anti-ST specific T-cells elicited during the vaccination step unto the tumour site for recognition of ST-infected tumour cells. Tumour infection when coupled to anti-ST vaccination leads to 50-100% tumour free mice with a better outcome on larger tumours. This effect is mediated by both CD4 and CD8 T cells as neutralization of these cell types *in vivo* diminishes the antitumor effect. Invasive ST also exert an indirect toxic effect on tumour cells through the recruitment of inflammatory cells and the cross-presentation of tumour antigens, which allow induction of tumour-specific immune response. This is effective in retarding the growth of untreated established distant tumours and in protecting the mice from subsequent tumour challenges.

Since may 2006, 8 patients affected by not operable stage III or IV M1a metastatic melanoma were enrolled in the trial, in order to stimulate an autologous immune response using Vivotif® vaccine and ST (Ty21a) as a therapeutic agent. Two steps were foreseen: oral vaccination with Ty21a and intratumoral treatment with Ty21a. Two metastases were treated and 1 observed in order to evaluate the indirect effect of vaccination. Planned accrual sample size is 43 patients.

Among the 8 enrolled patients, 1 could not be vaccinated due to the evidence of hepatic metastasis during staging, 1 had a rapid worsening of the performance status during vaccination while 2 did not develop adequate anti-ST vaccination titre. Of the remaining 4 patients, only 1 completed the first cycle obtaining a local response, while the other 3 interrupted the treatment due to progressive dis-

ease, important hypersensitivity reaction and a worsening of the hepatic function indexes. At injection, all the patients developed a variable decrease of lumbar pain, nausea/vomiting, shivering, fever, hypotension easily controlled by treatment with antihistaminics, antipyretics, antiemetics without the use of cortisones.

Treated metastases showed all the signs of local inflammation and objective dimensional stabilization or reduction, but systemic disease seem not to be affected by the immunologic treatment.

[39]

Dendritic cell-based vaccine as an adjuvant therapy for cancer patients*Szczepionka oparta na komórkach dendrytycznych w terapii uzupełniającej chorych na nowotwory***Sergiusz Markowicz**

The Maria Skłodowska-Curie Memorial Institute and Cancer Centre, Warszawa

Dendritic cells (DCs), the most potent antigen presenting cells, are used as a natural adjuvant in anticancer vaccines. Multiple DC-vaccine trials aimed to reduce tumor mass in advanced cancer. Although immune responses are often observed following administration of DC-based vaccines, objective clinical response rates are low. So far, only one anti-cancer vaccine, Sipuleucel-T, has been approved by the FDA. This autologous DC-based vaccine prolongs overall survival (OS) in men with metastatic castration-resistant prostate cancer. We designed DC-based vaccine to induce the immune response in melanoma patients without evidence of disease after surgical treatment who remained at a high risk of dissemination. Efficacy of melanoma peptide DC vaccine was evaluated in stage III N1b-N3 melanoma patients after lymphadenectomy (LND). The vaccine was well tolerated and elicited immune responses to melanoma antigens in 15 of 22 patients. Vaccinated patients (n=22) were matched to unvaccinated patients (22 of 869) by sex, number of metastatic lymph nodes, extracapsular involvement, completion or therapeutic LND, Breslow stage (T), and ulceration. 3-year OS rate was 68.2% in the vaccinated group versus 25.7% in the control group, p-value accounting for matching, 0.0290. In the Cox model, the hazard ratio for death of vaccinated patients was 0.31 (95% CI: 0.10- 0.94). The corresponding values for 3-year disease-free survival rate were 40.9% vs. 14.5%; $p = 0.1083$; the hazard ratio of recurrence for vaccinated patients was 0.46 (95% CI: 0.18-1.22). Feasibility and preliminary efficacy of vaccination with lymphoma/DC hybrids was evaluated in 14 patients with indolent B cell lymphoma in remission following a standard chemotherapy. Autologous lymphoma cells were electrofused with either autologous or allogeneic DCs, irradiated and administered to uninvolved lymph nodes under USG guidance. In 9 of 14 patients, vaccination elicited immune response to lymphoma antigens following a standard chemotherapy. Vaccination

with DC/lymphoma hybrids is feasible and safe. Further evaluation of efficacy in terms of clinical response is necessary.

Wyodrębniane z ustroju komórki dendrytyczne (DC) stosuje się w szczepionkach przeciwnowotworowych do prezentacji antygenów. W licznych badaniach klinicznych szczepionek przeciwnowotworowych opartych na wykorzystaniu DC u chorych z uchwytymi klinicznie zmianami nowotworowymi wywoływano odpowiedź immunologiczną na antygeny nowotworowe, ale odsetek uzyskiwanych odpowiedzi klinicznych był niewielki. Jedyną dotąd zarejestrowaną przez Federalną Agencję ds. Leków i Żywności w USA leczniczą szczepionką przeciwnowotworową z DC jest Sipuleucel-T, który wydłuża całkowite przeżycia (OS) u chorych na hormonoopornego raka gruczołu krokowego z przerzutami. W naszych pilotowych badaniach ocenialiśmy dwie różne szczepionki z DC zastosowane jako leczenie uzupełniające chorych na czerniaka skóry i chorych na chłoniaki z komórek B wolnych od klinicznych objawów choroby po leczeniu konwencjonalnym. Szczepionkę z autologicznych DC preinkubowanych z peptydami czerniaka podawano chorym na czerniaka skóry w III stopniu zaawansowania, bez uchwytanych klinicznie zmian nowotworowych, ale z wysokim ryzykiem rozsiewu po limfadenektomii terapeutycznej (stopień N1b-N3). Szczepionka wywołała odpowiedź immunologiczną na antygeny czerniaka u 15 spośród 22 chorych. Odsetek 3-letnich przeżyć całkowitych w grupie szczepionych chorych wynosił 68,2%, i odpowiednio 25,7% w grupie kontrolnej ($n = 22$) dobranej z uwzględnieniem czynników wpływających na rokowanie spośród 869 chorych poddanych LDN ($p = 0.0290$). Współczynnik ryzyka zgonu dla szczepionych: 0,31 (95% CI: 0,10–0,94). Szczepionkę z napromienianych hybryd DC z komórkami chłoniaka podawano 14 chorym na chłoniaka z komórek B o powolnym przebiegu po wcześniejszym uzyskaniu remisji standardowym leczeniem chemicznym. Hybrydy autologicznych komórek chłoniaka z autologicznymi i/lub z alogenicznymi DC uzyskiwano metodą elektrofuzji. Szczepionkę podawano pod kontrolą USG do niezajętych nowotworowo węzłów chłonnych. U 9 spośród 14 chorych wywołano odpowiedź immunologiczną na antygeny chłoniaka. Szczepienie jest wykonalne, bezpieczne i wymaga dalszej oceny skuteczności klinicznej.

[40]

Update on long term survival of high risk melanoma patients immunized with an allogeneic whole cell genetically modified vaccine (AGI-101) after complete resection

Długotrwałe przeżycia chorych na czerniaka z usuniętymi przerzutami immunizowanych alogeniczną komórkową szczepionką czerniakową (AGI-101)

Andrzej Mackiewicz¹, Piotr J. Wysocki¹, Jacek Mackiewicz¹, Maciej Wiznerowicz², Małgorzata Kapcińska¹, Maria Łaciak¹, Stefan Rose-John³, Dariusz Iżycki¹, Christian Ottensmeier³, Tomasz Burzykowski⁴, Aldona Karczewska-Dzionk¹

¹Chair of Medical Biotechnology, University of Medical Sciences, Greater Poland Cancer Centre, Poznan

²Institute of Pathophysiology, Kiel, Germany

³Department of Medical Oncology, Southampton University Hospitals, UK

⁴Institute Biostatistics and Biostatic Informatics, Hasselt University, Diepenbeek, Belgium

AGI-101 comprises two irradiated melanoma cell lines modified to express Hyper-IL-6 – a fusion protein composed of interleukin 6 (IL-6) and soluble IL-6 receptor. Two sequential phase II open-label, single institution clinical trials were carried out in patients with completely resected stage IIIB, IIIC and IV melanoma. The primary objective of each trial was to evaluate disease free survival (DFS). The secondary end-points were toxicity and overall survival (OS). DFS and OS were calculated from the time of the first vaccine administration. AGI-101 (5×10^7 cells per dose) was administered 8 times at 2-week intervals (induction phase) and then monthly (maintenance phase). At disease progression the induction phase (+/- surgery) was restarted, followed by a 2nd maintenance phase. Patients remained on study until progression required other systemic treatment, until death or withdrawal of consent.

Trial 3 enrolled 97 patients between December 1996 and August 2001, with resected stage IIIB (42), IIIC (32) and IV disease (23). Trial 5 recruited 99 patients between 2002 and June 2005 with resected stage IIIB (32), IIIC (50) and IV disease (17).

The vaccine was well tolerated as no vaccine related toxicity of CTC>2 was detected. At median follow up of 11 and 7 years respectively 33 patients in Trial 3 and 29 patients in Trial 5 did not develop progression of the disease. Progression was stage dependent.

The probability of surviving 5 years (trial 3) without progression was 34% (95% CI: [24.8%, 43.4%]). The median DFS was 1.8 years (95% CI: [1.1, 2.9]). The probability of surviving 5 years without progression was 54.8% (95% CI: [38.7%, 68.3%]), 25.0% (95% CI: [11.8%, 40.7%]), and 8.7% (95% CI: [1.5%, 24.2%]) for stage IIIB, IIIC, and IV, respectively.

The probability of surviving 5 years (trial 5) without progression was 28.3% (95% CI: [19.8%, 37.3%]). The median DFS time was 1.6 years (95% CI: [1.0, 2.0]). The probability of surviving 5 years without progression was 40.6% (95% CI: [23.7%, 56.8%]), 24.0% (95% CI: [13.3%, 36.4%]), and

17.7% (95% CI: [4.4%, 38.3%]) for stage IIIB, IIIC, and IV, respectively.

The probability of surviving 5 years (trial 3) was 49.5% (95% CI: [39.2%, 58.9%]). The median OS time was 4.4 years (lower 95% CI limit: 3.1 years). The probability of surviving 5 years was 66.7% (95% CI: [50.3%, 78.7%]), 43.8% (95% CI: [26.5%, 59.8%]), and 26.1% (95% CI: [10.6%, 44.7%]) for stage IIIB, IIIC, and IV, respectively.

The probability of surviving 5 years (trial 5) was 45.3% (95% CI: [35.3%, 54.8%]). The median OS time was 3.1 years (lower 95% CI limit: 2.3). The probability of surviving 5 years was 56.3% (95% CI: [37.6%, 71.3%]), 39.8% (95% CI: [26.3%, 53.0%]), and 41.2% (95% CI: [18.6%, 62.6%]) for stage IIIA/B, IIIC, and IV, respectively.

At progression 43 (Trial 3) and 39 (Trial 5) patients were re-induced +/- surgery followed by a 2nd maintenance phase; of those 11 and 16 patients respectively are alive following re-induction.

The results indicate that AGI-101 is well tolerated and extended both DSF and OS of advanced melanoma patients. Re-induction with a dose intensive regimen, especially when combined with surgery, can result in further disease stabilization and secondary disease-free survival.

[41]

New strategies in the treatment of advanced melanoma – anti-CTLA4

Nowe strategie leczenia zaawansowanego czerniaka – blokada CTLA-4

Renata Zaucha

Medical University of Gdansk

Median time of overall survival of patients with stage IV metastatic malignant melanoma is about 8 months with less than 10% surviving 5 years. Dacarbazine is the only approved treatment for those patients giving about 15% of objective responses lasting for a median of 4 months. Other combined chemotherapy or biochemotherapy regimens evaluated in phase III clinical trials have failed to demonstrate a survival benefit compared with dacarbazine alone. Single agent high-dose interleukin 2 (IL-2) has been shown to increase the response rate however without improving the time of overall survival, and at the cost of serious adverse events including hemodynamic toxicity, decreased renal function and respiratory insufficiency. At present improved treatment results have been achieved by monoclonal anti-CTLA4 antibodies shown to induce anticancer responses by blocking systemic mechanisms of immunosuppression. CTLA4 competes with CD28 in binding to B7 thus further downregulating T-cell activation. Published in 2010 results of clinical trials have shown that single agent anti-CTLA4 antibodies improve median time of overall survival to 10.1 months in 70% of patients. In 10.9% of patients long lasting, late onset responses have been preceded by transient disease progression. Anti-CTLA4 antibodies enhance immune response causing unusually reported in oncology adverse events like autoimmune enterocolitis,

hepatitis, dermatitis or hypophyseal insufficiency which are fatal in 2-3% of patients.

To summarize: a 20% significant clinical benefit achieved with anti-CTLA4 monoclonal antibodies in patients with advanced metastatic malignant melanoma justifies implementing this type of treatment into the everyday practice despite the lack of predictive factors.

Mediana czasu przeżycia chorych na czerniaka złośliwego w IV stopniu zaawansowania wynosi ok. 8 miesięcy, a 5-letnie przeżycia dotyczą mniej niż 10% chorych. Jedynym zarejestrowanym w tym wskazaniu lekiem jest dakarbazyna dająca 15% obiektywnych odpowiedzi o medianie czasu trwania ok. 4 miesięcy. W żadnym badaniu III fazy nie wykazano wyższej skuteczności schematów wielolekowych z udziałem dakarbazyny i innych cytostatyków czy leków biologicznych. Interleukina 2 w monoterapii, podawana w wysokich dawkach także nie ma wpływu na czas przeżyć całkowitych, chociaż nieznacznie zwiększa wskaźnik odpowiedzi. Odbywa się to kosztem poważnych działań niepożądanych, takich jak powikłania hemodynamiczne, niewydolność nerek czy niewydolność oddechowa. Obecnie nadzieje na poprawę wyników leczenia wiąże się z zastosowaniem przeciwciał monoklonalnych anti-CTLA4, które hamują ogólnoustrojowe mechanizmy immunosupresji, indukując odpowiedź przeciwnowotworową. Powodem tego jest konkurencja CTLA4 z CD28 o antygen B7, ponieważ do aktywacji limfocytów T niezbędne jest połączenie CD28 z B7. Opublikowane w 2010 r. wyniki badań wykazały, że ipilimumab stosowany w monoterapii u przeleczonych pacjentów spowodował wydłużenie mediany czasu przeżycia całkowitego do 10,1 miesiąca. Długotrwałe odpowiedzi na leczenie obserwowano późno, u 10,9% chorych po początkowym okresie progresji. Wpływ przeciwciał anti-CTLA4 na układ odpornościowy jest powodem niespotykanych dotąd w onkologii objawów niepożądanych, takich jak autoimmunologiczne zapalenie jelit, wątroby, skóry czy niewydolność przysadki, które u 2-3% chorych są śmiertelne. Podsumowując – 20-procentowy znamieny zysk kliniczny, jaki przyniosło chorym na zaawansowanego czerniaka leczenie anti-CTLA4, usprawiedliwia wprowadzenie tej terapii do codziennej praktyki pomimo braku czynników predykcyjnych uzyskania odpowiedzi.

[42]

Role of immunotherapy in patients with non-small cell lung cancer – multicenter clinical trials

Rola immunoterapii w leczeniu chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca na podstawie wieloośrodkowych badań klinicznych

Łukasz Szychalski, Maciej Bryl, Rodryg Ramlau, Aleksander Barinow-Wojewódzki

Wielkopolskie Centrum Pulmonologii i Torakochirurgii w Poznaniu

Rak płuca jest główną przyczyną zgonów spowodowanych chorobą nowotworową na świecie, w tym niedrobnokomórkowego raka płuca.

komórkowy rak (NDRP) płuca stanowi ok. 85% przypadków. Analiza doniesień naukowych wskazuje, że tradycyjne metody leczenia onkologicznego NDRP osiągnęły maksimum skuteczności. Obecnie badaniom poddaje się różnorodne nowe podejścia terapeutyczne, których zadaniem jest poprawa wyników leczenia. Pomimo wielu lat badań z zastosowaniem immunoterapii w przebiegu NDRP nie udało się uzyskać znamiennej pozytywnych 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, jak również w zaawansowanym stadium choroby.

Najlepsze wyniki uzyskano 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.

[43]

Targeted therapy in prevention and treatment of metastatic bone lesions

Terapie celowane w profilaktyce i leczeniu zmian wtórnych w kościach u chorych na nowotwory złośliwe

Wojciech Rogowski

Oddział Kliniczny Chemioterapii, Zakład Opieki Zdrowotnej Ministerstwa Spraw Wewnętrznych i Administracji z Warmińsko-Mazurskim Centrum Onkologii w Olsztynie

Perturbations in the balance between bone formation and resorption can lead to generalized osteoporosis (resulting from estrogen deficiency and aging) or local bone lysis (resulting from rheumatoid arthritis and bone metastases). The RANK-RANK ligand system has been identified as an essential mediator of osteoclast formation, function, and survival. RANK ligand binds RANK on osteoclasts or osteoclast precursors to stimulate or promote differentiation into osteoclast and activate mature osteoclasts to resorb bone. Therefore, RANK ligand is a therapeutic target for diseases associated with increased bone resorption.

Denosumab is a fully human monoclonal IgG2 antibody to RANK ligand that binds with high affinity and specificity to RANK ligand. This binding prevents the activation of RANK and inhibits the formation, activation, and survival of osteoclasts, the result of which is a reduction in the number and function of osteoclasts and, consequently, a decrease in bone resorption and an increase in cortical and trabecular bone mass, volume, and strength. Denosumab is highly specific because it binds only to RANK ligand and does not bind other members of the tumor necrosis factor (TNF) family.

The clinical impact of monoclonal antibodies in prevention and treatment of bone metastases will be presented.

W czasie całego życia człowieka w kości przebiegają dwa główne procesy metaboliczne: modelacja i remodelacja. W okresie dziecięcym i dojrzewania procesem dominującym jest modelacja kości, w wyniku której zostaje osiągnięta właściwa masa, wielkość oraz kształt szkieletu. W dojrzałym organizmie procesy modelacji ustępują miejsca procesom remodelacji kostnej, która ma za zadanie utrzymanie odpowiedniej masy szkieletu, a także uczestniczy w naprawie.

W zdrowej kości równowaga między procesami jej powstania i resorpcji (tzw. remodeling) nie jest zakłócona, ponieważ aktywność osteoblastów i osteoklastów jest zrównoważona. W wielu nowotworach (szpiczak mnogi, stadium przerzutowe raka piersi lub płuc) dochodzi do stopniowej demineralizacji tkanki kostnej. Proces ten jest spowodowany wzrostem aktywności i liczby osteoklastów.

Prawidłowa przebudowa kości jest uwarunkowana dynamiczną równowagą w układzie cytokin wydzielanych głównie przez osteoblasty spośród których, istotną rolę odgrywa RANKL (ligand receptora aktywującego jądrowy czynnik NF- κ B), stymulującego dojrzewanie i aktywność osteoklastów poprzez receptor RANK oraz osteoprotegereyna (OPG), która hamuje ten proces poprzez wiązanie się z RANKL. W przebiegu wielu nowotworów często dochodzi do osteolizy. Komórki nowotworowe syntetyzują bowiem wiele cytokin, które wpływają na układ RANK/RANKL/OPG przez zahamowanie powstania OPG i jej degradację. Równocześnie dochodzi do wzrostu ekspresji RANKL. Procesy te, prowadzą do zwiększonej osteoklastogenezy, aktywacji osteoklastów, a to powoduje istotny spadek masy kostnej. RANKL bowiem poprzez wiązanie się z RANK wywołuje kaskadę sygnałową wewnątrz komórki dojrzewającego osteoklastu, co prowadzi do powstania w pełni aktywnej komórki resorpcyjnej kości.

Poznanie mechanizmów osteolizy nowotworowej pozwoliło na podjęcie prób jej zahamowania przez stosowanie związków hamujących aktywność RANKL lub stymulujących aktywność OPG.

Zastosowanie ludzkich przeciwciał monoklonalnych wysoce swoistych wobec RANKL (Denosumab) blokuje wiązanie RANKL do RANK i tym samym utrudnia osteoklastogenezę. Skuteczność antyosteolityczna tych immunoglobulin, została potwierdzona w badaniach klinicznych u pacjentów chorujących na raka prostaty i piersi lub szpiczaka mnogiego.

Zaprezentowane zostaną implikacje kliniczne wpływu na układ RANK/RANKL/OPG.

Lecture sponsored

Wykład sponsorowany

[44]

Single cell PCR in cancer research and future diagnostic applications

PCR jednej komórki w badaniach i w przyszłości, w diagnostyce nowotworów

A. Toegl

Munich

Session 8

Personalization of targeted therapy II

Personalizacja terapii celowanej II

[45]

Current approaches to discovery of new polymorphisms of pharmacogenomic importance

Aktualne podejścia do nowo odkrytych polimorfizmów o znaczeniu farmakogenomicznym

Mark J. Ratain

Department of Medicine, Comprehensive Cancer Center, and Center for Personalized Therapeutics, The University of Chicago, Chicago, Illinois, USA

Although there are millions of variants in the human genome, only a small minority are known to be of importance in the context of drug response. Traditionally, the search for such polymorphisms has focused on known candidate genes, such as drug-metabolizing enzymes, drug transporters, and known targets. The search for functional variants subsequently expanded to drug pathways, and more recently to the entire genome using standard genome-wide platforms. Both candidate and genome-wide approaches have advantages and disadvantages; the candidate approach has the advantage of a higher pre-test probability, whereas the genome-wide approach is unbiased and allows the discovery of functional variants in novel genes. In either case, and particularly in the context of genome-wide studies, it is important to conduct subsequent studies to confirm the preliminary findings, ideally replication in a similar or identical data set. In addition, functional studies are often warranted, particularly when variants of unknown function or relation to the drug have a strong association. Replication is currently the greatest challenge in pharmacogenomics, as contemporaneous studies of the same drugs (in the same dosages and disease setting) are rarely conducted. Thus, there is great value in establishing data sets of prospectively phenotyped patients treated in a consistent manner with accompanying germline DNA.

[46]

Polymorphisms as predicting factors for response of cancer targeted therapies and chemotherapy

Polimorfizmy jako czynniki predykcyjne odpowiedzi na leczenie celowane nowotworów i chemioterapię

Sergiusz Nawrocki

Zakład Radioterapii, ZOZ MSWiA z Warmińsko-Mazurskim Centrum Onkologii w Olsztynie

Rash is commonly seen during anti-EGFR (*epithelial growth factor receptor*) therapy.

Rash intensity is proportional to the therapeutic effect of anti-tumor therapy. Patients who benefit from the anti-EGFR therapy develop rash earlier (in first weeks of therapy) and its clinical course is more severe than in patients without benefit. Rash intensity seems to be independent of tumor characteristics (tumor histopathology, anatomical localization or molecular features). Data from clinical trials have shown that severe rash is associated with clinical benefit in pancreatic cancer, lung cancer and colon cancer, therefore it seems that rash is independent of tumor phenotype but rather is defined by patient's genotype.

Authors are trying to find out if certain polymorphisms of EGFR intron-1 gene's are associated with rash intensity in patients with different diagnoses treated with anti-EGFR monoclonal antibodies. Results from 20 patients are to be presented. Patients were treated with cetuximab or panitumumab. DNA was isolated from the whole blood, polymorphic region of intron-1 was then amplified with specific PCR. DNA sequence of amplicon was determined and correlated with clinical data – rash occurrence and its intensity.

Wysypka trądzikopodobna (*rash*) występuje często jako działanie uboczne grupy leków hamujących EGFR (*epithelial growth factor receptor*). Jej nasilenie jest skorelowane z efektem terapeutycznym – chorzy reagujący dobrze na leczenie z reguły prezentują wysypkę wcześniej (w pierwszych tygodniach leczenia) i jej natężenie jest większe niż u chorych nieodpowiadających na leczenie. Występowanie wysypki wydaje się niezależne od rodzaju i lokalizacji nowotworu – wysypka jest korzystnym czynnikiem prognostycznym podczas leczenia inhibitorami EGFR raka trzustki, raka płuca jak też raka jelita grubego. Jej występowanie i nasilenie jest prawdopodobnie niezależne od genotypu czy fenotypu guza, a raczej ma związek z genotypem zdrowych komórek pacjenta.

Autorzy podjęli próbę odpowiedzi na pytanie, czy określone polimorfizmy intronu 1 genu kodującego EGFR mogą mieć związek z nasileniem wysypki trądzikopodobnej u chorych na różne nowotwory, leczonych przeciwciętami monoklonalnymi hamującymi EGFR.

W pracy przedstawiono wyniki badań własnych w grupie 20 chorych. Od chorych pobierano krew, z której izolowano DNA, za pomocą PCR amplifikowano polimorficzny region intronu 1 genu kodującego EGFR; amplicon był następnie poddawany sekwencjonowaniu. Wyniki sekwen-

cjonowania skorelowano z pochodzącymi z historii chorób informacjami dotyczącymi czasu wystąpienia i nasilenia wysypki w przebiegu leczenia cetuksimabem i panitumumabem.

[47]

Can we optimize the use of monoclonal antibodies in oncology?

Czy możemy zoptymalizować leczenie przeciwciałami monoklonalnymi w onkologii?

Pere Gascon

Hospital Clínic, Barcelona

Monoclonal antibody (MoAb)-based therapeutics have gained widespread recognition and are widely used in oncology. There are part of common clinical practice in certain pathologies against specific molecular targets. Nevertheless, MoAbs when used as a monotherapy provide very discrete responses, ranging from 10 to 20% in most cases. The most utilized MoAb nowadays are: cetuximab and panitumumab in colorectal cancer (CRC) against EGFR. Trastuzumab and bevacizumab in breast cancer against HER2 and VEGF respectively, rituximab in non-Hodgkin's lymphoma against CD20 and, ipilimumab in malignant melanoma against CTL4A. It appears that the promise of the "magic bullet" and the "proof of concept" has largely been realized. There are currently 23 MoAbs approved by the FDA for clinical use and hundreds are in clinical trials for treatment of various diseases including cancer. Currently, second and third generations of antibodies are under development, mostly to improve already existing antibody specificities. However, although the refinement of already known methodologies is certainly of great importance for potential clinical use, except for rituximab, the response rate is rather discrete for the rest of the commercially used MoAbs. One of the main unanswered questions in the area is the following: Have we considered the immune system in our clinical strategies? Are we satisfied with induction of apoptosis as the main mechanism of action for *in vivo* use of MoAbs? Recent publications indicate that ADCC mechanism has been almost neglected by clinical investigators, and that it has the potential to improve our response rate and to optimize our clinical results. Natural killer cells (NKC) produce T cell-recruiting chemokines in response to antibody-coated tumor cells and have shown to modulate *in vivo* cytotoxicity against tumor targets. Interleukin-2, interferon-gamma and interleukin-21 all are known factors to increase NKc activity and consequently to increase, at least theoretically, their cytotoxicity capabilities. Results in murine models have shown that Fc receptors modulate *in vivo* cetuximab and trastuzumab cytotoxicity. In addition, murine xenografts with cetuximab have shown a marked potentiation of its antitumor activity when combined with IL-2. Recently, some authors have brought the concept that MoAbs not only trigger early anti-tumor events (receptor blockage, cytostasis, apoptosis, CDC and/or ADCC) but also

allow the host immune system to fight the tumor cells through the development of long-lasting adaptive immunity. These results should encourage the development of clinical trials designed to optimize the use of MoAbs and in consequence improve our current results.

References

1. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate *in vivo* cytotoxicity against tumor targets. *Nature Med* 2000; 6: 443-6.
2. Eisenbeis CF, Grainger A, Fischer B, et al. Combination immunotherapy of B-cell non-Hodgkin's lymphoma with rituximab and interleukin-2: a preclinical and phase I study. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 6101-10.
3. Parihar R, Nadella P, Lewis A, et al. A phase I study of interleukin 12 with trastuzumab in patients with human epidermal growth factor receptor-2-overexpressing malignancies: analysis of sustained interferon gamma production in a subset of patients. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 5027-37.
4. Roda JM, Parihar R, Magro C, Nuovo GJ, Tridandapani S, Carson WE 3rd. Natural killer cells produce T cell-recruiting chemokines in response to antibody-coated tumor cells. *Cancer Res* 2006; 66: 517-26.
5. Kimura H, Sakai K, Arai T, Shimoyama T, Tamura T, Nishio K. Antibody-dependent cellular cytotoxicity of cetuximab against tumor cells with wild-type or mutant epidermal growth factor receptor. *Cancer Sci* 2007; 98: 1275-80.
6. Roda JM, Joshi T, Butchar JP, et al. The activation of Natural Killer Cell effector functions by Cetuximab-coated epidermal growth factor receptor-positive tumor cells is enhanced by cytokines. *Clin Cancer Res* 2007;13: 6419-28.
7. Hara M, Nakanishi H, Tsujimura K, et al. Interleukin-2 potentiation of cetuximab antitumor activity for epidermal growth factor receptor-overexpressing gastric cancer xenografts through antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Cancer Sci* 2008; 99: 1471-8.
8. Roda JM, Parihar R, Lehman A, et al. Interleukin-21 enhances NK cell activation in response to antibody-coated targets. *J Immunol* 2006; 177: 120-9.
9. Abès R, Teillaud JL. Modulation of tumor immunity by therapeutic monoclonal antibodies. *Cancer Metastasis Rev* 2011; 30: 111-24.

[48]

Molecular basis of novel treatment strategies of advanced melanoma

Molekularne podstawy nowych strategii leczenia w zaawansowanym czerniaku

Piotr J. Wysocki

Wielkopolskie Centrum Onkologii w Poznaniu

Przez wiele lat możliwości systemowego leczenia zaawansowanego czerniaka były bardzo ograniczone. Klasyczne leki o działaniu cytotoksycznym, takie jak dakarbazyna, czy kombinacje różnych chemioterapeutyków umożliwiały jedynie uzyskanie obiektywnych odpowiedzi klinicznych u pojedynczych chorych, natomiast nie miały żadnego wpływu na czas całkowitego przeżycia. Jednocześnie próby nieswoistej immunoterapii z użyciem cytokin, będące konsekwencją koncepcji immunogenności czerniaka oprócz wysokiej toksyczności nie dawały praktycznie żadnych korzyści klinicznych. Leki ukierunkowane molekularnie (szczególnie o działaniu antyangiogennym), które zostały wprowadzone do leczenia wielu nowotworów w połowie

ubiegłej dekady były bez powodzenia testowane w leczeniu zaawansowanego czerniaka. Zdefiniowanie szlaków molekularnych i krytycznych kinaz aktywujących niekorzystne procesy komórkowe zapobiegające apoptozie i umożliwiające przeżycie, proliferację, przerzutowanie i angiogenezę stanowiły podstawę do rozpoczęcia badań nad lekami wybiórczo hamującymi te cele molekularne. Hamowanie kinazy BRAF okazało się indukować obiektywne odpowiedzi kliniczne u chorych z czerniakiem z mutacją V600E genu *BRAF*. Podobnie, w czerniaku wywodzącym się z błon śluzowych i pod paznokciowym w przypadku obecności mutacji genu *C-KIT* obserwowano wyraźne korzyści kliniczne z zastosowania imatinibu.

W ubiegłym wieku zdefiniowano kilka molekularnych mechanizmów ograniczających możliwości aktywacji antygenowo-swoistej odpowiedzi przeciwnowotworowej. Jeden z nich polegał na hamowaniu funkcji komórek dendrytycznych w wyniku blokowania receptorów CD80 i CD86 na ich powierzchni przez immunosupresyjne białko powierzchniowe CTLA4. Opracowanie przeciwciał monoklonalnych wiążących CTLA4 umożliwiło spektakularną aktywację antygenowo-swoistych mechanizmów immunologicznych. Ipilimumab, ludzkie przeciwciało monoklonalne, jest pierwszym lekiem, który istotnie wydłużył czas przeżycia chorych z zaawansowanym czerniakiem. W badaniu III fazy ipilimumab w porównaniu z eksperymentalną szczepionką, w drugiej linii leczenia u chorych po niepowodzeniu chemioterapii wydłużył medianę czasu przeżycia chorych z 6,4 do 10,0 miesięcy. Pomimo wysokiej toksyczności związanej z aktywacją procesów autoimmunologicznych ipilimumab stał się przełomowym lekiem w terapii zaawansowanego czerniaka i jest pierwszym lekiem, który w XXI w. uzyskał rejestrację Amerykańskiej Agencji ds. Żywności i Leków (*Food and Drug Administration* – FDA) do leczenia tego nowotworu.

[49]

Expression and targeted inhibition of immunoregulatory protein, galectin-1 in classical Hodgkin lymphoma and post-transplant lymphoproliferative disorder

Ekspresja i celowana inhibicja białka immunoregulatorowego galektyny 1 w terapii chłoniaka Hodgkina i poprzyszczepowej chorobie limfoproliferacyjnej

Przemysław Juszczynski

Institute of Hematology and Transfusion Medicine, Warsaw, Poland

Family of galectins comprises 15 proteins characterized by the presence of evolutionarily conserved carbohydrate-binding domain (CBD). The prototype member of the family, galectin-1 (LGALS1, Gal-1) plays a major immunoregulatory role. By selective binding of N-acetylglucosamine units decorating surface receptors such as CD45, CD43 i CD, Gal-

1 can induce apoptosis in Th1, Th17 and cytotoxic CD8+ lymphocytes. Owing to differential terminal sialylation of these receptors, Treg and Th2 surface receptors do not bind Gal-1 and resist Gal-1 proapoptotic effect. In addition, Gal-1 can tolerize dendritic cells. Immunomodulatory mechanisms of Gal-1 are utilized by neoplastic Reed-Sternberg (RS) cells in classical Hodgkin lymphoma (cHL) and by lymphoblasts in EBV-driven posttransplant lymphoproliferative disorders (PTLD). Gal-1 expression in these diseases is induced by a common molecular mechanism dependent on AP-1 transcription factor activity, binding to the enhancer element in the *LGALS1* gene. Selective inhibition of Gal-1 expression by RNA interference in RS cells cocultured with activated T cells increased the fraction of surviving Th1 cells and restored Th1/Th2 cytokine balance. These observations suggest that Gal-1 blockade might be a selective therapeutic approach limiting the immunomodulatory effects of RS cells. Since Gal-1 is a secretory/surface protein, it might be targeted with an antibody. After generating the panel of Gal-1 specific antibodies, we assessed their neutralizing activity in *in vitro* and *in vivo* models. In both experimental systems, Gal-1 antibodies efficiently neutralized proapoptotic effect of recombinant and endogenous lectin and delayed growth of syngeneic tumor cells transplanted to mice. Taken together, these studies indicate that Gal-1 is a rational therapeutic target in cHL, PTLD and likely other malignancies expressing this protein.

Rodzina galektyn obejmuje 15 białek, charakteryzujących się obecnością konserwowanej ewolucyjnie domeny CBD (*carbohydrate-binding domain*). Prototypowe białko tej rodziny, galektyna 1 (LGALS1, Gal-1) odgrywa istotną rolę immunomodulatoryjną. Poprzez selektywną zdolność wiązania podjednostek N-acetylolaktosaminy powierzchniowych receptorów, m.in. CD45, CD43 i CD7, może wybiórczo indukować apoptozę w limfocytach Th1, Th17 oraz cytotoksycznych limfocytach CD8+. Ze względu na odmienną konfigurację terminalnego przyłączenia kwasu siałowego w limfocytach Treg i Th2, ich receptory powierzchniowe nie wiążą Gal-1 i są niewrażliwe na jej proapoptotyczne działanie. Gal-1 promuje ponadto tolerogenność komórek dendrytycznych. Immunomodulatoryjne mechanizmy indukowane przez Gal-1 są wykorzystywane przez komórki Reed-Sternberga (RS) klasycznego chłoniaka Hodgkina (cHL) i przez limfoblasty EBV-zależnych limfoproliferacji potransplantacyjnych (PTLD). Ekspresja Gal-1 w tych chorobach ma wspólne mechanizmy molekularne zależne od aktywności czynnika transkrypcyjnego AP-1, wiążącego się w obrębie sekwencji wzmacniających w genie *LGALS1*. W badaniach *in vitro* polegających na koinkubacji aktywowanych limfocytów T z komórkami RS, zablokowanie ekspresji Gal-1 na drodze interferencji RNA prowadziło od zwiększenia odsetka przeżyjących limfocytów Th1 i przywrócenia równowagi cytokinowej między populacjami Th1 i Th2. Obserwacje te wskazują, że blokada ekspresji Gal-1 mogłaby hamować immunomodulatoryjny wpływ komórek nowotworowych na mikrośrodowisko. Ponieważ Gal-1 jest białkiem sekrecyjnym/powierzchniowym, jego aktywność może być hamowana przez zastosowanie odpowiedniego przeciwciała. Działanie neutralizujące wygenerowanych prze-

ciwciał monoklonalnych anty-Gal-1 oceniono w modelach *in vitro* i *in vivo*. W obu modelach eksperymentalnych otrzymane przeciwciała neutralizowały proapoptotyczne działanie rekombinowanej i endogennej Gal-1 i hamowały wzrost przeszczepianych myszom syngenicznych komórek nowotworowych. Badania te wskazują, że Gal-1 stanowi racjonalny cel immunoterapii CHL i PTLD oraz innych nowotworów produkujących to białko.

[50]

Electrochemotherapy: from palliation to a consolidated treatment

Elektrochemioterapia: od paljacji do terapii skonsolidowanej

Elisabetta Pennacchioli

European Institute of Oncology, Milan, Italy

A new, promising application of bleomycin was discovered and developed by Mir in 1991, combining the drug with electroporation. This new technique was called electrochemotherapy (ECT). The new treatment is based on the increased bleomycin delivery into tumor cells after cell permeabilization by electric pulses administered locally at the solid tumor site. More than 300 articles were published on this topic and experiences from many institutes in Europe seems to be very promising. ECT is currently used for the treatment of cutaneous and subcutaneous tumoral lesions from different tumoral types. Favorable results in treating superficial metastatic lesions have been published with a complete response rate for treated nodules ranging from 70% to 90%. Experience in our Institution confirm very good results and excellent safety profile of ECT with bleomycin.

Between 2006 and 2010, 127 patients (108 evaluable) have been treated for superficial cancer lesions: metastatic melanoma (87 patients) and squamous or basal cell carcinoma and other superficial tumors (21 patients). The overall response rate (OR) was 88% with a complete response rate (CR) of 72% in melanoma lesions and OR of 76% and CR of 67% in non melanoma lesions. Only 12/108 (11%) patients experienced relapse in the treated field. The treatment was well tolerated either under general or local anaesthesia with minimal side effects.

Furthermore in our institution we are currently evaluating development of immune responses elicited by ECT, by comparing serum levels of pro-inflammatory cytokines, and frequency and activation of T cell populations in peripheral blood of selected patients, before and after therapy.

Session 9

New targets and therapy development**Nowe cele oraz rozwój terapii**

[51]

New treatment algorithms of biologic treatment in metastatic renal cancer*Nowe algorytmy terapii biologicznej w przypadku raka nerki z przerzutami***Cezary Szczylik**

Department of Oncology, Military Medical Institute, Warsaw

Renal cell carcinoma is the most frequent occurring solid lesion within the kidney and comprises different RCC types with specific histopathological and genetic characteristic. There is a 1,5 : 1 predominance of men over women, with the peak incidence

Renal cell carcinoma represents 2-3% of all cancers, with the highest incidence occurring in the more developing countries. The worldwide and European annual increase in incidence is approximately 2%. Every year approximately 30 000 new RCC cases are registered in EU countries and 15 000 died of the disease. Renal cell carcinoma detection in recent years is improved due to increased numbers of imaging techniques such as ultrasound and computerized tomography. Despite the increased incidental detection rate, the mortality from RCC remained unaffected and parallel to incidence (EAU report).

The leading cause of malignant proliferation in sporadic clear cell RCC is HIF (hypoxia inducible factor) accumulation due to VHL (von Hippel-Lindau) gene inactivation with subsequent overexpression of VEGF and PDGF, both promoting angiogenesis. Recently many active antiangiogenic drugs have been developed and approved both in USA and EU for treatment of metastatic renal cell carcinoma: sorafenib, sunitinib, temsrolimus, everolimus, avastin and pazopanib. The objectives of presentation are to evaluate the growing body of knowledge regarding clinical and molecular characteristics of novel compounds and data from recent clinical trials. Data from clinical trials will be reviewed to define algorithms of treatment of metastatic renal cell carcinoma.

[52]

New targets in therapy of gastrointestinal stromal tumors*Nowe cele w terapii nowotworów podścieliska przewodu pokarmowego***Piotr Rutkowski**

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

Gastrointestinal stromal tumors (GISTs) comprise a recently defined entity of the most common mesenchymal neoplasms of the gastrointestinal tract. Advances in the understanding of the molecular mechanisms of GIST pathogenesis have resulted in the development of a treatment approach which has become a model of targeted therapy in oncology. Several clinical trials have been conducted that confirmed high efficacy of imatinib (inhibiting BCR-ABL, KIT, PDGFR) in the treatment of advanced GIST. The association between the mutational status and the response to imatinib is well documented – tumors containing the most common exon 11 *KIT* mutation have the highest response rate (> 80%). In case of GIST resistant to imatinib the second line therapy with sunitinib malate is registered. Sunitinib malate, an oral multitargeted tyrosine kinase inhibitor of KIT and PDGFRs, as well as vascular endothelial growth factor receptors (VEGFRs), FMS-like tyrosine kinase-3 (FLT3), colony-stimulating factor 1 receptor (CSF-1R), and glial cell-line-derived neurotrophic factor receptor (REarranged during Transfection; RET). If imatinib and sunitinib therapy fails clinical trials with novel agents are ongoing. The first strategy in the treatment of standard therapy-refractory advanced GISTs is applying receptor tyrosine kinase (RTK) inhibitors with activity on several target RTKs (including KIT) and with inhibitory effects against some imatinib-resistant mutants (as nilotinib – AMN107, sorafenib, dasatinib, masatinib, AMG706, PKC412, BAY 73-4506 regorafenib and alternative drugs as antibodies against PDGFR). The second strategy are investigations on different signaling pathways as PI3K/AKT, RAS/RAF, MEK/MAPK, IGF1R/mTOR, and influencing on regulation of KIT/PDGFR expression with heat shock protein 90 or histone deacetylase inhibitors.

Nowotwory podścieliskowe przewodu pokarmowego (*gastrointestinal stromal tumor* – GIST) to najczęstszy typ mięsaka, który dzięki postępowi w poznaniu jego patogenetycznych mechanizmów molekularnych stał się modelem skutecznego leczenia ukierunkowanego molekularnie w onkologii. W przypadkach zmian nieoperacyjnych lub rozsiażonych (a także w leczeniu uzupełniającym po resekcji GIST o znaczącym ryzyku nawrotu) leczeniem z wyboru jest zastosowanie inhibitora kinaz tyrozynowych (m.in. BCR-ABL, KIT i PDGFR) – imatinibu. Potwierdzono ścisłą zależność między obecnością specyficznych zaburzeń molekularnych a odpowiedzią na leczenie i doбором dawki imatinibu. W przypadku GIST opornych na imatinib wprowadzono już również do leczenia lek drugiego rzutu – sunitinib, który jest inhibitorem wielokinazowym, działają-

cym m.in. na kinazy tyrozynowe receptora KIT, PDGFR, naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VRGFR) i FLT3. Obecnie badanych jest kilka leków, których skuteczność jest testowana w przypadkach GIST opornych na leczenie imatinibem lub sunitinibem czy GIST związanych z aktywacją innych szlaków patogenetycznych (np. GIST dziecięce). Trwają badania nad innymi inhibitorami kinaz tyrozynowych (np. nilotinib – AMN107, sorafenib, dasatinib, masatinib, AMG706, PKC412, BAY 73-4506 regorafenib – rzadko bowiem występuje krzyżowa oporność między tymi lekami) lub innymi alternatywnymi lekami (np. przeciwciała przeciw PDGFR). Badane są inne szlaki sygnalizacyjne, jak PI3K/AKT, RAS/RAF, MEK/MAPK, IGF1R/mTOR, jak również możliwość oddziaływania na regulację ekspresji KIT/PDGFR inhibitorami HSP90, inhibitorami HDAC.

[53]

Perspectives and difficulties in rational design of targeted therapies in diffuse large B-cell lymphoma: a translational view

Perspektywy i trudności z opracowywaniem terapii celowanych w przypadku chłoniaków z dużych komórek B: od koncepcji do kliniki

Przemysław Juszczyński, Krzysztof Warzocha

Institute of Hematology and Transfusion Medicine, Warsaw, Poland

Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) exhibits striking clinical, genetic and molecular heterogeneity. Microarray gene expression profiling experiments provided deep insight into the pathogenetic mechanisms behind this heterogeneity by highlighting transcriptional differences between tumors with different histologies, similarities between tumor cells and normal lymphocytes and by defining different molecular subgroups of DLBCLs. These studies also unveiled novel, targetable pathogenetic mechanisms in this disease. Translation of these findings into clinical practice requires further studies that will determine the most effective strategy of intervention to modulate the pathway, chemistry and nature of the modulator, potential resistance mechanisms, biomarkers identifying sensitivity and possible rational combinations. Many of identified candidate strategies are being currently tested, including modulation of B-cell receptor signaling, certain transcription factors or mitochondrial apoptotic mechanisms. Precise characterization of consequences of modulation of these pathways and judicious choice of intervention strategy will bring entirely personalized and rational use and monitoring of these novel therapies.

Chłoniaki rozlane z dużych komórek B (*diffuse large B-cell lymphoma* – DLBCL) stanowią niezwykle heterogenną grupę chorób w zakresie cech klinicznych, genetycznych i molekularnych. Globalna analiza ekspresji genów techniką mikro-macierzy znacznie pogłębiła wiedzę dotyczącą przyczyn tej heterogenności dzięki wykazaniu różnic transkrypcyjnych mię-

dzy różnymi typami histologicznymi nowotworu, podobieństw między komórkami nowotworowymi i prawidłowymi limfocytami oraz poprzez zdefiniowanie podtypów molekularnych DLBCL. Badania te ujawniły również odrębne mechanizmy patogenetyczne w obrębie DLBCL, które mogą stanowić racjonalny cel terapeutyczny. Praktyczne wykorzystanie tych odkryć wymaga jednak dodatkowych badań, które określą strategię interwencji modulującej aktywność zidentyfikowanego mechanizmu patogenetycznego i rodzaj celowanego modulatora, potencjalne mechanizmy oporności, biomarkery wrażliwości na dany rodzaj interwencji oraz możliwe racjonalne kombinacje terapeutyczne. W trakcie badań realizujących powyższe cele są obecnie m.in. strategie blokujące sygnał receptora B-komórkowego, aktywność czynników transkrypcyjnych i mitochondrialne mechanizmy apoptotyczne. Precyzyjne scharakteryzowanie skutków modulacji tych mechanizmów patogenetycznych, a zwłaszcza w pełni świadomy wybór sposobu interwencji pozwoli na zindywidualizowane i racjonalne stosowanie i monitorowanie nowych terapii celowanych.

[54]

New monoclonal antibodies close to registration for lymphoma treatment and new active epigenetic agents (HDACi, IMiDs)

Nowe przeciwciała monoklonalne u progu rejestracji w leczeniu chłoniaków oraz nowe aktywne czynniki epigenetyczne (HDACi, IMiDs)

Jan Walewski

Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie

Implementing anti-CD20 monoclonal antibody combined with chemotherapy to treatment of B cell lymphomas and optimization of combined chemo- and radiotherapy in Hodgkin lymphoma marked breaking through advances at the edge of current age. In effect, majority of patients with most common types of lymphoma may be cured or achieve long-term disease free survival after first-line therapy. In current clinical research, the main challenge is recurrent and refractory lymphoma including hard-to-treat subtypes that are primarily resistant to conventional treatments. Recent years were marked with impressive advances in understanding the molecular pathogenesis of lymphoma at the level of gene expression and regulation as well as at the level of intracellular signaling pathways. This research holds promise of discovering biomarkers of prognostic and predictive value that could guide personalized treatment decisions as wells defining targets for new selective agents. Unfortunately, not all preclinical models pass the demanding test of clinical trials and many promising approaches to modifying signaling pathways turn out to miss the target. Among those that nearly succeeded by entering clinical practice are new unconjugated and conjugated antibodies (GA101, SGN35), epigenetically active agents that reverse silencing of tumor suppressor genes (HDAC inhibitors), pro-

teasome inhibitors (bortezomib), and agents exerting complex activities including restitution of immune responses, antineoplastic, and anti-angiogenic effects (immunomodulating agents). A number of agents representative of these categories entered or recently completed phase III clinical trials and might give new hope to patients at high risk of developing resistance to and failure of standard therapy.

Przełomowe postępy, które dokonały się u progu obecnego wieku, wiązały się przede wszystkim z wprowadzeniem przeciwciała anty-CD20 w skojarzeniu z chemioterapią do leczenia chorych na chłoniaki z komórek B oraz z optymalizacją leczenia skojarzonego chorych na chłoniaka Hodgkina. Dzięki tym postępom większość chorych na najczęściej występujące chłoniaki może być wyleczona lub osiągnąć długotrwałe przeżycie bez objawów choroby w pierwszym podejściu. Obecnie główne wyzwania badawcze stanowią chłoniaki nawrotowe i oporne, w tym odmiany tzw. trudne, charakteryzujące się pierwotną opornością na leczenie konwencjonalne. Ostatnie lata przyniosły imponujące postępy w poznaniu patogeny molekularnej chłoniaków, zarówno na poziomie ekspresji i regulacji genów, jak i wewnątrzkomórkowych szlaków sygnałowych. Badania te dają nadzieję na odkrycie biomarkerów o znaczeniu prognostycznym i predykcyjnym, umożliwiającym spersonalizowanie leczenia, a także zidentyfikowanie punktów uchwytu dla nowych leków o selektywnym mechanizmie działania. Nie wszystkie założenia teoretyczne potwierdzają się w żmudnej praktyce badań klinicznych i wiele obiecujących modyfikacji szlaków sygnałowych okazuje się chybionych. Spośród tych, które są bliskie sukcesu i wejścia do praktyki, należy wymienić nowe przeciwciała wolne i skoniugowane (GA101, SGN35), leki epigenetycznie odblokowujące wyłączenia genów supresji nowotworzenia (inhibitory deacetylaz histonowych), inhibitory proteasomu (bortezomib) oraz leki o złożonym działaniu immunorestytucyjnym, przeciwnowotworowym i antyangiogennym (immunomodulatoryjne). Wiele leków reprezentujących te grupy jest przedmiotem badań klinicznych fazy III lub je zakończyło. Stanowią one nową szansę dla chorych o wysokim ryzyku oporności choroby i niepowodzenia leczenia standardowego.

[55]

Chronic myeloproliferative neoplasms and Janus kinase 2 gene (JAK2) and thrombopoietin receptor gene (MPL) mutations

Przewlekłe nowotwory mieloproliferacyjne a mutacje genu kinazy Janusowej 2 (JAK2) i genu receptora dla trombopoetyny (MPL)

Krzysztof Lewandowski

Department of Hematology University of Medical Sciences, Poznan, Poland

Chronic myeloproliferative neoplasms (CMPNs) are hematologic malignancies characterized by a clonal proliferation

of one or several myeloid lineages. Polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET) and idiopathic myelofibrosis (IMF) defined as a classical Philadelphia negative CMPNs, are considered to arise from the transformation of a multipotent hematopoietic stem cell. Philadelphia-negative CMPNs seem to lack any consistent, specific karyotypic abnormalities, although 9p deletion has been reported in approximately 30% of patients with PV. Significant progress in understanding pathogenesis of CMPNs was made in the beginning of the 21st century. In 2005, several groups reported the presence of an acquired V617F point mutation in Janus kinase 2 gene in patients with PV. In 2006, two novel thrombopoietin gene receptor (MPL gene) somatic mutations (W515L and W515K) were discovered in JAK2 V617F-negative patients with IMF. Mentioned defects of JAK2 and MPL gene confer to hematopoietic cells a cytokine-independent proliferation capacity, and result in a constitutive activation of JAK-STAT signaling.

The V617F mutation is localized in exon 14 of JAK2 gene and is found in 96% patients with PV, in 35 to 70% of patients with ET, and 50% of those with IMF. It was confirmed that JAK2 V617F mutation cooperates with inherited disease susceptibility alleles such as the JAK2 46/1 haplotype and with other somatic mutations. In rare cases of V617F-negative and Philadelphia-negative CMPNs another mutations in JAK2 exon 12 and exons 13 and 14 have been found. JAK2 exon 12 mutations are relatively specific to JAK2 V617F-negative PV (3% of all PV cases) and mainly target residues 536–547.

MPL exon 10 mutations were found in 3 and 10% of ET and IMF patients, respectively. The most frequent localization of mutation of MPL gene is W515K/L. W515 is a key amino acid, located in a domain involved in preventing the spontaneous activation of MPL. Therefore, it has been suggested that the W515 mutation in hematopoietic cells leads to a cytokine-independent proliferation capacity and results in constitutive activation of JAK-STAT signaling.

The discovery of the role of JAK2 V617F mutation in the pathogenesis of CMPN led to the development of small molecule ATP-mimetics that inhibit the wild-type and mutant JAK (i.e. TG101348, INCB018424, CYT387). In JAK2 V617F-positive patients with ET and PV, the therapy with JAK2 inhibitor may efficiently control blood cell count, as well as improve splenomegaly and significantly reduce intensity of disease related symptoms. In patients with IMF the treatment with JAK2 inhibitor can markedly reduce spleen size, alleviate constitutional symptoms, increase body weight and improve exercise capacity.

Przewlekłe nowotwory mieloproliferacyjne (*chronic myeloproliferative neoplasms* – CMPN) są złośliwymi chorobami hematologicznymi będącymi wynikiem klonalnej proliferacji jednej lub kilku linii mieloidalnych. Do klasycznych Philadelphia-ujemnych CMPN należą czerwienica prawdziwa (*polycythemia vera* – PV), nadpłytkowość samoistna (*essential thrombocythemia* – ET) oraz idiopatyczne zwłóknienie szpiku (*idiopathic myelofibrosis* – IMF). Uważa się, że wszystkie choroby tej grupy są wynikiem transformacji nowotworowej wielopotencjalnej komórki hematopoetycznej. Dotąd nie znaleziono żadnej specyficznej aberracji cyto-genetycznej powiązanej z poszczególnymi postaciami Phi-

Philadelphia-negatywnych CMPN. Jedynie u ok. 30% chorych z PV potwierdzono obecność delecji 9p. Istotny postęp w zakresie poznania patogenezы CMPN dokonał się na początku XXI wieku. W 2005 r. liczne grupy badawcze doniosły o obecności nabytej mutacji genu kinazy Janusowej 2 (JAK2) u pacjentów z PV (V617F), a w 2006 r. dwóch nowych mutacji somatycznych: W515L oraz W515K w obrębie sekwencji genu receptora dla trombopoetyny (MPL) u JAK2 V617F-negatywnych chorych na IMF. Okazało się, że obecność wymienionych defektów genów JAK2 i MPL w komórkach hematopoetycznych, prowadzi do konstytutywnej aktywacji szlaku sygnałowego JAK-STAT i do niezależnej od obecności cytokin ich proliferacji.

Obecność zlokalizowanej w egzonie 14 mutacji V617F potwierdzono u 96% chorych z PV, u 35–70% pacjentów z ET oraz u ok. 50% osób z IMF. Potwierdzono także, że obecność mutacji V617F genu JAK2 jest powiązana z obecnością haplotypu JAK2 46/1 oraz innych wrodzonych defektów sprzyjających wystąpieniu choroby. W rzadkich przypadkach Philadelphia-negatywnych oraz JAK2 V617F-negatywnych CMPN potwierdzono także obecność innych defektów w obrębie egzonów 12, 13 i 14 genu JAK2. Okazało się, że mutacje egzonu 12 są względnie specyficzne dla JAK2 V617F-ujemnych postaci PV (3% wszystkich przypadków PV) oraz że prowadzą one głównie do zmian pozycjach aminokwasowych 536-547.

Obecność mutacji egzonu 10 genu MPL wykazano odpowiednio u 3 i 10% pacjentów z ET oraz IMF. Defekty genu MPL dotyczą najczęściej pozycji W515K/L. W515 zajmuje kluczową pozycję w obrębie obszaru zaangażowanego w zapobieganie spontanicznej aktywacji MPL. Przypuszcza się, że obecność mutacji w obrębie W515 prowadzi do spontanicznej aktywacji MPL oraz konstytutywnej aktywacji szlaku sygnałowego JAK-STAT.

Odkrycie roli mutacji genu JAK2 w patogenezie CMPN doprowadziło do opracowania małocząsteczkowych mimosymptomów ATP (inhibitory JAK2, np. TG101348, INCB018424, CYT387), hamujących aktywację zarówno zmutowanej, jak i niezmutowanej postaci kinazy. Okazało się, że w JAK2 V617F- pozytywnych przypadkach ET i PV leczenie z pomocą inhibitorów JAK2 umożliwia skuteczną kontrolę wartości parametrów krwi obwodowej, zmniejszenie stopnia splenomegalii oraz wyraźne zmniejszenie nasilenia objawów związanych z chorobą. U chorych z IMF terapia za pomocą inhibitorów JAK2 skutkuje znaczącym zmniejszeniem wielkości śledziony, złagodzeniem nasilenia objawów ogólnych, przyborem masy ciała oraz poprawą w zakresie zdolności do wysiłku.

[56]

ASPS, DFSP, PVNS, GCTB, PEComa and other rare sarcomas – role of molecular targeting

ASPS, DFSP, PVNS, GCTB, PEComa i inne rzadko występujące mięsaki – rola leczenia ukierunkowanego molekularnie

Tomasz Świtaj

Soft Tissue/Bone Sarcoma and Melanoma Department, M. Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center, Warsaw

Mięsaki tkanek miękkich i kości stanowią grupę ponad 30 jednostek chorobowych o złożonym przebiegu klinicznym. Na podstawie badań molekularnych można wyróżnić dwie podgrupy mięsaków – pierwsza zawierająca te o złożonym kariotypie (stanowiące większość), i druga, te w których wykrywa się zdefiniowaną zmianę genetyczną (mutacja punktowa lub translokacja) sprzyjającą propagacji procesu nowotworzenia. Rzadkie podtypy mięsaków należą zazwyczaj do tej drugiej grupy. Specyficzne powtarzalne w danym podtypie mięsaka zaburzenie genetyczne mogą stanowić punkt uchwytu dla terapii molekularnie ukierunkowanej. W niektórych z rzadkich podtypów mięsaków [np. *alveolar soft part sarcoma* (ASPS), *dermatofibrosarcoma protuberans* (DFSP), *perivascular epithelioid cell tumor* (PEComa), *giant-cell tumor* (GCT), *pigmented villonodular synovitis* (PVNS)] obserwuje się wyraźny efekt kliniczny leczenia ukierunkowanego molekularnie. Leczenie to obecnie znajduje zastosowanie w stanach zaawansowanych, po wykorzystaniu możliwości standardowych terapii, tj. chirurgii, radioterapii, a w niektórych przypadkach chemioterapii. Można mieć nadzieję, że trwające nadal badania nad nowymi lekami ukierunkowanymi molekularnie doprowadzą wkrótce do rozszerzenia wskazań do tego rodzaju leczenia w rzadkich podtypach mięsaków.

[57]

Classification of targeted therapies used in neoplastic disorders of hematopoietic system

Klasyfikacja terapii celowanych w nowotworach układu krwiotwórczego

Wiesław Wiktor Jędrzejczak

Department of Hematology, Oncology and Internal Diseases, Medical University of Warsaw

Targeted therapy could be defined as such treatment of neoplastic disorder that hinges on pharmacologic, immunologic or genetic intervention against such molecular targets that play essential role in the development, survival, progression and spread of particular neoplasm. The goal is to develop therapy with high specificity and efficiency as well

as low toxicity. Such goal is achievable under the following conditions: the cellular target is identified and confirmed, this target can be tested and monitored during therapy, the target is exclusively or preferentially expressed in neoplastic cells (or in cells supporting neoplastic clone) as opposed to healthy cells, and finally there exists a molecule that is capable of neutralizing particular cellular target possessing good pharmacologic properties and active in models of human neoplasia. This means that target validation is critical for development of any form of targeted therapy. It is possible to consider two main strategies of final killing of neoplastic cells:

- targeted drug is responsible for both reaching the target and its destruction, inhibition or stimulation (depending on what is the aim),
- targeted drug is responsible only for reaching the target and serves as a carrier for another substance responsible for desired therapeutic effect.

Depending on the category of critical target, the targeted therapies could be categorized into:

- these, whose targets are specific for neoplastic cells,
- these, whose targets are specific for tumor vicinity,
- these that hit other targets preferentially harming neoplastic cells.

Among tumor specific targets are molecules of cell regulatory pathways such as cytokines, cytokine receptors and molecules of signal transduction. Moreover, molecules of cellular repair mechanisms, molecules that eliminate and modify other intracellular targets particularly nucleic acids and proteins can also be such targets. Tumor vicinity targets would include both tumor vasculature and stroma. Other targets, whose destruction is preferentially harmful for tumor cells is e.g. CD20 molecule used for elimination of B cell lymphoma. Currently more than 1000 molecules targeted against some of these targets are in various stages of investigation.

Leczenie celowane można zdefiniować jako takie leczenie nowotworu, które polega na farmakologicznym, odpornościowym lub genetycznym oddziaływaniu na takie swoiste cele cząsteczkowe, którym przypisuje się zasadniczą rolę w powstawaniu danego nowotworu, jego przeżyciu, rozwoju i rozprzestrzenianiu się. Celem jest opracowanie leczenia o wysokiej swoistości i skuteczności oraz małej toksyczności. Osiągnięcie tego celu jest możliwe pod następującymi warunkami: istnieje zidentyfikowany i potwierdzony cel cząsteczkowy w komórce, istnieje test oceniający zachowanie się tej cząsteczki w trakcie leczenia, cząsteczka ta jest wyłącznie lub preferencyjnie obecna w komórkach nowotworowych (lub w komórkach je wspomagających) w stosunku do komórek zdrowych, wreszcie istnieje cząsteczka, która jest w stanie neutralizować dany cel cząsteczkowy o dobrych własnościach farmakologicznych, a jej działanie jest potwierdzone na modelach nowotworów człowieka. Oznacza to, że krytyczne dla opracowywania jakiegokolwiek terapii celowanej jest potwierdzenie celu (*target validation*). Można rozważać dwie główne strategie ostatecznego zabijania komórek nowotworowych:

- lek celowany odpowiada zarówno za dotarcie do celu, jak i za jego zniszczenie, zahamowanie lub pobudzenie (zależnie od tego, co chcemy osiągnąć),

- lek celowany odpowiada wyłącznie za dotarcie do celu i jest nośnikiem innej substancji, która ma za zadanie wyrzucić pożądany skutek leczniczy.

Ze względu na rodzaj atakowanego celu, leczenie celowane można podzielić na takie, w których:

- cele są swoiste dla komórek nowotworowych,
- cele są swoiste dla otoczenia nowotworu,
- są inne cele, których zniszczenie preferencyjnie uszkadza komórki nowotworowe.

Celami swoistymi dla komórek nowotworowych mogą być cząsteczki szlaków regulacyjnych komórki, w tym cytokiny, receptory cytokin i cząsteczki przekazu sygnału. Ponadto mogą to być mechanizmy naprawy, eliminacji i modyfikacji wewnątrzkomórkowych cząsteczek, zwłaszcza kwasów nukleinowych i białek. Celami swoistymi dla otoczenia nowotworu mogą być unaczynienie i podścielisko nowotworu. Inne cele, których zniszczenie preferencyjnie uszkadza komórki nowotworowe, to np. cząsteczka CD20 wykorzystywana do eliminacji chłoniaków z komórek B. Obecnie w różnych fazach badań jest blisko 1000 cząsteczek skierowanych przeciwko różnym spośród tych celów.

[58]

Significant potential of bevacizumab in glioma treatment

Wysoka skuteczność bewacizumabu w leczeniu glejaków

Waaled Abumoammar

Wojskowy Instytut Medyczny w Warszawie

Wstęp: Bewacizumab to humanizowane przeciwciało monoklonalne, głównym działaniem bewacizumabu jest potężenie ze śródbłonkowym czynnikiem wzrostu (*vascular endothelial growth factor* – VEGF).

Od kilku lat w wielu ośrodkach na świecie prowadzi się badania nad efektywnością stosowania bewacizumabu w nawrotowym glejaku. Wstępne wyniki pozwalają na optymistyczną ocenę terapeutycznych efektów tego leczenia.

Cel pracy: Retrospektywna analiza skuteczności bewacizumabu w nawrotowym glejaku wielopostaciowym, ocena profilu toksyczności.

Materiał i metody: Pomiedzy wrześniem 2008 r. i marcem 2011 r. w Klinice Onkologicznej WIM stosowaliśmy bewacizumab u 8 pacjentów z nawrotowym glejakiem wielopostaciowym IV stopnia wg WHO, u większości pacjentów był to III rzut leczenia: po chemioradioterapii z Temodalem oraz po chemioterapii z PCV. Stosowano schematy: albo bewacizumab w dawce 5–10 mg/kg m.c. + irinotekan w dawce 125 lub 340 mg/kg m.c. (4 pacjentów) albo bewacizumab w monoterapii 5–10 mg/kg m.c. (4 pacjentów). Cykle powtarzano co 2 tygodnie.

Wyniki: Czas wolny od progresji był podobny w obu grupach i wahał się między 5 a 15 miesięcy. Mediana całkowitego przeżycia była podobna w obu grupach i wynosiła 6 miesięcy.

Wnioski:

1. Bewacizumab jest skutecznym lekiem w terapii glejaka wielopostaciowego.
 2. Bewacizumab podawany w monoterapii jest skuteczną opcją terapeutyczną.
 3. Dawka bewacizumabu 5 mg/kg m.c. jest tak samo skuteczna jak dawka 10 mg/kg m.c. przy mniejszej częstotliwości występowania działań niepożądanych.
-

Session 10

Cancer biology II and treatment***Biologia nowotworów II oraz leczenie***

[59]

Mitochondrial failure in cell transformation*Zaburzenia mitochondrialne w procesie nowotworzenia***Anna M. Czarnicka^{1,2}, Aleksandra Klemba^{1,2}**¹Institute of Genetics and Biotechnology, Faculty of Biology, University of Warsaw²Laboratory of Molecular Oncology, Department of Oncology, Military Institute of the Health Services, Warsaw

For many years mitochondria have been implicated in the process of carcinogenesis. At the beginning of 20th century Otto Warburg has started research focused on failure of oxidative metabolism in cancer cells. In his work he described “disruption of respiration” as typical for cancer cells. Warburg’s discovery resulted in establishment of many projects focused on the role of mitochondria in cell transformation. Since that time multiple research groups have reported mitochondria DNA mutations in majority of cancer types. Recently re-analyses of raw data has been published and have shown multiple methodical errors in previous reports. This paper presents critical analysis and summary of mitochondria polymorphisms and somatic mutations research in oncology.

Literature analysis that includes latest methodological guidelines established for mtDNA analysis and evidence based medicine reports proves that cancer patients harbour specific pattern of inherited mtDNA polymorphisms and low number of somatic mutations. It seems that mitochondrial genotype (including haplotype) may be classified as cancer predisposing factor.

Key words: cancer, molecular marker, mitochondria, mtDNA mutation, mtDNA polymorphism, Evidence Based Medicine.

Mitochondria od dawna podejrzewano o współdziałanie w karcinogenezie. Na początku XX w. Otto Warburg rozpoczął badania nad zmianami w oddychaniu komórkowym w komórkach nowotworowych. Opisał on wówczas „uszkodzenie oddychania tlenowego” jako cechę charakterystyczną tych komórek. Odkrycie to pociągnęło za sobą lawinę badań mających na celu ustalenie rzeczywistej roli tych organelli w procesie nowotworzenia. Od tamtego czasu wiele grup badawczych wykazywało mutacje genomu mitochondrialnego w wielu typach nowotworów. Przeprowadzone ponownie analizy publikowanych danych wskazują na liczne błędy metodyczne popełniane w poprzednich projektach. Obecna praca ma na celu krytyczną analizę oraz podsumowanie obecności dziedzicznych polimorfizmów i mutacji somatycznych u pacjentów z nowotworem.

Analiza danych literaturowych, z uwzględnieniem prac dotyczących najnowszych kryteriów metodycznych w badaniu mtDNA oraz założeń medycyny opartej na faktach wska-

zuje, że osoby z chorobą nowotworową są nosicielami specyficznego układu rzadkich polimorfizmów mtDNA i nie-licznych mutacji mtDNA. Genotyp (w tym haplotyp) mitochondrialny może być czynnikiem predysponującym do rozwoju nowotworu, choć także czynnikiem chroniącym przed rozwojem nowotworu.

Słowa kluczowe: nowotwory, markery molekularne, mitochondria, mutacje mtDNA, polimorfizm, Evidence Based Medicine.

[60]

Tumor blood vessels*Nowotworowe naczynia krwionośne***Stanisław Szala**

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

By forming their own microenvironment tumor cells establish a special relationship with surrounding normal cells. An important component of this newly-formed milieu is tumor blood vessels. It recently became clear that neoplastic blood vessels, often malformed and abnormal, contribute to oxygen deprivation in tumors. The new blood vessels only minimally fulfilling the metabolic needs of the rapidly growing tumor mass. The oxygen depletion (hypoxia and anoxia) triggers several events that play significant role in tumor progression. Inhibiting of these processes could be accomplished through administration of properly combined agents that restrain neovascularization and those that stimulate immune response.

Komórki nowotworowe tworzą swoiste relacje z komórkami prawidłowymi, innymi słowy: tworzą własne środowisko. Unaczynienie to bardzo ważny element tego nowo powstałego środowiska. Okazuje się, że niesprawne naczynia krwionośne mają wpływ na powstanie niedotlenienia, które z kolei indukuje szereg procesów odgrywających istotną rolę w progresji nowotworowej. Zahamowanie tych procesów można uzyskać dzięki odpowiedniej kombinacji czynników hamujących unaczynienie i stymulujących zarazem odpowiedź odpornościową.

[61]

Cancer stem cells as targets of anti-cancer therapy

Nowotworowe komórki macierzyste jako cele terapii przeciwnowotworowej

Jan Konrad Siwicki

Zakład Immunologii, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie

A small subset of cancer cells can survive following standard anti-cancer therapy, and the resistant cells, responsible for the disease recurrence display characteristics of the so-called cancer stem cells or cancer initiating cells. Identification of factors targeting and eliminating this sub-fraction of cancer cells, while sparing normal stem cells, may lead to development of effective and safe anti-cancer therapy. Several approaches for targeting cancer stem cells have been recently proposed. For example, recent epidemiological and *in vitro* studies showed that anti-diabetic drug metformin has an apparent anti-cancer activity and can eliminate “cancer stem cells” or cancer cells resistant to targeted therapy in breast cancer. Little is known about the anti-cancer potential of metformin in other malignancies, and the predictive biomarkers, especially in non-diabetic cancer patients, have not been recognised.

IL-8 and other CXCR2 receptor ligands play an important role in cancer formation, metastasis and tumour angiogenesis. It has been recently found that increased CXCR2 expression promote growth and tumorigenicity of ovarian cancer cells. Several selective antagonists of CXCR2 receptor have been developed and are currently evaluated in clinical trials focused on inflammatory diseases. The effectiveness of CXCR2 receptor inhibitors as factors targeting cancer stem cells has not been directly addressed.

Klasyczne rodzaje terapii przeciwnowotworowej często pozostawiają podgrupę komórek opornych, które są źródłem nawrotu choroby. Te odporne na chemio- lub radioterapię komórki ujawniają wiele cech tzw. nowotworowych komórek macierzystych lub komórek inicjujących nowotwór. Znalazienie metod eliminacji tego typu komórek nowotworu, przy jednoczesnym oszczędzeniu puli prawidłowych komórek macierzystych w organizmie, umożliwi opracowanie skutecznej i bezpiecznej terapii przeciwnowotworowej.

Obecnie badane są różne podejścia zmierzające do eliminacji nowotworowych komórek macierzystych. Ostatnie badania epidemiologiczne oraz analizy *in vitro* wykazały, że metformina – lek rutynowo stosowany w leczeniu cukrzycy typu 2 – ma wyraźną aktywność przeciwnowotworową i może eliminować nowotworowe komórki macierzyste, odporne na ukierunkowaną chemioterapię w raku piersi. Nie ma jednak dokładniejszych danych na temat takiego działania metforminy w innych nowotworach złośliwych. Nie są jeszcze znane czynniki determinujące wrażliwość komórek nowotworowych na metforminę, szczególnie w przypadku pacjentów bez cukrzycy.

Interleukina 8 oraz inne ligandy receptora CXCR2 mają istotny udział w powstawaniu i rozwoju wielu nowotworów złośliwych. Ostatnio wykazano, że wzrost ekspresji CXCR2 w raku jajnika pobudza proliferację komórek oraz potęguje cechy ich złośliwości. Opracowano szereg skutecznych antagonistów CXCR2 lub neutralizujących przeciwciał, które są obecnie wykorzystywane w badaniach klinicznych dotyczących chorób o podłożu zapalnym, dotąd jednak nie podjęto prób zastosowania tych czynników do eliminacji nowotworowych komórek macierzystych.

[62]

Dissecting signal transduction in discrete components of tumor microenvironment to select new therapeutic targets

Przeznaczność sygnału w mikrośrodowisku nowotworu i macierzystych komórkach nowotworowych jako nowy cel terapeutyczny

**Bożena Kamińska-Kaczmarek,
Konrad Gabrusiewicz, Aleksandra Ellert-Miklaszewska,
Magda Kijewska, M. Porycka**

Laboratory of Transcription Regulation, Nencki Institute of Experimental Biology, Warsaw, Poland

Malignant tumors benefit from support from the surrounding tumor microenvironment composed of tumor-associated fibroblasts, leukocytes, bone marrow-derived cells, blood and lymphatic vascular endothelial cells. The microenvironment provides essential cues to the maintenance of cancer stem cells/cancer initiating cells, rare cells which contribute to tumor propagation and the immunosuppressive tumor milieu. Tumor-infiltrating macrophages and immunomodulatory mediators present in the tumor microenvironment polarize host immune response toward specific phenotypes impacting tumor progression. Aggressive human brain tumours (glioblastomas) contain numerous glioma-infiltrating macrophages, which abundance correlates with malignancy and poor patient prognosis. Using immunofluorescence and flow cytometry, we demonstrated an early accumulation of activated microglia followed by accumulation of blood derived macrophages in experimental murine EGFP-GL261 gliomas. Those cells acquire the alternative phenotype, as evidenced by evaluation of the production of ten pro/anti-inflammatory cytokines and expression profiling of 28 genes in magnetically-sorted CD11b⁺ cells from tumor tissues. *In vitro* studies revealed that glioma cells secrete soluble factors which convert brain macrophages into amoeboid cells supporting glioma invasiveness, while attenuating inflammatory responses. Proteomic analysis of glioma-conditioned medium using HPLC fractionation followed by a tandem mass-spectrometry revealed that one of these factors is Osteopontin (Opn), a metastasis-associated small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein family member. Interference with Opn binding to integrins using a blocking RDG peptide or Opn silencing in glioma cells, abolished macrophage activation

induced by glioma-conditioned medium and their influence on glioma invasion. Those results suggest that *Opn* is an important component of the glioma niche and glioma-derived *Opn*, acting as integrin-binding ligand, may be a crucial factor mediating interactions between glioma and tumor-associated macrophages. Osteopontin was abundantly expressed in rat and human glioma cells when compared to non-transformed glial cells. We isolated cancer stem cells and generated cancer-initiating single colonies from 3 human glioma cell lines (their phenotype was confirmed by expression of stemness related genes). Interestingly, the expression of *OPN* was strongly increased in cancer stem cell population versus bulk cells. These data provide strong evidence that *Opn*-integrin signaling may be relevant for cancer-related inflammation and cancer stem-like cells may have the potential to reeducate a tumor-promoting microenvironment.

Złośliwe nowotwory wykorzystują do wspierania wzrostu guza otaczające mikrośrodowisko, w skład którego wchodzi fibroblasty, leukocyty, komórki pochodzące ze szpiku oraz komórki nabłonka naczyń krwionośnych i limfatycznych. Mikrośrodowisko jest także źródłem czynników wspierających utrzymywanie się macierzystych komórek nowotworowych, rzadko występujących komórek, uczestniczących w progresji nowotworu i wywoływaniu immunosupresji. Naciekające guzy makrofagi i czynniki obecne w mikrośrodowisku polaryzują odpowiedź układu odpornościowego w kierunku fenotypu wspierającego progresję nowotworu. Ludzkie złośliwe guzy mózgu (glejaki) zawierają liczne infiltrujące guz makrofagi, których liczebność koreluje ze złośliwością guzów i słabymi rokowaniami dla pacjentów. W doświadczalnym mysim modelu glejaka EGFP-GL261, wykorzystując metody immunofluorescencji i cytometrii przepływowej, wykazaliśmy dwufazową akumulację makrofagów: najpierw napływ lokalnych, mózgowych makrofagów, po którym następował napływ makrofagów z obwodu. Komórki te wykazywały alternatywny fenotyp, co ustalono badając profil cytokin zapalnych/przeciwzapalnych i oceniając ekspresję 28 genów w makrofagach (komórkach CD11b⁺) immunomagnetycznie sortowanych z guzów. Z kolei badania w hodowli komórkowej wykazały, że komórki glejaka wydzielają czynniki przekształcające makrofagi mózgowe w komórki ameboidalne wspierające inwazyjność, podczas gdy odpowiedź zapalna jest w nich zahamowana. Analiza proteomiczna pożytki znad komórek glejaka wykazała, że uczestniczy w tym małe białko będące ligandem integrzyn, związane z przetrutowaniem. Inhibicja wiązania tego białka do powierzchniowymi integrzynami za pomocą peptydu blokującego z motywem RGD lub wyciszenie jego ekspresji w komórkach glejaka hamowało aktywację makrofagów przez glejaka i ich proinwazyjną aktywność. Uzyskane wyniki wskazują, że osteopontyna jest ważnym składnikiem niszy glejaka, a wydzielana przez glejaka, działając jako ligand integrzyn, może być głównym pośrednikiem interakcji między glejakiem a infiltrującymi makrofagami. Dalsze badania wykazały, że ekspresja osteopontyny jest podwyższona w komórkach glejaka w porównaniu z komórkami niestransformowanych astrocytów. Wyizolowano macierzyste komórki nowotworowe i wyprowadzono kolonie macierzystych komórek nowotworowych z 3 linii glejaków (fenotyp potwierdzono badając ekspresję markerów komó-

rek macierzystych). Co ciekawe, stężenie mRNA *OPN* było wielokrotnie większe w populacji macierzystych komórek nowotworowych niż w całej populacji. Te dane wskazują, że przekazywanie za pośrednictwem osteopontyny i integrzyn odgrywa ważną rolę w inicjacji stanu zapalnego związanego z nowotworami, a macierzyste komórki nowotworowe mogą uczestniczyć w przeprogramowaniu mikrośrodowiska, stając się tym samym potencjalnym celem nowych terapii przeciwnowotworowych.

[63]

Mechanisms of acquired resistance to the MEK1/2 inhibitor AZD6244 in tumour cells

Mechanizmy nabytej odporności na AZD6244 inhibitor MEK1/2 w komórkach nowotworowych

Simon J. Cook

Laboratory of Signalling & Cell Fate, The Babraham Institute, Babraham Research Campus, Cambridge CB22 3AT, UK

The acquisition of resistance to protein kinase inhibitors is a growing problem in cancer treatment. We have modelled acquired resistance to the MEK1/2 inhibitor Selumetinib (AZD6244) in colorectal cancer cell lines harbouring BRAF (COLO205, HT29) or KRAS (HCT116, LoVo) mutations. AZD6244-resistant derivatives were refractory to AZD6244-induced cell cycle arrest and death and exhibited a striking increase in ERK1/2 pathway signalling and cyclin D1 expression under basal conditions. Genomic sequencing revealed no acquired mutations in *MEK1* or *MEK2*, the primary target of AZD6244. Rather, resistant lines exhibited a striking up-regulation of their respective driving oncogene, BRAF^{600E} or KRAS^{13D}, due to intra-chromosomal amplification. Inhibition of BRAF reversed resistance to AZD6244 in COLO205 cells suggesting that combined inhibition of MEK1/2 and BRAF should be considered to reduce the likelihood of acquired resistance in tumours with BRAF^{600E}. Knock-down of KRAS reversed ERK1/2 and PKB hyper-activation and AZD6244-resistance in HCT116 cells; however, the combined inhibition of ERK1/2 and PI3K signalling had little effect, suggesting that additional KRAS effector pathways contribute to AZD6244 resistance. Finally, microarray analysis identified increased expression of an 18-gene signature previously identified as reflecting MEK1/2 pathway output in resistant cells. Thus, up-regulation of the driving oncogene (BRAF^{600E} or KRAS^{13D}) can drive acquired resistance to MEK1/2 inhibitors by increasing signalling down the ERK1/2 pathway. However, the up-regulation of KRAS^{13D} and additional KRAS effector pathways makes acquired resistance to MEK1/2 inhibitors more complex, further underlining the therapeutic challenge posed by KRAS mutations. These results may have implications for the use of combination therapies.

This study was supported by the Babraham Institute, grants from AstraZeneca (SJC) and grants from the MRC and CR-UK to our collaborators.

[64]

The role of ceramide galactosyltransferase (UGT8), new molecular marker of breast cancer malignancy and lung metastasis, in tumor progression

Znaczenie galaktozylotransferazy UDP-galaktoza: ceramid (UGT8), nowego markera molekularnego złośliwości raka piersi i przerzutów do płuc w progresji choroby nowotworowej

Maciej Ugorski

L. Hirszfeld Institute of Immunology and Experimental Therapy PAN

The UDP-galactose:ceramide galactosyltransferase (UGT8) is the enzyme responsible for the synthesis of galactosylceramide (GalCer) which is the simple glycosphingolipid known mostly as the constituent of myelin. It was shown recently on the level of gene expression, using the transcriptome profiling, that *UGT8* is one of six genes whose elevated expression correlated with a significantly increased risk of lung metastases in breast cancer patients. Further studies with the use of immunohistochemistry and real-time PCR on the expression of UGT8 in breast cancer tissue specimens showed a significant difference between (1) primary and metastatic tumours (Mann-Whitney U, $p < 0.05$), (2) tumours of malignancy grades G3 and G2 (Mann-Whitney U, $p < 0.01$) as well as G3 and G1 (Mann-Whitney U, $p < 0.001$) and (3) node-positive and node-negative tumours (Mann-Whitney U, $p < 0.001$). The predictive ability of increased expression of UGT8 was validated at the mRNA level in three independent cohorts of breast cancer patients (721). In summary, our data suggest that UGT8 is a significant index of tumor aggressiveness and a potential marker for the prognostic evaluation of lung metastases in breast cancer. We analyzed also the presence of UGT8 and GalCer in breast cancer cell lines and found that cells with the 'luminal epithelial-like' phenotype did not expressed or weakly expressed UGT8 and GalCer, in contrast to malignant, 'mesenchymal-like' cells forming metastases in nude mice. Very little is known about the possible functions of UGT8 and GalCer in tumor cells, however it was proposed recently that accumulation of GalCer in tumor cells inhibits apoptosis, which facilitates metastatic cells to survive in the hostile microenvironment of the target organ. To verify this hypothesis, human breast cancer MCF7 cells were transfected with UGT8 mRNA, and for induction of apoptosis in cells over-expressing GalCer as well as parental cells, they were grown in the presence of 2 μM of *N*-(4-hydroxyphenyl)retinamide (4-HPR) for 96 h. Apoptosis was evaluated by subjecting the cells to annexin V binding assay and Western blotting for detection of active caspase 3. It was found that accumulation of GalCer increased the resistance of MCF7 cells to drug-induced apoptosis. Similar results were obtained, when MDA-MB-231 cells with stable expression of shRNA directed against UGT8 mRNA and characterized by decreased expression of GalCer were treated with 2.5 μM of doxorubicin for 48 h. In this case the down-regulation of UGT8

resulted in increase sensitivity of breast cancer cells to drug-induced apoptosis. In conclusion, we showed that accumulation of GalCer in breast cancer cells effectively inhibits the drug-induced apoptosis.

UGT8 jest enzymem biorącym udział w syntezie galaktozyloceramidu (GalCer), prostego glikolipidu, znanego głównie pod nazwą cerebrozydu, jako składnik ostonki mielinowej. Ostatnio analiza ekspresji genów w przerzutach raka piersi do kości, wątroby, płuc i mózgu, w której wykorzystano mikromacierze DNA, wykazała, że wśród kilku genów, których ekspresja jest znacznie podwyższona, tylko w przerzutach raka gruczołu piersiowego do płuc znajduje się gen *UGT8*. Wyniki te zostały następnie zweryfikowane przez nas metodą PCR w czasie rzeczywistym i metodą immunocytochemicznego znakowania skrawków tkankowych za pomocą specyficznego przeciwciała skierowanego przeciwko UGT8. Wykazano statystycznie istotny wzrost (1) ekspresji UGT8 w tkance nowotworowej pochodzącej z przerzutów w porównaniu z guzami pierwotnymi, (2) ekspresji UGT8, zarówno na poziomie mRNA, jak i białka, w guzach pierwotnych o stopniu złośliwości G3 w stosunku do guzów o stopniu G1 i G2, a także statystycznie istotne różnice (3) w ekspresji UGT8 pomiędzy guzami pierwotnymi niedającymi przerzutów do węzłów chłonnych a guzami przerzutującymi. Tak więc badania te wskazują, że UGT8 może mieć swój udział w potencjale przerzutującym komórek raka gruczołu mlekowego i/lub progresji do bardziej złośliwego fenotypu. Poziom ekspresji UGT8 analizowano również w ustalonych *in vitro* liniach komórkowych raka piersi MDA-MB-231, BO2 i MCF10CA1a.cl1, o których wiadomo, że dają przerzuty w modelu myszy bezgranicznych, oraz w liniach nieprzerzutujących, takich jak MCF7, T47D, SKBR-3, BT-474 i Hs-587T. Obecność UGT8 wykrywana była tylko w liniach przerzutujących, zarówno na poziomie mRNA, jak i białka enzymatycznego, wykorzystując do tego celu, odpowiednio PCR w czasie rzeczywistym i Western blotting. W zgodzie z tymi wynikami, obecność GalCer, będącego produktem aktywności UGT8, wykrywano również tylko w liniach przerzutujących. Celem obecnie prowadzonych badań jest wyjaśnienie roli GalCer w progresji raka gruczołu piersiowego, głównie jako czynnika antyapoptycznego. W jego realizacji wykorzystywane są dwa modele eksperymentalne polegające na utworzeniu: (1) fenotypu funkcjonalnego z nadekspresją UGT8 i afunkcjonalnego z obniżoną jego ekspresją. Wykazano, że komórki MCF7 z nadekspresją UGT8 są bardziej odporne na apoptozę indukowaną *N*-(4-hydroksyfenyl)retinamidem, natomiast komórki MDA-MB-231 z obniżoną ekspresją UGT8 są bardziej podatne na apoptozę indukowaną doksorubicyną w porównaniu z komórkami rodzicielskimi.

Session 11

Progress in therapy

Postępy terapii

[65]

Paliative radiotherapy of the thorax in non-small cell lung cancer –what could be improved?

Radioterapia paliatywna klatki piersiowej w niedrobnokomórkowym raku płuca – co można udoskonalić?

Marian Reinfuss, Marcin Hetnał

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

Aim of the study: To present our experience and literature data regarding palliative thoracic radiotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer.

Material and methods: 1350 patients were given split-course, hypofractionated palliative radiotherapy (two courses of 20Gy in 5 fractions, four weeks gap).

Efficacy and safety of analyzed treatment were compared to available literature data.

Results: In the group of patients most disturbing symptoms were: cough in 45,2 % patients, hemoptysis – 20%, chest pain 18,5%, dyspnoea – 14,4%, hoarseness – 8%, swallowing difficulties – 6%. 92% patients completed planned treatment. Palliative effect (disappearance or improvement of symptoms) was obtained in 84% patients suffering from hemoptysis, 72% – chest pain, 65% – cough, 42% – dyspnoea, 35% – hoarseness, 15% – swallowing difficulties. Among 1350 patients, 21% survived 12 months, 5,6% – 24 months. Early toxicity was found in 4.7% of patients (post-irradiation inflammation of lung tissue –2,3%).

Conclusions: Proposed palliative chest irradiation regimen was effective and well tolerated.

Based on literature data following issues should be discussed:

- immediate or delayed radiotherapy?
- safety and efficacy of different radiotherapy regimens,
- indications and prognostic factors,
- use of modern radiotherapy techniques (health economics view).

Cel pracy: Prezentacja własnych wyników oraz danych z literatury dotyczących paliatywnej teleradioterapii zaawansowanego niedrobnokomórkowego raka płuca.

Materiał i metody: U 1350 chorych przeprowadzono paliatywną radioterapię dawką 20 Gy w 5 frakcjach przez 5 dni, z powtórzeniem dawki po 4 tygodniach.

Analizowano skuteczność i tolerancję leczenia. Wyniki własne porównano z wynikami uzyskanymi z przeglądu piśmiennictwa.

Wyniki: U chorych stwierdzono następujące objawy o średnim lub ciężkim nasileniu: kaszel (45,2%), krwioplu-

cie (20%), ból w klatce piersiowej (18,5%), duszność (14,4%), chryпка (8%) zaburzenia połykania (6%). Pełne zaplanowane leczenie przeprowadzono u 92% chorych. Efekt paliatywny (całkowite lub częściowe zmniejszenie się objawów) wynosił: 84% u chorych objawami krwioplucia, 72% u chorych z bólem w klatce piersiowej, 65% u chorych objawami kaszlu, 42% u chorych z objawami duszności, 35% chryпки, 15% z zaburzeniami połykania. W całej grupie chorych 12 miesięcy przeżyło 21%, a 24 miesiące 5,6%. Wczesne powikłania popromienne stwierdzono u 4,7% chorych, najczęściej występowało popromienne zapalenie tkanki płucnej – 2,3%.

Wnioski: Zastosowany schemat napromieniania charakteryzuje się skutecznością, przy stosunkowo dobrej tolerancji.

Na podstawie przeglądu literatury wyjaśnienia wymagają następujące zagadnienia:

- radioterapia wczesna lub odroczone,
- skuteczność i bezpieczeństwo różnych schematów frakcjonacji,
- kwalifikacja do leczenia; czynniki prognostyczne,
- wykorzystanie technik wysokospecjalistycznych a ekonomika zdrowia.

[66]

Prostate cancer: for who patients the local therapy, local and regional, and local and systemic?

Rak prostaty: dla jakich pacjentów leczenie miejscowe, miejscowe i regionalne, miejscowe i systemowe?

Piotr Milecki

Wielkopolskie Centrum Onkologii w Poznaniu

Wybór metody leczenia raka stercza opiera się na ocenie szeregu czynników prognostycznych należących do I kategorii (stopień klinicznego zaawansowania, poziom PSA, stopień zróżnicowania według skali Gleason, a u chorych po radykalnej prostatektomii pT, pN i stan marginesu pooperacyjnego), czyli poddanych walidacji i przez to będących stosowanych rutynowo w praktyce klinicznej. Ponadto, przy wyborze strategii leczenia należy uwzględnić obecność schorzeń towarzyszących, preferencje chorego, co do zaproponowanych metod oraz możliwości terapeutyczne ośrodka. Wybór strategii leczenia w raku stercza wymaga zatem dokonania analizy zalet i wad agresywnego leczenia jedną metodą w porównaniu do innych dostępnych sposobów postępowania. Podjęcie decyzji komplikuje unikalna biologia raka stercza, wyrażająca się niekiedy trwającą wiele lat progresji choroby, zwłaszcza w grupie chorych w bardzo wczesnym stadium choroby. Innym problemem u chorych we wczesnym stadium raka stercza jest wybór optymalnego postępowania pomiędzy leczeniem operacyjnym, a radyklaną radioterapią. W zaawansowanym stadium choroby problemem jest wybór pomiędzy leczeniem miejscowym - RP a miejscowym i systemowym - RT skojarzoną z hormo-

noterapią. Z kolei po RP nadal mamy do wyboru szereg opcji terapeutycznych (uzupełniająca radioterapia, ratująca radioterapia, obserwacja). Pomimo poprawy wyników leczenia, nadal duży problem stanowi leczenie chorych w przypadku wystąpienia progresji biochemicznej, czy przerzutów odległych.

Słowa kluczowe: rak stercza, radykalna prostatektomia, radykalna radioterapia, leczenie hormonalne, chemioterapia.

Treatment decision in prostate cancer is based on evaluation of known prognostic factors (clinical stage of disease, PSA level, grading according Gleason score, and pathological report after radical prostatectomy; pT, pN, and postoperative margin status), which were validated and are implemented into routine clinical practice. Additionally, treatment decision process should include concomitant comorbidities, patient's preference, and possibilities of treatment in particular centre. Thus, decision concerning treatment is based on analysis of all known pros and cons of one method of therapy in comparison to other ones. In very early stage of prostate cancer the decision making procedure is complicated because of specific biology of prostate cancer, which is related to long-term progression of disease. In early stage of prostate cancer clinicians and patient have to choose between surgery and radiotherapy. In advanced stage of disease the problem concerning the optimization of treatment strategy when we choose between the loco-regional therapy (surgery) or loco-regional/systemic (radiotherapy with hormonal therapy). For patients after radical prostatectomy we have a few therapeutic options (postoperative radiotherapy, salvage radiotherapy, watch and waiting). Although, in last decades the results of radical therapy is improving we meet a group of patients with biochemical progression or distant metastases for whom a wider range of therapies is available.

Key words: prostate cancer, radical prostatectomy, radical radiotherapy, hormonal therapy, chemotherapy.

[67]

Numerous fractionation schedules in brachytherapy of prostate cancer – clinical implications

Wiele schematów frakcjonowania w brachyterapii raka gruczołu krokowego – implikacje kliniczne

Marek Kanikowski, Janusz Skowronek, Adam Chichet

Zakład Brachyterapii z Izłą Przyjęć, Wielkopolskie Centrum Onkologii w Poznaniu

Aim of the study:

1. Comparing dose and volume parameters in three schemes of HDR-BRT modality treatment including biological doses.
2. Estimation of relations between particular prognostic factors and values of dose-volume parameters in different HDR-BRT fractionation schemes.

Material and methods: 65 prostate cancer patients with localized prostate cancer were treated between June 2006 and October 2007 by HDR brachytherapy. 55 of cases HDR-BRT was administered as a boost after external beam radiotherapy (EBRT). 37 of patients underwent one session of brachytherapy (1×15 Gy – group I) and 18 two fractions of interstitial treatment (2×10 Gy – group II) after EBRT doses 50 and 46 Gy respectively. The number of 10 men were treated by HDR-BRT as a sole modality treatment (total dose 45 Gy in three fractions – group III). Dose and volume parameters of target and organs at risk were analyzed: D_{min-p} , D_{max-p} , D_{mean-p} , D_{90-p} , SD_{-p} , V_{100-p} , V_{120-p} , V_{150-p} i V_{200-p} oraz $D_{min-u,r}$, $D_{max-u,r}$, $D_{mean-u,r}$, $D_{10-u,r}$, $SD_{-u,r}$, $V_{crit-u,r}$ i $V_{100-u,r}$ for prostate gland, urethra and rectum respectively. The comparison of dose-volume parameters has been done to reveal its variation in different schemes groups. There also has been effort to estimate influence of such a prognostic factors as: age, TNM clinical score, Gleason pathologic score, initial PSA value, number of interstitial needles used and prostate gland volume on dose-volume HDR-BRT parameters.

Results: I observed the largest dose D_{90-p} for prostate gland in group III (median value 94,31%, $BED_{90-p} = 155.31$ Gy) and group I (92.05%, 151.08 Gy). Biological effective dose (BED_{mean-p}) for all patients was estimated on 209.09 Gy. The value of biological dose given to 10% of urethra volume (BED_{10-u}) was found as 53.47 Gy in group II and 109.88 Gy in I. BED_{10-r} for rectum, for all patients enrolled to study, was 46.92 Gy in median value. Least dose BED_{mean-r} was observed in group III (20.11 Gy), in I and III doses were higher, respectively 39.62 and 42.97 Gy. Comparison of dose-volume parameters between HDR-BRT fractions revealed slight changes, in most cases statistically insignificant (Wilcoxon, Friedman tests). There is a tendency of reduction of rectum doses in group II (D_{max-r} , V_{100-r}) concurrent with D_{90-p} , BED_{90-p} reduction for target and reduction of D_{max-u} , BED_{max-u} , V_{100-u} , D_{mean-u} , BED_{mean-u} for urethra. In the third fraction in III group of HDR-BRT monotherapy I observed the tendency of lowering high doses points in prostate volume (V_{200-p} , V_{150-p} , V_{120-p} , D_{max-p}) concurrently with D_{90-p} , BED_{90-p} , V_{100-p} target parameters, D_{10-u} , BED_{10-u} , V_{100-u} urethra parameters which caused increase of V_{100-r} , D_{max-r} , BED_{max-r} rectum ones. There has been statistically significant difference in comparison all schemes of HDR-BRT treatment. II group dose-volume parameters were different from the others (SD_{-p} , V_{120-p} , D_{max-p} , D_{mean-u} , D_{min-u} , SD_{-u}). The clear influence of prognostic parameters as age, volume gland, number of needles on doses given during HDR-BRT procedure was found. Age parameter correlated with increasing value of D_{max-p} i BED_{max-p} (II group) and decreasing of V_{100-p} (also II), V_{150-p} , V_{120-p} , D_{min-r} , BED_{min-r} (III). Increasing prostate gland volume caused higher doses and volume parameters D_{90-p} , V_{100-p} in every scheme, higher doses D_{10-r} , BED_{10-r} , D_{mean-r} , BED_{mean-r} , D_{max-u} , BED_{max-u} in II group, higher doses V_{100-u} , D_{mean-u} , BED_{mean-u} in I. The more needles I used during procedure the higher doses D_{90-p} , BED_{90-p} , V_{100-p} were achieved in I group, the lower values of V_{200-p} , V_{100-r} were observed in the same group of patients. There was also clear correlation between needles number and doses D_{max-u} i BED_{max-u} in II group, volumes V_{150-p} , V_{120-p} , V_{100-p} in III.

Conclusions:

1. The dose in reference volume had a tendency to be lower after correction of dose-volume of organs at risk (rectum and urethra). The higher fraction dose is given, the higher risk of unexpected dose-volume in prostate and rectum/urethra reveals.
2. Trend of decreasing values of doses in target volume to protect organs at risk may cause less beneficial dose-volume histogram in the treatment area.
3. In the III group increasing age parameter was correlated with better dose arrangement. In the II group of younger patients there was a slight tendency to decrease dose-volume parameters in the reference target and to increase in rectum and urethra volume. Better dose arrangement in prostate gland correlated well with increasing initial volume of prostate gland in every scheme group. It was caused by greater number of needle applicators used in I and II group of patients. In monotherapy scheme I noted higher risk of increasing doses inside treated area of prostate gland.
4. There was a correlation between initial prognostic parameters (age, gland volume, number of needles) and dose-volume parameters of HDR-BRT procedure of reference area and organs at risk.

These observation suggests increasing risk of unsatisfactory results in prostate dose cover in young men group of patients with relatively small volume of the gland.

Cel pracy:

1. Porównanie wybranych wartości dawek i parametrów objętości leczonych techniką HDR-BRT w trzech schematach frakcjonowania, z uwzględnieniem dawek biologicznych.
2. Ocena wpływu wybranych czynników prognostycznych na uzyskane wartości dawek i parametrów objętości, w zależności od różnych schematów brachyterapii HDR.

Materiał i metody: W okresie od czerwca 2006 r. do października 2007 r. w Zakładzie Brachyterapii Wielkopolskiego Centrum Onkologii w Poznaniu badaniem objęto 65 chorych mężczyzn z rozpoznaniem raka gruczołu krokowego. Pięćdziesięciu pięciu pacjentów leczono metodą skojarzoną: HDR-BRT + teleradioterapia (EBRT), 37 otrzymało jedną, a 18 dwie frakcje brachyterapii śródtkankowej wg schematu odpowiednio: EBRT 50 Gy/ + HDR-BRT 15 Gy (grupa I) i EBRT 46 Gy/+ HDR-BRT 2 × 10 Gy (grupa II). U 10 chorych zastosowano monoterapię HDR-BRT jako metodę samodzielnią, w trzech frakcjach i dawce całkowitej 45 Gy (grupa III). Analizie poddano wartości dawek i objętości dla gruczołu krokowego: D_{min-p} , D_{max-p} , D_{mean-p} , D_{90-p} , SD_{-p} , V_{100-p} , V_{120-p} , V_{150-p} i V_{200-p} oraz $D_{min-u,r}$, $D_{max-u,r}$, $D_{mean-u,r}$, $D_{10-u,r}$, $SD_{-u,r}$, $V_{crit-u,r}$ i $V_{100-u,r}$ odpowiednio dla cewki moczowej i odbytnicy. Wartości dawek i objętości porównano celem oceny ich zmienności w różnych schematach leczenia. Dokonano ponadto oceny wpływu: wieku, stopnia zaawansowania klinicznego (system TNM), stopnia złośliwości histologicznej wg Gleasona (GS), wyjściowej wartości PSA (i-PSA), liczby implantowanych igieł śródtkankowych oraz objętości gruczołu krokowego na wartości dawek i objętości planu leczenia.

Wyniki: Najwyższą wartość dawki D_{90-p} w obrębie gruczołu krokowego zaobserwowano w grupie III (mediana

94,31%, $BED_{90-p} = 155,31$ Gy) oraz grupie I (92,05%, 151,08 Gy). Biologiczna dawka średnia (BED_{mean-p}) dla wszystkich grup chorych była równa 209,09 Gy. Wartość dawki podanej na 10% objętości cewki moczowej jako narządu krytycznego (BED_{10-u}) wynosiła średnio od 53,47 Gy w grupie II do 109,88 Gy w I, na jedną frakcję. Wartość BED_{10-r} dla odbytnicy, dla wszystkich chorych wyniosła średnio 46,92 Gy. Najmniejszą dawkę BED_{mean-r} stwierdzono w grupie III (20,11 Gy), wyższą w grupach I i III, odpowiednio 39,62 i 42,97 Gy. Porównanie wartości dawek i objętości pomiędzy frakcjami brachyterapii HDR wykazało nieznaczne zmiany, w przeważającej części nieistotne statystycznie (testy Wilcozona i Friedmana). W grupie II zauważono tendencję do zmniejszenia dawek w drugiej frakcji w obrębie odbytnicy (spadek D_{max-r} , V_{100-r}) kosztem zmniejszenia D_{90-p} , BED_{90-p} dla gruczołu krokowego oraz D_{max-u} , BED_{max-u} , V_{100-u} , D_{mean-u} , BED_{mean-u} dla cewki moczowej. W grupie III w trzeciej frakcji, w obrębie obszaru napromienianego zaobserwowano tendencję do zmniejszenia objętości punktów dawek wysokich (V_{200-p} , V_{150-p} , V_{120-p} , D_{max-p}), kosztem parametrów D_{90-p} , BED_{90-p} , V_{100-p} dla gruczołu krokowego, zmniejszenia D_{10-u} , BED_{10-u} , V_{100-u} oraz wzrostu V_{100-r} , D_{max-r} , BED_{max-r} dla odbytnicy. Istotne różnice wykazano po porównaniu dawek we wszystkich trzech schematach leczenia. Wartości dawek i objętości w grupie II okazały się statystycznie różne od pozostałych (SD_{-p} , V_{120-p} , D_{max-p} , D_{mean-u} , D_{min-u} , SD_{-u}). Wykazano istotny wpływ czynników wieku, objętości, liczby aplikatorów na wysokość dawek w gruczole krokowym, cewki moczowej, odbytnicy. Parametr wieku korelował wprost proporcjonalnie z D_{max-p} i BED_{max-p} (II grupa) oraz odwrotnie proporcjonalnie V_{100-p} (II grupa), V_{150-p} , V_{120-p} , D_{min-r} , BED_{min-r} (III grupa). Objętość gruczołu okazała się wprost proporcjonalna do D_{90-p} , V_{100-p} we wszystkich grupach, wprost proporcjonalna do D_{10-r} , BED_{10-r} , D_{mean-r} , BED_{mean-r} w II grupie, wprost proporcjonalna do D_{max-u} , BED_{max-u} w II grupie wprost proporcjonalna do V_{100-u} , D_{mean-u} , BED_{mean-u} w I grupie. Większa liczba aplikatorów igłowych w I grupie była związana z wyższą wartością parametrów D_{90-p} , BED_{90-p} , V_{100-p} (I grupa), mniejszą wartością V_{200-p} , V_{100-r} (I grupa), mniejszą wartością D_{max-u} i BED_{max-u} (II grupa) oraz większą wartością V_{150-p} , V_{120-p} , V_{100-p} (III grupa).

Wnioski:

1. Wysokość dawki w obszarze referencyjnym (gruczoł krokowy) ulegała obniżeniu po korekcie dawki w odbytnicy, podobną zależność zaobserwowano dla wartości dawek w cewce moczowej. Wzrost dawki frakcyjnej zwiększa ryzyko nieoczekiwanych wartości dawek i objętości w obszarze napromienianym i narządach krytycznych.
2. Oznacza to, że dążenie do obniżenia dawek celem oszczędzenia narządów zdrowych może wiązać się z mniej korzystnym rozkładem dawki w obrębie narządu leczonego – gruczołu krokowego.
3. W grupie III wzrost wieku był powiązany z korzystniejszym rozkładem dawek. W grupie II niższy wiek był związany z obniżeniem dawki w obszarze referencyjnym oraz wzrostem w narządach krytycznych. Wzrost objętości gruczołu krokowego we wszystkich grupach korelował z lepszym rozkładem dawki. Wiązała się z tym większa liczba zastosowanych aplikatorów w grupie I i II, jedynie w grupie III wraz ze wzrostem liczby aplikatorów wzrastało nie-

bezpieczeństwo wzrostu dawek w obrębie gruczołu krokowego.

4. Stwierdzono zależność analizowanych wyników prognostycznych: wieku, objętości gruczołu i liczby aplikatorów z wartościami dawek w obszarze referencyjnym oraz narządach krytycznych.

Powyzsze obserwacje sugerują ryzyko uzyskania gorszego rozkładu dawki HDR-BRT w grupie młodych mężczyzn o niewielkiej objętości gruczołu krokowego.

[68]

Innovations in head and neck surgery

Innowacje w chirurgii głowy i szyi

Wojciech Golusiński

Katedra I Klinika Chirurgii Szcękowo-Twarzowej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Nowotwory głowy i szyi należą do grupy nowotworów, których leczenie jest bardzo trudne.

Jedynie interdyscyplinarne współdziałanie i dobry warsztat chirurgiczny mogą zapewnić powodzenie w leczeniu tej grupy nowotworów.

Doskonałe unaczynienie i unerwienie tej okolicy anatomicznej, sąsiadujące narządy zmysłów powodują, że chirurgia ta wymaga dodatkowych zaawansowanych technologii medycznych celem uzyskania dobrej wizualizacji samej zmiany oraz możliwości jej usunięcia w granicach zdrowych tkanek.

Szczególną uwagę chciałbym zwrócić na postępy w chirurgii minimalnie inwazyjnej, która dotyczy takich struktur anatomicznych, jak: podstawa czaszki, gardło dolne, krtań, tarczyca, przytarczyce.

Współczesne narzędzia stosowane w chirurgii głowy i szyi to: laser CO₂, laser diodowy, endoskopy i neuronawigacja.

Szczególnie wprowadzenie neuronawigacji pozwoliło na precyzyjne wykorzystanie obrazowania zespolonego z przekazem bezpośrednim z pola operacyjnego. Każdy ruch ręki chirurga i narzędzia chirurgicznego widoczny jest na ekranie przedstawiającym okolicę anatomiczną, której dotyczy zabieg.

Chirurgia stała się bezpieczniejsza, dokładniejsza. Bezpośrednio przekłada się to na lepsze wyniki leczenia.

Chirurgia głowy i szyi z radioterapią i chemioterapią wyznaczyła nowe standardy leczenia nowotworów głowy i szyi.

Przy coraz częstszych próbach zachowania narządu *organ preservatio* wdrażane jest leczenie pierwotne w postaci radio- i chemioterapii. Jednakże w ponad 40% przypadków występują wznovy, których jedyną możliwością leczenia pozostaje chirurgia ratująca.

Chirurgia ratująca to nowe wyzwanie dla współczesnego chirurga głowy i szyi. Jest ona znacznie trudniejsza od chirurgii pierwotnej. Prawidłowe jej przeprowadzenie zależy nie tylko od doświadczenia chirurga, lecz także od postępu technologicznego

[69]

Blood dissemination of non-advanced endometrial cancer

Rozsiew krwiopochodny u chorych na niezaawansowanego raka endometrium

Marian Reinfuss, Paweł Blecharz

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

Aim of the study: Presentation of treatment outcomes in patients with non-advanced endometrial cancer, disseminated via blood to distant sites.

Material and methods: Between 1985-2005, 1510 patients with endometrial cancer, staged FIGO I and II were treated in Center of Oncology, Krakow. During follow-up, blood dissemination to lung, brain, liver and bones was diagnosed in 110 patients (7.3%). Treatment methods, toxicity and outcomes in this group of patients was analyzed and compared with literature data.

Results: Solitary/multiple metastases to lung were observed in 45/10 patients, to brain – in 6/1 patients, to liver – in 14/8 patients and to bones – in 6/4 patients. Sixteen patients were diagnosed with multiorgan dissemination. Toxicity depended on treatment method and was the highest for chemotherapy group. Overall 1-year survival rates were 33,3% in patients disseminated to lung, 20% – in patients disseminated to brain, 12,5% – in patients disseminated to liver and 21.7% – in patients disseminated to bones.

Conclusions: Blood dissemination in patients with non-advanced endometrial cancer is relatively rare but has poor prognosis. The majority of patient disseminated to lung, liver and bones are treated with chemo- and hormonotherapy, while brain metastases are treated mostly with irradiation and surgery. No treatment standards in this patients were established up to date.

Cel pracy: Prezentacja wyników leczenia pacjentek chorych na niezaawansowanego raka endometrium, u których w trakcie obserwacji wystąpił krwiopochodny rozsiew do narządów odległych.

Materiał i metody: W latach 1985–2005 w krakowskim Oddziale Centrum Onkologii leczono 1510 chorych na raka endometrium w I i II wg FIGO stopniu zaawansowania. U 110 pacjentek (7,3%) w trakcie obserwacji stwierdzono krwiopochodny rozsiew choroby, głównie do płuc, mózgu, wątroby i kości. Przeanalizowano metody leczenia przerzutów, ich toksyczność oraz przeżycia pacjentek z rozsiałym rakiem endometrium i porównano je z danymi zawartymi w dostępnym piśmiennictwie.

Wyniki: Izolowane lub mnogie przerzuty do płuc wystąpiły u 45/10 chorych, do mózgu u 6/1 chorych, do wątroby – u 14/8 chorych i do kości – u 6/4 chorych. U 16 chorych stwierdzono rozsiew wielonarządowy. Toksyczność leczenia różniła się w zależności od stosowanych metod leczenia – chirurgii, radioterapii, chemioterapii i hormonoterapii – i była największa w grupie otrzymującej chemioterapię. Całkowite 12-miesięczne przeżycia u chorych z rozsiewem

do płuc wyniosły 33,3%, do mózgu – 20%, do wątroby – 12,5% i do kości – 21,7%.

Wnioski: Krwiopochodne przerzuty u chorych na niezawansowanego raka endometrium są stosunkowo rzadkie, ale rokowanie tych chorych jest złe. U chorych z przerzutami do płuc, wątroby i kości główną rolę w leczeniu odgrywa chemo- i hormonoterapia, a do mózgu – radioterapia i chirurgia. Brakuje standardów leczenia tych chorych.

[70]

Efficacy measurement in second line treatment of metastatic renal cell carcinoma

Ocena skuteczności drugiej linii leczenia przerzutowego raka nerki

Piotr Tomczak, Maria Litwiniuk, Piotr Kolenda, Marzena Chajewska-Ciekańska

Oddział Chemioterapii, Klinika Onkologii, Uniwersytet im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Renal cell carcinoma (RCC) represents approximately 1% of all cancers. 30% of patients demonstrate metastasis in diagnosis, and 30% with surgical treatment are said to have the recurrence of the disease. The effectiveness of systemic therapy based on immunotherapy is generally unsatisfactory and it affects the course of the disease to a lesser extent. A breakthrough in systemic treatment is associated with the introduction of new drugs belonging to the "targeted therapy". To date, six new drugs used in the treatment of metastatic renal cell carcinoma were registered, including in particular the first-line therapy. Further progress follows the introduction of drugs used in the second-line therapy. The efficacy and indications as for the use of these drugs are still under discussion, assessment and require further study. Pazopanib and sorafenib are used after failure of immunotherapy, whereas everolimus in patients previously treated with tyrosine kinase inhibitors. Everolimus alone was assessed in a randomized, prospective phase III study and is the basis for second-line therapy in patients with RCC. However, it seems that sequential therapy based on the scheduled order may constitute an alternative therapeutic approach. So far there is though no evidence of comparable effectiveness of such proceedings.

An attempt was made to assess the effectiveness of second-line therapy in patients treated in the Oncology Clinic. The analysis included 30 second-line therapy patients treated with sorafenib, pazopanib and afinitor. Progression-free survival (PFS) and treatment tolerance were evaluated. Due to the short observation time (pilot study) the results will be presented during the Third Congress of *Contemporary Oncology*.

Key words: renal cell carcinoma, second-line therapy, targeted therapy.

Rak nerki stanowi ok. 1% wśród wszystkich nowotworów złośliwych. U 30% pacjentów choroba ma w momencie rozpoznania charakter uogólniony, a u 30% chorych poddanych

radikalnej operacji dochodzi do nawrotu. Skuteczność leczenia systemowego opartego na immunoterapii jest ogólnie niezadowolająca i w niewielkim stopniu wpływa na przebieg choroby. Przełom w leczeniu systemowym wiąże się z wprowadzeniem nowych leków zaliczanych do „terapii celowanej”. Dotąd zarejestrowanych zostało 6 nowych leków stosowanych w terapii przerzutowego raka jasnokomórkowego nerki, w tym przede wszystkim w ramach terapii pierwszoliniowej. Dalszy postęp w terapii związany jest z wprowadzeniem leków, które znalazły zastosowanie w leczeniu drugiej linii. Skuteczność i wskazania do stosowania tych leków są nadal przedmiotem dyskusji, ocen i wymagają dalszych badań. Pazopanib i sorafenib stosowane są po niepowodzeniu terapii immunologicznej, natomiast everolimus u chorych leczonych wcześniej inhibitorami kinaz tyrozynowych. Everolimus jako jedyny został oceniony w ramach prospektywnego badania z randomizacją trzeciej fazy i stanowi podstawę terapii drugiej linii pacjentów z rakiem nerki. Wydaje się jednak, że leczenie sekwencyjne oparte na zaplanowanej kolejności może być alternatywnym podejściem terapeutycznym. Dotąd brak jednak dowodów o porównywalnej skuteczności takiego postępowania.

Podjęto próbę oceny skuteczności terapii drugiej linii u chorych leczonych w Klinice Onkologii. Analizą objęto 30 chorych, u których w ramach terapii drugiej linii zastosowano sorafenib, pazopanib oraz afinitor. Ocenie poddano czas wolny od progresji choroby (PFS) oraz tolerancję leczenia. Ze względu na krótki czas obserwacji (badanie pilotażowe) wyniki zostaną przedstawione podczas III Kongresu *Współczesnej Onkologii*.

Słowa kluczowe: jasnokomórkowy rak nerki, druga linia leczenia, terapia celowana.

Session 12

Targeted therapies II

Terapie celowane II

[71]

New perspectives for application of dendritic cells in cancer immunotherapy

Nowe perspektywy zastosowania komórek dendrytycznych w immunoterapii nowotworów

Jacek Roliński

Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Despite significant progress in the understanding of tumor biology and the development of new diagnostic and treatment methods, most malignancies remain incurable. Introduction of novel therapeutic methods, including new cytostatic regimens and targeted therapies, such as monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors, have increased remission rates as well as improved patients' survival, but the ability to cure many cancer patients remains elusive. It is thus necessary to further develop alternative strategies to improve patients' prognosis. Immune-based treatments represent a new group of therapeutic strategies for patients with cancer. It seems that an advantageous treatment option may be cellular immunotherapy with dendritic cell (DC) vaccines which might induce long-term specific anticancer responses with immune memory cells, which could contribute to effective and lasting elimination of malignant cells. Vaccines with dendritic cells (DC) pulsed *ex vivo* with tumor cells lysates or apoptotic bodies are used to stimulate anti-tumor immunity in patients with CLL. Vaccination was feasible and safe, however no objective response is noted. Among the causes considered to explain the unsatisfying results of therapeutic vaccination and the discrepancies between the immunological and clinical responses there is suppression of immune response by T regulatory cells (Tregs). Also in our study higher levels of T regulatory cells are observed in patients not responding to the DC therapy. The recent studies identified Treg cells as a potential new target of immunotherapy in patients with cancer and therefore current strategies are aimed to enhance the efficacy of anti-cancer vaccines include depletion of Tregs.

Mechanizmy rozwoju nowotworu oraz poszukiwanie nowych metod terapii chorób nowotworowych stanowią od lat przedmiot intensywnych badań prowadzonych na całym świecie. Wprowadzenie nowych metod leczenia, takich jak stosowanie przeciwciał monoklonalnych i inhibitorów kinaz tyrozynowych, zwiększyło odsetek uzyskiwanych remisji i wydłużyło czas przeżycia chorych na nowotwory, jednak nadal większość z nich pozostaje nieuleczalna. Brak skutecznego leczenia większości chorób nowotworowych sprawia, że poszukiwanie nowych form terapii stanowi jedno z najważniejszych wyzwań współczesnej medycyny. Jedną z nowych metod, która może zwiększyć szansę pacjentów

na pokonanie choroby, wydaje się immunoterapia z zastosowaniem komórek dendrytycznych (*dendritic cells* – DC). Uważa się, że najlepiej spełniają one funkcję adiuwantów odporności przeciwnowotworowej ze względu na ważną rolę w inicjacji pierwotnej odpowiedzi immunologicznej. Wyniki wielu badań wykazały, że DC stymulowane przez antygeny nowotworowe (np. lizaty komórek nowotworowych lub całe komórki nowotworowe) mają zdolność indukcji swoistych limfocytów cytotoksycznych skierowanych przeciw komórkom nowotworowym oraz komórek pamięci immunologicznej. Liczne badania doświadczalne i kliniczne, prowadzone także przez nasz zespół, dotyczą swoistej czynnej aktywacji układu odpornościowego u chorych na nowotwory za pomocą szczepionek w postaci odpowiednio modyfikowanych antygenów nowotworowych, a także stymulowanych antygenami nowotworowymi DC. Badania z ostatnich lat dostarczyły interesujących danych, które mogą tłumaczyć mechanizmy nieskutecznej odpowiedzi na immunoterapię. Opisano m.in. populację limfocytów Treg o działaniu hamującym odpowiedź immunologiczną. W warunkach fizjologicznych hamują one nadmierny rozwój odpowiedzi zapalnej lub autoimmunizacji, niestety mogą działać hamująco także na odpowiedź przeciwnowotworową. W badaniach *in vitro* stwierdzono hamujący wpływ komórek Treg na dojrzewanie komórek dendrytycznych stymulowanych antygenami nowotworowymi, a w badaniach *in vivo* wykazano hamujący wpływ komórek Treg na limfocyty T efektorowe. Limfocyty Treg odgrywają istotną rolę zarówno w procesach ekspansji nowotworu we wczesnych fazach jego rozwoju, jak i mogą niekorzystnie wpływać na wyniki immunoterapii. W pracy omówiono najnowsze wyniki badań dotyczące różnych metod zahamowania funkcji i/lub delecji komórek Treg u chorych na nowotwory.

[72]

Application of iNKT cells in cancer immunotherapy

Zastosowanie komórek iNKT w immunoterapii nowotworów

Iwona Hus

Klinika Hematoonkologii i Transplantacji Szpiku, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

iNKT cells (invariant natural killer T cells) represent a distinct population of T cells, characterized by an invariant T-cell receptor $V\alpha 24$ chain. iNKT cells possess the unique ability to recognize lipid antigens presented by monomorphic CD1d molecule (similar to MHC class I molecules). A specific synthetic ligand, inducing proliferation and cytokine production by iNKT cells is the α -galactosylceramid (α -GalCer). Data from recent years suggest the crucial role of iNKT cells in tumor immunity. *In vitro* studies have shown that, activated iNKT cells exert direct cytotoxic effects through the expression of effector molecules that induce cell death, such as perforin, FasL and TRAIL. In addition, through secre-

tion of cytokines, especially Th1 and cell-to-cell contact, they may indirectly stimulate other cells of innate and acquired immunity, such as Th1 cells, cytotoxic CD8+ T cells, natural killer cells and dendritic cells. α Gal-Cer molecule, presented in the context of CD1d, strongly stimulates both direct and indirect anti-tumor action of iNKT cells. The subject of many experimental studies was not only the impact of iNKT for the anti-tumor immunity, but also the development of anti-cancer immune therapy strategies with iNKT or aimed at the activation of iNKT cells *in vivo*. It has been shown on murine models that administration α Gal-Cer or α GalCer-pulsed dendritic cells induced activation of iNKT and eradicated established metastatic tumors. In the initial phase I clinical trials, patients with advanced cancers were injected α GalCer and α GalCer-loaded dendritic cells to activate iNKT cells *in vivo*. A distinct activation of the immune system was observed, but only in cancer patients with detectable iNKT cells in peripheral blood. Although no objective tumor regression was noted, stable disease was recorded in several patients without any toxicity. Some patients even showed a (transient decrease of serum tumor markers of necrosis of the tumor. In the other trials, iNKT expanded and activated *ex vivo* with α GalCer-loaded dendritic cells were used. These initial studies showed that the treatment stimulates anti-cancer immune responses, likewise it is safe and well tolerated even in patients with advanced disease.

Komórki iNKT (*invariant natural killer T cells*) stanowią odrębną populację limfocytów T, która charakteryzuje się niezmiennym rdzeniem receptora limfocyty T kodowanym u ludzi przez geny *V α 24*. Mają one wyjątkową zdolność rozpoznawania antygenów lipidowych prezentowanych przez monomorficzną cząsteczkę CD1d (zbliżoną do cząsteczek MHC klasy I). Swoistym syntetycznym ligandem, indukującym proliferację i wytwarzanie cytokin przez komórki iNKT jest α -galaktozyloceramid (α -GalCer). Dane z ostatnich lat sugerują istotne kluczowe znaczenie komórek iNKT w odpowiedzi przeciwnowotworowej. W badaniach *in vitro* wykazano bowiem, że aktywowane komórki iNKT wywierają bezpośrednie działanie cytotoksyczne poprzez ekspresję cząsteczek efektorowych indukujących śmierć komórki, takich jak perforyna, FasL czy TRAIL. Ponadto, poprzez wydzielanie cytokin, przede wszystkim Th1 oraz kontakt między komórkami mogą one pośrednio stymulować inne rodzaje komórek odporności wrodzonej i nabytej, takich jak limfocyty T pomocnicze Th1, limfocyty cytotoksyczne T CD8+, komórki NK i komórki dendrytyczne. Prezentowana w kontekście CD1d, cząsteczką α Gal-Cer silnie pobudza zarówno bezpośrednio jak i pośrednio przeciwnowotworowe działanie komórek iNKT. Przedmiotem wielu badań doświadczalnych był nie tylko wpływ iNKT na wrodzoną i nabytą odporność przeciwnowotworową, lecz także strategie immunoterapii przeciwnowotworowej dotyczące zastosowania iNKT lub ich aktywacji *in vivo*. Wykazano, że podanie myszom z wszczepionym nowotworem, α Gal-Cer lub komórek dendrytycznych stymulowanych α Gal-Cer wywołuje aktywację iNKT i prowadzi do zahamowania powstawania przerzutów. Na podstawie wyników badań doświadczalnych przeprowadzono wstępne badania kliniczne I fazy, w których stosowano α GalCer lub komórki dendrytyczne stymulowane α Gal-Cer w celu aktywacji komórek iNKT *in vivo* u chorych na

drobnokomórkowego raka płuc. U części chorych obserwowano istotne zwiększenie komórek iNKT we krwi obwodowej. W badaniach klinicznych wykorzystuje się także same iNKT namnażane *in vitro* przy użyciu komórek dendrytycznych stymulowanych α GalCer. Wyniki tych wstępnych badań wykazały, że leczenie stymuluje odpowiedź immunologiczną, jest bezpieczne i dobrze tolerowane nawet u pacjentów z zaawansowaną chorobą nowotworową.

[73]

Target therapy of neuroendocrine neoplasms: results of the treatment with radiolabelled somatostatin analogues

Leczenie celowane nowotworów neuroendokrynnych: ocena wyników terapii znakowanymi analogami somatostatyny

Daria Handkiewicz-Junak

Department of Nuclear Medicine and Endocrine Oncology, Maria Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center and Institute of Oncology, Gliwice Branch

Neuroendocrine neoplasm (NETs) are relatively rare tumors that tend to be slow growing but often diagnosed when metastatic. Surgery is the first-line treatment in patients with localized disease however, in case of inoperable or metastatic disease there is no effective therapy.

Somatostatin receptors (usually SSTR2) are overexpressed in majority of NET. Somatostatin analogues (SSTA) with their high affinity to SSTR2 and long blood half-time, are used in symptomatic treatment of carcinoid syndrome. New methods of SSTA labeling enabled their application in NETs diagnosis and therapy. Studies with the two most often used radiopeptides 90Y-DOTATOC and 177Lu-DOTATATE resulted in response rate (complete and partial) in about 30% of treated patients. The treatment is well tolerated and the main side effects are radiation induced kidney and bone marrow toxicity.

Nowotwory neuroendokrynne (NET) należą do rzadkich, wolno rosnących nowotworów, często rozpoznawanych dopiero w stadium rozsiewu do narządów odległych. Leczenie operacyjne należy do podstawowych metod stosowanych w terapii NET. Jednak w przypadku zmian nieoperacyjnych i/lub przerzutów odległych nie ma skutecznych metod leczniczych.

Jedną z cech charakterystycznych NET jest ekspresja receptorów dla somatostatyny, głównie receptora typu 2 (SSTR2). Analogi somatostatyny (SSTA), charakteryzujące się wysokim powinowactwem do SSTR2 przy jednoczesnym długim okresie półtrwania, znajdują zastosowanie przede wszystkim w leczeniu objawów zespołu rakowiaka. Nowe metody izotopowego znakowania SSTA, które umożliwiają zarówno zachowanie stabilności związku, jak i wysokiego powinowactwa do SSTR2, umożliwiły rozwój scyntygraficznych metod obrazowania NET, a także prób ich terapeutycznego zastosowania. Badania kliniczne z zastosowaniem

⁹⁰Y-DOTATOC i ¹⁷⁷Lu-DOTATATE wykazały, że jest to leczenie skuteczne, pozwalające na osiągnięcie ok. 30% odpowiedzi na leczenie w postaci całkowitej lub częściowej remisji choroby nowotworowej. Leczenie jest dobrze tolerowane, najczęstsze objawy uboczne to popromienne uszkodzenie układu krwiotwórczego, a w sporadycznych przypadkach popromienne uszkodzenie nerek.

Session 13

Progress of therapy, diagnostics and prevention**Postępy terapii, diagnostyki i profilaktyki**

[74]

Current therapies of chronic lymphoblastic leukemia*Współczesne leczenie przewlekłej białaczki limfocytowej***Mieczysław Komarnicki**

Katedra i Klinika Hematologii, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Przewlekła białaczka limfocytowa (PBL) występuje u ok. 3–4 osób/100 000.

Większość zachorowań dotyczy osób powyżej 55. roku życia z przewagą mężczyzn. Zróżnicowany czas przeżycia jest powiązany ze stopniem zaawansowania choroby, który określa się wg klasyfikacji wg Rai (0, I, II, III, IV) lub Bineta (A, B, C). Jednoznacznie negatywny wpływ na przeżycie mają także zmiany cytogenetyczne (del 11q, del 17q), niezmutowany IgVH, zwiększona ekspresja CD38 oraz ZAP70. U części chorych nie wdraża się leczenia natychmiast po ustaleniu rozpoznania, lecz stosuje się zasadę: „obserwuj i czekaj” („*watch and wait*”). Ustalonymi wskazaniami do rozpoczęcia leczenia są: anemia, trombocytopenia, czas podwojenia liczby limfocytów (< 6 miesięcy), zwiększenie liczby limfocytów o 50% w okresie 2 miesięcy, znaczna organomegalia (splenomegalia, limfadenopatia), wystąpienie objawów ogólnych (temperatura, poty nocne, spadek ciężaru ciała).

Od kilku dekad podstawowym lekiem wdrażanym u chorych na PBL był chlorambucil. Po zastosowaniu chlorambucilu remisję całkowitą (CR) osiągało 2–4% pacjentów, natomiast odpowiedź (OR) na leczenie uzyskiwało ok. 40%. Duże nadzieje na poprawę wyników leczenia wiązano z wprowadzeniem analogów puryn, takich jak fludarabina, cladribina (2cda) oraz pentostatyna. Leki te znacząco poprawiły odsetek chorych, którzy osiągnęli CR oraz OR, natomiast nie miały wpływu na wydłużenie czasu przeżycia (OS) w porównaniu z chlorambucilem, nawet w połączeniu z endoksanem. Nową jakością spowodowało wprowadzenie przeciwciał monoklonalnych do arsenatu leczniczego. Zastosowanie schematu terapeutycznego FCR (fludarabina, cyclofosfamid, rituksimab) wpłynęło w sposób istotny statystycznie na wydłużenie OS, zarówno w pierwszej, jak i drugiej linii leczenia. W związku z tym terapia wg schematu FCR jest obecnie uważana za standard leczenia. Nie wszyscy autorzy zgadzają się jednakże z tym poglądem i trwają próby kliniczne, które mają potwierdzić lub zanegować wartość takiego leczenia. Innym przeciwciałem monoklonalnym, które znalazło miejsce w wybranych grupach (szczególnie del 17q) chorych jest alemtuzumab. Przy planowaniu leczenia u chorych na PBL należy wziąć pod uwagę przeszczep szpiku, szczególnie alop przeszczep ze zredukowanym kondycjonowaniem (RIC).

[75]

Receptor positron emission tomography (PET) with gallium labeled somatostatin analogues in neuroendocrine cancers*Pozytonowa tomografia emisyjna (PET) receptorowa z użyciem analogów somatostatyny znakowanych galem pozytonowym w rakach neuroendokrynych***Zbigniew Wygoda**

Centre of Oncology – Institute, Branch Gliwice

Wstęp: Scyntygrafia receptorowa znakowanymi analogami somatostatyny jest stosowana od wielu już lat w diagnostyce guzów neuroendokrynych. Rozwój technologii pozytonowej tomografii emisyjnej (*positron emission tomography* – PET) oraz wprowadzenie generatorów germanowo-galowych umożliwiły również niedawno wdrożenie do praktyki klinicznej badań receptorowych z zastosowaniem skanerów PET.

Cel pracy: Celem niniejszej pracy było podsumowanie dotychczasowych wyników wykorzystania scyntygrafii receptorowej PET w diagnostyce raków neuroendokrynych.

Materiał i metody: Ocenie poddano 168 badań receptorowych PET znakowanymi galem analogami somatostatyny, wykonanych u 85 pacjentów z rozpoznaniem guza neuroendokrynnego. Rozpoznanie obejmowało 109 badań u 61 pacjentów z rozpoznaniem raka neuroendokrynnego oraz 59 badań u 24 pacjentów z rozpoznaniem rakowiaka. Wszystkie badania wykonywano na skanerze hybrydowym PET-CT po podaniu 2,8–4 mCi ⁶⁸Ga-DOTATATE. U części pacjentów wykonano również tomografię PET z zastosowaniem FDG, po podaniu 3,7–12,5 mCi ¹⁸F-FDG.

Wyniki: Stwierdzono gromadzenie radioznacznika w przypadku 124 badań receptorowych (49 pacjentów) z rozpoznaniem raka neuroendokrynnego oraz 32 badań receptorowych (16 pacjentów) z rozpoznaniem rakowiaka w zakresie ogniska pierwotnego u pacjentów nieleczonych lub nieoperacyjnych oraz ognisk przerzutowych w węzłach chłonnych, wątrobie i płucach. Stwierdzono ujemną korelację obecności receptorów somatostatynowych ze stopniem złośliwości i odróżnicowania nowotworu ($p < 0,05$). U pacjentów, u których wykonano również FDG-PET, obserwowano ujemną korelację wyniku badania z wynikiem badania DOTATATE-PET, w zależności od stopnia złośliwości histologicznej nowotworu.

Wnioski: Badanie ⁶⁸Ga-DOTATATE-PET jest cennym badaniem diagnostycznym w guzach neuroendokrynych. Pozwala na ocenę obecności i lokalizacji ognisk choroby u pacjentów z dojrzałym rakiem neuroendokrynnym.

Background: Receptor scintigraphy with radiolabeled somatostatin analogues is one of typical diagnostic method in neuroendocrine tumors. PET technology development and using of germanium-gallium generators in last years give the possibility receptor examinations with using PET scanners.

Aim of the study: The assessment of results of PET with gallium labeled somatostatin analogues in diagnostic of neuroendocrine cancers was the aim of this study.

Material and methods: One hundred sixty eight PET exams with somatostatin analogues were performed in 85 patients with neuroendocrine tumors were analyzed. One hundred nine exams in 61 patients with neuroendocrine cancer and 59 exams in 24 patients with carcinoid were included into analysis. All exams were performed on hybrid PET-CT scanner after administration of 2,8-4 mCi ^{68}Ga -DOTATATE. FDG-PET after administration 3,7-12,5 mCi of ^{18}F -FDG was performed in some cases.

Results: Radiotracer uptake was stated in 124 receptor examinations (49 patients) with neuroendocrine cancer and 32 receptor examinations (16 patients) in carcinoid. The foci of uptake were observed also in primary tumor in untreated or inoperable patients and in metastatic lymph nodes, liver and lungs. The negative correlation between the presence of somatostatin receptors and the stage of undifferentiation of neoplasm cells ($p < 0.05$) was observed. The negative correlation between FDG-PET results and DOTATATE-PET results was stated.

Conclusions: ^{68}Ga -DOTATATE-PET is valuable diagnostic examination in patients with neuroendocrine tumors. It allows to assess the presence and localisation of neoplasm foci in patients with well differentiated neuroendocrine cancer.

[76]

Why do Polish women not have preventive examinations? What needs to be changed?

Dlaczego kobiety w Polsce nie zgłaszają się na badania profilaktyczne – co trzeba zmienić?

Agnieszka Dyzmann-Sroka

Zakład Epidemiologii i Profilaktyki Nowotworów, Wielkopolskie Centrum Onkologii w Poznaniu, Wojewódzki Ośrodek Koordynujący Populacyjny Program Wczesnego Wykrywania Raka Piersi

Wstęp: W 5 lat po uruchomieniu Narodowego programu zwalczania chorób nowotworowych badania cytologiczne (w ramach populacyjnego programu profilaktyki raka szyjki macicy) wykonało 28%, a badania mammograficzne (w ramach populacyjnego programu profilaktyki raka piersi) 38% Polek. Ważne staje się znalezienie odpowiedzi na pytanie: dlaczego Polki nie chcą się badać?

Cel pracy: Celem pracy jest znalezienie odpowiedzi na dwa pytania: Dlaczego kobiety w Polsce nie zgłaszają się na bezpłatne badania profilaktyczne? oraz: Co trzeba zrobić, aby to zmienić?

Materiał i metody: Materiał badawczy oparto na wynikach 5 badań ankietowych (PBS DGA-2006; Ex MBA-2008; PAB-2009; Millward Brown-2010; SIMP-2007-2010), doświadczeniach własnych z kierowania Wojewódzkim Ośrodkiem Koordynującym Populacyjny Program Wczesnego Wykrywania Raka Piersi w Wielkopolsce, dane statystyczne pobrano z Systemu Informatycznego Monitorowania Profilaktyki (SIMP), dane epidemiologiczne z GLOBOCAN 2008.

Wyniki: Polska jest krajem średniego ryzyka zachorowania na raka piersi, niemniej od lat 70. ubiegłego wieku rak

piersi pozostaje nowotworem najczęściej rozpoznawanym wśród kobiet. Istotnym problemem, który niekorzystnie wyróżnia Polskę na tle innych krajów UE, jest niski wynik przeżyć 5-letnich chorych, co wskazuje na niską wyleczalność nowotworów piersi. Jak wykazały badania ankietowe, na niską zgłaszalność Polek na badania profilaktyczne mają wpływ zarówno przyczyny społeczne, psychologiczne, ekonomiczne, jak i organizacyjne. Polki reprezentują wysoki poziom wiedzy o profilaktyce i leczeniu raka piersi, wiedza ta wymaga jednak usystematyzowania. Część kobiet się nie bada, ponieważ uważa, że nie znajduje się w grupie ryzyka oraz że na raka chorują tylko kobiety obciążone genetycznie, część słyszała, że mammografia i USG mogą wywołać raka. Kobiety nie zgłaszają się na badania ze strachu – boją się diagnozy „rak”. W społeczeństwie wciąż panują stereotypy typu „lepiej nie wywoływać wilka z lasu, lepiej nie wiedzieć...”. Kobiety mówią, że będą się badać, jeśli przekonamy je, że rak wcześniej wykryty jest naprawdę wyleczalny, chcą także potwierdzenia, że w razie wykrycia raka nie zostaną same – zapewniona zostanie dalsza diagnostyka i leczenie. Polki oczekują także dobrej organizacji badań (terminu badania wyznaczonego na konkretny dzień godzinę), miłej i fachowej obsługi, zapewnienia o sprawności sprzętu i kwalifikacjach kadry.

Wnioski: Problemem Polski jest ciągle zbyt niski odsetek raków wykrytych w stadium *in situ* i we wczesnych stadiach zaawansowania raka inwazyjnego. Konsekwencją tej sytuacji jest fakt, iż odsetek przeżyć 5-letnich jest najniższy w Europie. Aby zmienić niekorzystną pozycję Polski na tle innych krajów UE, konieczne jest kontynuowanie rozpoczętych w 2006 r. wielokierunkowych działań obejmujących edukację społeczeństwa, aktywny skrining (system zaproszeń imiennych, podnoszenie jakości badań poprzez szkolenie personelu i regularne kontrole sprzętu i mammogramów, utrzymanie wysokiej dostępności do badań poprzez brak limitowania badań w skriningu), dobrej organizacji, a biorąc pod uwagę realia społeczeństwa – dotarcie badań do chętnych, a nie na odwrót, tj. większej liczby badań wykonywanych przez mammobusy). Bardzo ważna jest zmiana stereotypów i postaw funkcjonujących w społeczeństwie, pomóc w tym mogą pozytywne statystyki połączone w kampanię oświatową, która usystematyzuje wiedzę o raku piersi. Nie do przecenienia jest tu rola lekarza POZ – pomimo braku zaufania do służby zdrowia Polacy zachowali zaufanie do lekarza rodzinnego. Ankietowane kobiety mówiły o tym, że chciałyby, aby lekarze rodzinni pilnowali terminu ich badań profilaktycznych, podpisali zaproszenia do badań. Poprzez dostęp do SIMP każdy lekarz może sprawdzić, czy pacjentka kwalifikuje się do badania profilaktycznego oraz kiedy i z jakim wynikiem takie badanie wykonała. Bardzo ważnym elementem kampanii staje się przekonanie Polaków, że rak wcześniej wykryty jest naprawdę wyleczalny (jak podaje prof. Zbigniew Wronkowski, wykrycie raka tylko o jedno stadium wcześniej zwiększa szanse wyleczenia średnio o 25%).

Session 14

Paraneoplastic syndromes and polyneuropathies induced by the anticancer therapy

Zespoły paranowotworowe i polineuropatie indukowane terapią przeciwnowotworową

[77]

Neurological paraneoplastic syndromes

Neurologiczne zespoły paranowotworowe

Renata Zaucha

Poznań

[78]

Polyneuropathies in hematological malignancies

Polineuropatie w chorobach rozrostowych układu krwiotwórczego

Adam Niezgoda

Poznań

[79]

Peripheral neuropathies induced by the anticancer treatment

Obwodowe neuropatie indukowane leczeniem onkologicznym

Dariusz Iżycki

Pracownia Immunologii Nowotworów, Wielkopolskie Centrum Onkologii w Poznaniu

Chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN) is one of the most relevant neurologic complication experienced by patients receiving chemotherapy. The neuropathy often interferes with daily activities and exercise leading to severe impairment of the patient's quality of life (QoL). The evolution of most CIPNs is characterized by a gradual onset of symptoms beginning in the lower limbs and advancing proximally in a bilateral stocking and glove distribution. Patients often complain of numbness, tingling and pain in the affected areas. The symptoms worsen with repeated cycles of chemotherapy. In cases of pronounced symptoms, chemotherapy dose reductions or complete discontinuation of treatment are common responses by physicians. The consequences of delay or discontinuation of treatment may affect overall patient survival. Although there are currently no approved safe and effective protective treatments for

CIPN, substantial laboratory and clinical research efforts are being directed toward treatment, prevention, assessment, and diagnosis of the problem. As new chemotherapeutic agents are approved and incorporated into treatment regimens, the care of cancer patients becomes progressively more and more complex. The goal of research is to establish the most suitable strategies to mitigate symptom severity and damage to the peripheral nervous system. The purpose of this lecture is to review current knowledge and understanding of CIPN, including an overview of pathogenesis, diagnostic and grading techniques, management and prevention strategies.

Obwodowa neuropatia (ON) spowodowana chemioterapią jest jednym z najczęstszych powikłań u chorych na nowotwory otrzymujących leczenie cytotoksyczne. Skutkiem wystąpienia i nasilenia neuropatii jest ograniczenie nie tylko aktywności i sprawności fizycznej pacjenta, ale również dramatyczne obniżenie jakości życia. Chorzy dotknięci ON często skarżą się na uczucie drętwienia, mrowienia oraz bólu w kończynach górnych (dłonie) oraz dolnych (stopy). Nasilenie i pogłębienie się objawów neuropatii powoduje wydłużenie interwałów pomiędzy planowanym podaniem cytostatyku lub prowadzi do zmniejszenia jego dawki. Ostatecznie doprowadza to do obniżenia wartości współczynnika intensywności dawki lub przedwczesnego zakończenia leczenia. Pomimo licznych badań przedklinicznych oraz klinicznych nie udało się dotychczas zarejestrować żadnego skutecznego środka farmakologicznego zapobiegającego lub leczącego ON. Celem wykładu jest przedstawienie podstawowych informacji dotyczących patogenety i diagnostyki neuropatii oraz przegląd najnowszych strategii prewencyjnych i terapeutycznych.
