



**Narodowy
Instytut
Onkologii**

im. Marii Skłodowskiej-Curie
Państwowy Instytut Badawczy
Oddział w Gliwicach

BIULETYN NAUKOWY

Narodowy Instytut Onkologii
im. Marii Skłodowskiej-Curie
Państwowy Instytut Badawczy

Gliwice, 2021 rok

SPIS TREŚCI

Numer strony

Analiza z wykorzystaniem narzędzi genomiki funkcjonalnej działania szlaków sygnałowych zależnych od HSF1, HIF1, NF- κ B i p53 w komórkach poddanych stresowi indukowanemu przez czynniki stosowane w terapii przeciwnowotworowej oraz przez czynniki związane z mikrośrodowiskiem nowotworowym (Zadanie 2.1.); <i>M. Rusin, D. Butkiewicz, M. Chorąży, A. Gdowicz-Kłosok, B. Łasut-Szyska, A. Gogler-Piğłowska, P. Janus, K. Kłyszcz, Z. Krawczyk, M. Krześniak, I. Matuszczyk, K. Mrowiec, M. Olbryt, D. Sojka, K. Szoltysek, D. Ściegłńska, A. Toma-Jonik, N. Vydra, W. Widlak, G. Zajęc, P. Widlak, M. Adamiec</i>	11
Zbadanie funkcji genów/białek wchodzących w skład negatywnej sygnatury prognostycznej w komórkach raka jajnika (Zadanie 2.2.); <i>K. Lisowska, A. Cortez, K. Kujawa, M. Tudrej, J. Syrkis, K. Kłyszcz</i>	13
Ocena przydatności modelowego układu terapeutycznego: zrekombinowany wirus myksomatozy i mezenchymalne komórki macierzyste w niszczeniu guzów nowotworowych. (Zadanie 2.3.); <i>J. Jazowiecka-Rakus, A. Sochanik, A. Hadryś, M. Paździor, E. Małusecka, W. Fidyk (KTSiO)</i>	14
Charakterystyka składu molekularnego oraz funkcji egzosomów w przekazywaniu sygnałów generowanych przez komórki nowotworowe. (Zadanie 2.4.); <i>M. Pietrowska, A. Abramowicz, K. Jelonek, M. Smolarz, G. Zajęc, P. Widlak, L. Ponge, M. Gawin</i>	15
Ekspresja CD 133 i ALDH-1 oraz neowaskulogeneza jako czynniki rokownicze w rakach piersi. (Zadanie 2.5.1.); <i>A. Stanek-Widera, M. Biskup-Frużyńska, K. Widera, K. Cedor, K. Czyż, M. Wesołowski, J. Młynarczyk-Liszka, M. Środa</i>	16
Ocena ekspresji markerów nowotworowych komórek macierzystych: CD44, ALDH1 i CD98 jako czynników prognostycznych i predykcyjnych w rakach płaskonabłonkowych gardła środkowego w zależności od statusu HPV. (Zadanie 2.5.2.); <i>M. Biskup-Frużyńska, A. Stanek-Widera, M. Śnietura, B. Nikiel, A. Kopeć, T. Rutkowski, D. Lange</i>	17
Molekularne składniki egzosomów obecnych w moczu chorych na raka stercza - próba znalezienia nowych biomarkerów choroby nowotworowej. (Zadanie 2.6.); <i>S. Blamek, A. Abramowicz, M. Smolarz, E. Telka, L. Miszczyk, W. Majewski, J. Wydmański, B. Jochymek, P. Widlak</i>	18
Detekcja komórek o fenotypie macierzystym w stabilnych liniach komórkowych raka jajnika. (Zadanie 2.7.); <i>P. Tudrej, M. Głowala-Kosińska, D. Sojka, K. Lisowska</i>	19
Analiza ekspresji receptorów CD40/CD154 w raku płaskonabłonkowym regionu głowy i szyi. (Zadanie 3.1.1.); <i>S. Pakuło, M. Śnietura, T. Rutkowski, B. Nikiel, A. Kopeć, A. Stanek-Widera, M. Wesołowski, K. Składowski</i>	20
Ocena „immunoscoringu” w rakach piersi jako czynnik o znaczeniu prognostycznym z zastosowaniem mikromacierzy tkankowych. (Zadanie 3.1.2.); <i>A. Stanek-Widera, M. Biskup-Frużyńska, M. Śnietura, M. Turska d'Amico, K. Widera, M. Śmieszek, J. Simek, A. Kopeć, R. Lamch, D. Lange</i>	21
Ocena wartości prognostycznej nacieków limfocytów T cytotoksycznych (CD3) i limfocytów T pamięci (CD8) w mikrośrodowisku guza z wykorzystaniem metody IMMUNOSCORE w grupie pacjentów leczonych chirurgicznie z powodu raka jelita grubego. (Zadanie 3.1.3.); <i>S. Pakuło, E. Stobiecka, B. Nikiel, W. Bal, M. Jaworska, D. Ponikiewska, B. Szcześniak-Kłusek, K. Czyż</i>	22

Ocena statusu TILs metodą półilościową i automatyczną LISI oraz ekspresji PD-L1 w materiale przedoperacyjnym i pooperacyjnym w potrójnie ujemnych rakach piersi oraz korelacja z odpowiedzią na leczenie przedoperacyjne według skali Residual Cancer Burden (RCB). (Zadanie 3.1.4.); E. Chmielik, D. Ławniczak-Cielińska, P.J. Paul, J. Simek, K. Czyż, B. Nikiel, J. Liszka, D. Lange	22
Ocena aktywności immunologicznej w HPV-dodatnim i HPV-ujemnym raku płaskonabłonkowym regionu głowy i szyi za pomocą osoczowych cytokin oraz immunologicznych punktów kontroli. (Zadanie 3.2.); R. Deja, A. Chmura, A. Kowalska, T. Rutkowski, A. Wygoda, P. Polanowski, M. Kentnowski, A. Brewczyński, A. Mazurek, K. Dulik, T. Czerw, K. Składowski.....	24
Naturalna komórka limfoidalna (ILC) - nowy uczestnik odpowiedzi immunologicznej w przebiegu chorób limfoproliferacyjnych. (Zadanie 3.3.); A. Chwieduk, M. Głowala-Kosińska, A. Ciomber, I. Mitrus, A. Smagur, W. Fidyk, P. Borzdziłowska, J. Korfanty, M. Wilkiewicz, M. Twardosz., R. Swoboda, A. Kwiatkowska-Pamuła, K. Dulik, J. Najda, M. Krawczyk-Kuliś, A. Cortez, A. Krzywoń, M. Krzempek, A. Wilk, Z. Kołosa.....	25
Analiza subpopulacji limfocytów oraz profilu cytokinowego materiału przeszczepowego pochodzącego od zdrowych dawców szpiku kostnego. (Zadanie 3.4.); W. Fidyk, A. Smagur, I. Mitrus, A. Chwieduk, M. Głowala-Kosińska, P. Borzdziłowska, J. Korfanty, M. Wilkiewicz, M. Krawczyk-Kulik.....	27
Składniki proteomu, metabolomu i genomu tkanek i płynów fizjologicznych jako źródło czynników umożliwiających klasyfikację i prognozowanie nowotworów. (Zadanie 4.1.); P. Widlak, M. Pietrowska, K. Jelonek, M. Gawin, A. Kurczyk, A. Abramowicz, M. Smolarz, L. Ponge, A. Mazurek, E. Malusecka, B. Masarczyk, U. Bojko, A. Krzywoń, K. Składowski, T. Rutkowski, R. Suwiński, M. Gigłok, M. Chekan, D. Lange, E. Chmielik.....	28
Opracowanie polskiego klasyfikatora molekularnego złośliwości guzów tarczycy. (Zadanie 4.2.1.); J. Krajewska, M. Oczko-Wojciechowska, M. Halczok, M. Cieślicka, D. Rusinek, T. Tyszkiewicz, J. Żebracka-Gala, A. Pfeifer, A. Kotecka-Blicharz, A. Kukulska, D. Handkiewicz-Junak, Z. Wygoda, A. Król, M. Kalemba, T. Gawlik, T. Olczyk, E. Paliczka-Cieślik, A. Kropińska, A. Ledwon, S. Szpak-Ulczoek, B. Michalik, D. Lange, E. Chmielik, E. Zembala-Nożyńska, A. Stanek-Widera, A. Pawlaczek, R. Cyplińska, A. Czarniecka, A. Sacher, K. Hasse-Lazar, K. Steinhof-Radwańska, J. Szcasy, M. Zeman, D. Kula, M. Kowalska, A. Chorąży, M. Dedecjus, E. Bakula-Zalewska, E. Kulik, E. Lewandowska-Jabłońska, A. Loba, B. Jarzqb	30
Wykorzystanie genomycznego i proteomicznego profilowania nowotworów tarczycy za pomocą badań wielkoskalowych (sekwencjonowanie genomowe, proteomika guza) dla oceny różnic między podtypami histologicznymi oraz ich kliniczną agresywnością. (Zadanie 4.2.2.); B. Jarzqb J. Krajewska, D. Lange, A. Kukulska, D. Handkiewicz-Junak, A. Kotecka-Blicharz, T. Gawlik, E. Paliczka-Cieślik, A. Syska-Bielak, J. Szcasy, E. Chmielik, E. Zembala-Nożyńska, A. Pawlaczek, R. Cyplińska, M. Halczok, J. Żebracka-Gala, D. Rusinek, D. Kula, T. Tyszkiewicz, M. Oczko-Wojciechowska, T. Olczyk, A. Kropińska, A. Ledwon, A. Sacher, S. Szpak-Ulczoek, A. Pfeifer, M. Cieślicka, A. Kluczevska-Gałka, M. Kalinowska-Herok, M. Chekan, K. Samborski, K. Sętowska, A. Blewska, A. Czarniecka	35
Analiza poziomu metylacji DNA komórek raka rdzeniastego tarczycy w kontekście mutacji inicjujących i czynników klinicznych. (Zadanie 4.2.3.); M. Oczko-Wojciechowska, J. Krajewska, J. Żebracka-Gala, M. Cieślicka, A. Czarniecka, E. Chmielik, A. Pawlaczek, R. Cyplińska, A. Pfeifer, D. Rusinek, D. Kula, M. Kowalska, E. Zembala-Nożyńska, T. Gawlik, T. Tyszkiewicz, M. Halczok, A. Kotecka-Blicharz	37

Ocena występowania genów fuzyjnych w komórkach guza raka rdzeniastego tarczycy. (Zadanie 4.2.4.); <i>M. Oczko-Wojciechowska, M. Kowalska, J. Żebracka-Gala, J. Krajewska, M. Cieślicka, A. Czarniecka, E. Chmielik, A. Pawlaczek, R. Cyplińska, A. Pfeifer, D. Rusinek, D. Kula, E. Zembala-Nożyńska, T. Gawlik, T. Tyszkiewicz, A. Zajkowiec, A. Kotecka-Blicharz</i>	37
Występowanie mutacji chorobotwórczych w genach SDHC, SDHA, SDHAF2, TMEM 127, MAX, FH, KIF1B, MDH2, MERTK, MET u pacjentów z guzami chromochłonnymi i przyzwojakami, u których nie wykryto mutacji w zakresie genów vHL, RET, SDHB, SDHD. (Zadanie 4.3.1.); <i>K. Hasse-Lazar, A. Kotecka-Blicharz, M. Oczko-Wojciechowska, A. Pfeifer, A. Pawlaczek, T. Gawlik, S. Szpak-Ulczok, J. Krajewska, D. Rusinek, B. Jarząb</i>	38
Jakość resekcji przy użyciu techniki ROLL w zależności od cech ultrasonograficznych zmiany. (Zadanie 4.3.2.); <i>M. Kalemba, Z. Wygoda, G. Woźniak, E. Stobiecka, A. Czarniecka</i>	39
Raki endokrynne - analiza podłoża genetycznego i fenotypu nowotworów złośliwych gruczołów dokrewnych. Próba standaryzacji postępowania diagnostycznego i terapeutycznego. (Zadanie 4.3.3.); <i>B. Jurecka-Lubieniecka, P. Soczomski, K. Stępiński, A. Ledwon, A. Król, E. Paliczka-Cieślik, A. Kotecka-Blicharz, K. Hasse-Lazar, E. Zembala-Nożyńska, E. Chmielik, P. Majka, B. Michalik, M. Oczko-Wojciechowska</i>	40
Analiza radiomiczna nowotworów głowy i szyi na podstawie obrazów PET-TK. (Zadanie 4.4.1.); <i>I. Gorczewska, D. Borys, P. Bzowski, K. Składowski, T. Rutkowski, O. Chrabański, A. Florczak, M. Turska-d'Amico, M. Di Pietro, B. Bobek-Billewicz, A. Wygoda, K. Dębiec, D. Książniak-Baran, U. Dworzecka, D. Leś</i>	41
Hyalinizing Trabecular Tumor. Guz bełczkowy szkliwiejący. Ustalenie profilu molekularnego. (Zadanie 4.5.1.); <i>A. Stanek-Widera, M. Biskup-Frużyńska, E. Zembala-Nożyńska, M. Chekan, D. Lange</i>	42
Diagnostyczne i prognostyczne znaczenie oceny wznowy raka prostaty po radioterapii w świetle nowej klasyfikacji WHO z 2016 r. (Zadanie 4.6.1.); <i>A. Stanek-Widera, W. Majewski, T. Krzysztofiak, B. Itrych, M. Biskup-Frużyńska, M. Środa, M. Oczko-Wojciechowska, M. Jarząb, D. Lange</i>	42
Korelacja patologiczno-radiologiczna złośliwych nowotworów tkanek miękkich regionu głowy i szyi z uwzględnieniem technik immunohistochemicznych i molekularnych. (Zadanie 4.7.1.); <i>E. Chmielik, P.J. Paul, J. Simek, B. Nikiel, R. Lamch, B. Hejduk, A. d' Amico, B. Bobek-Billewicz, C. Szymczyk, A. Maciejewski, M. Kentnowski, T. Rutkowski, B. Pilecki, K. Składowski</i>	43
Obrazowanie sodowe rezonansu magnetycznego (23Na MRI) w obszarze mózgowia u zdrowych ochotników. (Zadanie 4.8.1.); <i>B. Bobek-Billewicz, A. Hebda, P. Wawrzyniak, P. Mazga, M. Holecki, J. Duława, A. Lasek-Bal, P. Radecka</i>	44
Obrazowanie sodowe rezonansu magnetycznego (23Na MRI) w obszarze mózgowia u chorych z SM. (Zadanie 4.8.2.); <i>B. Bobek-Billewicz, A. Hebda, P. Wawrzyniak, P. Mazgaj, M. Holecki, J. Duława, A. Lasek-Bal, P. Radecka</i>	44
Analiza lokalizacji przerzutów raka piersi w obrębie OUN pod kątem jej związku z biologicznym podtypem raka, czasem do rozsiewu, rokowaniem i wynikami leczenia. (Zadanie 4.9.1.); <i>K. Widera, E. Nowicka, M. Jarząb, D. Gabryś, Ł. Zarudzki, G. Stasik-Pres, B. Bobek-Billewicz, R. Tarnawski, D. Larysz</i>	45

Opracowanie i wdrożenie klasyfikatora molekularnego podtypu raka piersi do wykorzystania w ocenie fenotypu nowotworu przed chemioterapią neoadjuwantową. (Zadanie 4.10.1) ; A. Polakiewicz-Gilowska, M. Jarząb, M. Kowalska, T. Tyszkiewicz, E. Chmielik, E. Stobiecka, M. Cieślicka, J. Rembak-Szynkiewicz, A. Dyla, A. Czarniecka, M. Kaźmierczak-Maciejewska, M. Dobrut, M. Halczok, J. Żebracka-Gala, A. Pawlaczek, R. Cyplińska, A. Pfeifer, M. Oczko-Wojciechowska, A. Kuś, B. Łanoszka.....	46
Optymalizacja wykorzystania badania MRI piersi w skryningu chorych najwyższego ryzyka. (Zadanie 4.10.2) ; A. Badora-Rybicka, B. Grandys, K. Donocik, A. Syska-Bielak, K. Chomik, P. Malec, B. Bobek-Billewicz.....	46
Ocena zaawansowania raka piersi w obrębie regionalnych węzłów chłonnych – znaczenie wykorzystania badań obrazowych. (Zadanie 4.10.3) ; M. Kubezko, D. Gabryś, M. Jarząb, A. d'Amico, M. di Pietro, O. Chrabański, D. Borys, R. Ulczok, M. Kalemba, M. Raus.....	47
Skąpoprzerezutowa (oligometastatyczna) postać raka piersi – występowanie u chorych diagnozowanych z wykorzystaniem badania PET/TK i próbna ocena rokowania w perspektywie średnioterminowej. (Zadanie 4.10.4) ; A. Polakiewicz-Gilowska, A. Leśniak, K. Świdarska, B. Łanoszka, W. Bal, E. Nowicka, G. Woźniak	47
Zastosowanie techniki HR MAS NMR do charakterystyki profili metabolicznych guzów tarczycy, piersi, endometrium, jajnika oraz komórek serca. (Zadanie 4.11) ; M. Sokół, A. Skorupa, Ł. Boguszewicz, M. Ciszek, M. Gramatyka, M. Kijonka	52
Identyfikacja mutacji patogennych predysponujących do zachorowania na raka piersi u kobiet do 39 roku życia. Badanie uzupełniające diagnostykę genetyczną raka piersi. (Zadanie 4.12) ; J. Pamuła-Pilat, K. Tęcza, A. Zajkiewicz, M. Kalinowska-Herok, M. Mazur, M. Lisik, J. Huszno.....	58
Wpływ czynników genetycznych, w tym wariantów polimorficznych genów naprawy DNA i transporterów z rodziny ABC, na toksyczność i skuteczność chemioterapii. (Zadanie 5.1) ; E. Grzybowska, M. Olbryt, D. Butkiewicz, we współpracy z I KRTChT, II KRTChT, OCHD i Poradnią Genetyki Onkologicznej.....	59
Wpływ komórek mikrośrodowiska nowotworowego na skuteczność terapii przeciwnowotworowej. (Zadanie 5.2) ; T. Cichoń, R. Smolarczyk, M. Jarosz-Biej, E. Pilny, A. Drzyzga, J. Czapla, S. Matuszczak, A. Szymańska-Żytecka, A. Zielińska, we współpracy z Zakładem Brahyterapii (Wojcieszek P, Urbaś Z.).....	60
Wpływ niskich dawek frakcyjnych promieniowania jonizującego na cytotoksyczny efekt karboplatyny i paklitakselu w komórkach raka narządów głowy i szyi. (Zadanie 5.3) ; D. Słonina, B. Biesaga, T. Rutkowski.....	63
Prospektywna ocena związku klinicznego przebiegu choroby z podłożem genetycznym oraz ocena skuteczności różnych sposobów leczenia dla weryfikacji standardów postępowania diagnostycznego i terapeutycznego u chorych z rozpoznaniem raka przytarczyc. (Zadanie 5.4) ; B. Jurecka-Lubieniecka, B. Michalik, A. Kotecka-Blicharz, T. Gawlik, E. Zembala-Nożyńska, M. Szcasy, J. Siewińska.....	64
Mutacje somatyczne w szlakach związanych z nowotworzeniem sporadycznych guzów neuroendokrynnych trzustki (pNEN) i implikacje dla terapii tych nowotworów. (Zadanie 5.5) ; B. Jurecka-Lubieniecka, P. Soczomski, A. Kotecka-Blicharz, D. Lange, J. Żebracka-Gala, K. Sieroń.....	66
Radiomics w radiochemioterapii NSCLC w stopniu zaawansowania III A/III B. (Zadanie 5.6) ; M. Miszczyk, I. Jabłońska, Ł. Magrowski, O. Masri, K. Raślawski, E. Nowicka, R. Tarawski.....	68

Ocena predykcyjnego i prognostycznego znaczenia cytokin proangiogennych, wykładników nasilenia stanu zapalnego, markerów uszkodzenia narządowego oraz parametrów hematologicznych u chorych na raka regionu głowy i szyi, niedrobnokomórkowego raka płuca oraz nowotwory układu krwiotwórczego. (Zadanie 5.7.); A. Chmura, R. Deja, M. Czech, M. Lantos, A. Kowalska, Ł. Boguszewicz, T. Rutkowski, A. Wygoda, P. Polanowski, C. Szymczyk, J. Wierzgoń, Ł. Krakowczyk, A. Idasiak, B. Smolska-Ciszewska, M. Gigłok, K. Dulik, T. Czerw, M. Sobczyk-Kruszelnicka, I. Mitrus, M. Sokół, A. Maciejewski, R. Suwiński, S. Giebel, K. Składowski	88
Opracowanie wieloparametrycznych protokołów akwizycji obrazów MRI w polu 9.4 T do oceny efektów terapeutycznych u myszy. (Zadanie 5.8.); M. Sokół, A. Skorupa, Ł. Boguszewicz, M. Cizek, B. Bobek-Billewicz, A. Orlef	72
Weryfikacja przydatności metody bezznacznikowej izolacji nowotworowych komórek krążących z wykorzystaniem układów mikroprzepływowych do detekcji i ilościowej oceny HPV – pozytywnych komórek raka płaskonabłonkowego. (Zadanie 5.9.); M. Śnietura, W. Piękowski, A. Kopeć, K. Gajda, A. Czuba, S. Student	73
Ocena wyników leczenia uzupełniającego jodem promieniotwórczym chorych na zróżnicowanego raka tarczycy pośredniego ryzyka nawrotu choroby nowotworowej-prospektywne badanie obserwacyjne. (Zadanie 6.1.1.); D. Handkiewicz-Junak, A. Kluczevska-Gałka, D. Rusinek, J. Roskosz, A. Ledwon, E. Paliczka-Cieślak, A. Kropińska, Z. Puch, T. Olczyk, D. Sygula	76
Dozymetryczna ocena leczenia radiojodem raka tarczycy - standaryzacja metody stałego monitorowania dawki. (Zadanie 6.1.2.); A. Kluczevska-Gałka, D. Handkiewicz-Junak, L. Wojciuch, A. Majewska-Ciba, A. Kleczko, N. Kosiak, T. Gawlik, J. Krajewska, A. Król	77
Leczenie analogami somatostatyny po leczeniu izotopowym nowotworów neuroendokrynnych – ocena efektów leczenia i poszukiwanie czynników prognostycznych. (Zadanie 6.1.3.); A. Sygula, D. Handkiewicz-Junak, B. Jurecka-Lubieniecka, A. Kluczevska-Gałka, K. Hasse-Lazar, A. Ledwon, E. Paliczka-Cieślak, T. Olczyk, B. Michalik, K. Drosik-Rutowicz, B. Jarzqb	79
Znaczenie kliniczne czasu między operacją a radiochemioterapią adjuwantową w leczeniu glejaka wielopostaciowego. (Zadanie 6.2.1.); M. Miszczyk, I. Jabłońska, Ł. Magrowski, O. Masri, K. Rasławski, E. Nowicka, R. Tarnawski	81
Staging wolumentaryczny i RDW jako czynniki prognostyczne w nowotworach jamy ustnej i środkowego piętra gardła. (Zadanie 6.2.2.); M. Miszczyk, I. Jabłońska, Ł. Magrowski, O. Masri, K. Rasławski, E. Nowicka, R. Tarnawski.....	81
Przewidywanie odpowiedzi na chemioterapię na podstawie badania PET/TK pod kątem możliwości de-eskalacji leczenia raka piersi. (Zadanie 6.3.); A. Leśniak, M. Jarzqb	81
Ocena wczesnych i odległych parametrów wskazujących na ryzyko kardiotoksyczności chemioterapii przedoperacyjnej w kontekście gęstości dawki i sekwencji leczenia raka piersi. (Zadanie 6.4.); K. Świdarska, A. Badora-Rybicka, M. Jarzqb	81
Wolumetryczna i teksturalna ocena regresji guza pierwotnego u chorych na raka piersi w trakcie chemioterapii przedoperacyjnej – ocena na podstawie badań MRI i PET/TK. (Zadanie 6.5.); M. Stankiewicz, M. Jarzqb, M. Kaszuba, M. Mianowska-Malec, P. Malec, K. Krysiak, B. Lange, E. Nowicka, K. Widera, K. Trela-Janus, R. Szumniak, B. Bobek-Billewicz	81

Rak brodawkowaty tarczycy i nowotwory o niepewnym potencjale złośliwości – optymalizacja postępowania terapeutycznego w kontekście badań molekularnych. (Zadanie 6.6.1.); A. Czarniecka, J. Krajewska, M. Jarzqb, D. Rusinek, M. Oczko-Wojciechowska, E. Stobiecka, E. Chmielik, E. Zembala-Nożyńska, A. Sacher, G. Woźniak, B. Jarzqb	82
Rodzinny rak rdzeniasty tarczycy - wyniki leczenia operacyjnego u nosicieli mutacji protoonkogenu RET w zależności od typu mutacji, stadium zaawansowania klinicznego choroby, czasu rozpoczęcia leczenia i jego zakresu. (Zadanie 6.6.2.); A. Czarniecka, M. Oczko-Wojciechowska, A. Hajduk, J. Krajewska, E. Stobiecka, M. Jarzqb, G. Woźniak, A. Sacher, B. Jarzqb	84
Ocena przydatności śródoperacyjnego wykorzystania światła laserowego bliskiej podczerwieni oraz zieleni indocyjaninowej u chorych na raka tarczycy dla redukcji ryzyka pooperacyjnej niedoczynności przytarczyc. (Zadanie 6.6.3.); A. Czarniecka, G. Woźniak, A. Sacher, Ż. Kaniszewska-Dorsz, A. Kotecka-Blicharz, E. Chmielik, E. Stobiecka	86
Ocena czynników prognostycznych u chorych na raka jelita grubego w IV stopniu klinicznego zaawansowania choroby leczonych chirurgicznie. Badanie prospektywne. (Zadanie 6.7.1.); M. Zeman, M. Czarnecki, W. Skatba, A. Chmielarz, M. Strączyński, S. Pakuło, M. Chekan, M. Biskup-Frużyńska, A. Stanek-Widera, J. Rembak-Szynkiewicz, M. Gola, W. Bal, D. Lange, A. Maciejewski	88
Ocena morfometrycznej charakterystyki sieci naczyń limfatycznych raka regionu głowy i szyi i regionalnych węzłów chłonnych oraz stopnia korelacji z profilem molekularnym marginesów jako czynników predykcyjnych dla pooperacyjnej radioterapii. (Zadanie 6.7.2.); Ł. Krakowczyk, A. Stanek-Widera, D. Lange, A. Maciejewski, M. Stankiewicz, C. Szymczyk, B. Maciejewski	89
Obecność i znaczenie ferroptotycznego mechanizmu śmierci komórek w reperfuzji płatów wolnych po zabiegach rekonstrukcyjnych. (Zadanie 6.8.); A. Maciejewski, Ł. Krakowczyk, M. Grajek, D. Bula, D. Gendosz de Carillo, D. Walczak	91
Analiza czynników prognostycznych i predykcyjnych w planowaniu i ocena wyników leczenia chorych na DLBCL. (Zadanie 6.9.1.); A. Chwieduk, M. Głowała-Kosińska, A. Ciomber, I. Mitrus, A. Smagur, W. Fidyk, P. Borzdziłowska, J. Korfanty, M. Wilkiewicz, M. Twardosz, R. Swoboda, A. Kwiatkowska-Pamuła, K. Dulik, J. Najda, M. Krawczyk-Kuliś, A. Cortez, A. Krzywoń, M. Krzemppek, A. Wilk, Z. Kołosa	92
Ocena skuteczności i profilu bezpieczeństwa schematu BGD (bendamustyna, gemcytabina, deksametazon) w leczeniu chorych z opornymi i nawrotowymi postaciami chłoniaków z obwodowych limfocytów T. (Zadanie 6.9.2.); T. Czerw, R. Swoboda, J. Najda, K. Dulik, M. Twardosz, A. Kwiatkowska-Pamuła, A. Janikowska, K. Michalak, A. Janeczek, S. Giebel	93
Ocena tolerancji i skuteczności napromieniania całego ciała w dawkach mieloablacyjnych w skojarzeniu z fludarabiną przed allotransplantacją komórek krwiotwórczych u chorych na ostrą białaczkę szpikową. (Zadanie 6.10.1.); M. Sobczyk-Kruszelnicka, T. Czerw, W. Mendrek, M. Saduś-Wojciechowska, M. Ociepa, A. Frankiewicz, K. Michalak, J. Najda, M. Krawczyk-Kuliś, J. Hołowiecki, S. Giebel, M. Kraszkiewicz, B. Jochymek, Ł. Kleszyk, M. Radwan, Ł. Dolla	94
Porównawcza ocena kliniczno-dermoskopowa zmian skórnych w przebiegu ostrej i przewlekłej choroby przeszczep-przeciw-gospodarzowi (GVHD) u pacjentów po allogeniczej transplantacji krwiotwórczych komórek macierzystych (alloHSCT) w trakcie leczenia pozaustrojową fotoferezą (ECP). (Zadanie 6.10.2.); G. Kamińska-Winciorek, T. Czerw, M. Jaworska, A. Szlauer-Stefańska, S. Giebel	95

Retrospektywna ocena wyników allotransplantacji komórek macierzystych u chorych z nawrotową oraz oporną postacią chłoniaka Hodgkina. (Zadanie 6.10.3.); A. Frankiewicz, J. Hołowiecki, M. Krawczyk-Kuliś, M. Saduś-Wojciechowska, J. Najda, W. Mendrek, T. Czerw, M. Sobczyk-Kruszelnicka, M. Ociepa, K. Michalak, M. Dzierżak-Mietła, G. Kamińska-Winciorek, S. Giebel	95
Pod presją immunosupresji. Mechanizmy zaniku oraz regeneracji rzadkich subpopulacji limfocytów T w modelu alogenicznej transplantacji komórek krwiotwórczych przy pełnej oraz połowicznej zgodności w układzie HLA. (Zadanie 6.10.4.); M. Głowala-Kosińska, A. Chwieduk, W. Fidyk, A. Smagur, P. Borzdziłowska, J. Korfanty, I. Mitrus, A. Ciomber, M. Wilkiewicz, M. Sobczyk-Kruszelnicka, T. Czerw, W. Mendrek, J. Najda, M. Saduś-Wojciechowska, A. Frankiewicz, M. Ociepa, K. Michalak, M. Krawczyk-Kuliś, J. Hołowiecki, S. Giebel	97
Ocena tolerancji i skuteczności napromienienia całego ciała w dawkach mieloablacyjnych w skojarzeniu z kładrybiną przed allogeniczną transplantacją komórek krwiotwórczych u chorych na ostrą białaczkę szpikową. (Zadanie 6.10.5.); M. Sobczyk-Kruszelnicka, T. Czerw, W. Mendrek, M. Saduś-Wojciechowska, A. Frankiewicz, M. Ociepa-Wasilkowska, A. Szlauer-Stefańska, J. Najda, M. Dzierżak-Mietła, M. Krawczyk-Kuliś, J. Hołowiecki, S. Giebel	98
Ocena częstości występowania oraz podtypów klinicznych zmian skórnych w przebiegu przewlekłej choroby przeszczep-przeciw-gospodarzowi (GVHD) u pacjentów po allogenicznej transplantacji krwiotwórczych komórek macierzystych (alloHSCT) w zależności od rodzaju dawcy i leczenia przygotowującego do przeszczepienia. (Zadanie 6.10.6.); G. Kamińska-Winciorek, T. Czerw, M. Krawczyk-Kuliś, A. Szlauer-Stefańska, W. Mendrek, A. Frankiewicz, M. Ociepa, M. Saduś-Wojciechowska, K. Michalak, M. Sobczyk-Kruszelnicka, J. Najda, M. Pawelczak-Szostak, J. Hołowiecki, S. Giebel	99
Zastosowanie metabolomiki opartej na spektroskopii HR NMR do oceny toksyczności radiochemioterapii u chorych na raka regionu głowy i szyi. (Zadanie 6.11.); Ł. Boguszewicz, A. Skorupa, M. Ciszek, M. Sokół, M. Kijonka	100
Walidacja i wdrożenie sygnatur prognostyczno-predykcyjnych dla indywidualizacji i optymalizacji konformalnej radioterapii skojarzonej z chemioterapią u chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca w stopniu zaawansowania IIIAN2 i IIIB. (Zadanie 6.12.1.); R. Suwiński, K. Galwas-Kliber, M. Giglok, D. Butkiewicz, G. Plewicki, M. Kalinowska-Herok, M. Krześniak, I. Matuszczyk, A. Fiszer-Kierzkowska, A. Mazurek, A. Gdowicz-Kłosok, U. Bojko, E. Małusecka, I. Domińczyk, M. Rusin, A. Idasiak, B. Jochymek, D. Syguła, B. Klusek, R. Deja, J. Gliwińska, J. Mrochem-Kwarciak	102
Porównanie tolerancji i skuteczności miejscowej samodzielnej hiperfrakcjonowanej radioterapii przedoperacyjnej i hiperfrakcjonowanej radioterapii przedoperacyjnej w skojarzeniu z chemioterapią u chorych na raka odbytnicy wraz z oceną możliwości optymalizacji i indywidualizacji leczenia skojarzonego w oparciu o badania markerów biochemicznych. (Zadanie 6.12.2.); A. Idasiak, I. Dębosz-Suwińska, A. Chmielarz, E. Chmielik, E. Stobiecka, S. Pakuło, D. Butkiewicz, J. Pamuła-Piłat, K. Tęcza, J. Łanuszewska, R. Deja, M. Prokop, J. Wydmański, J. Mrochem-Kwarciak, R. Suwiński	103
Optymalizacja schematów frakcjonowania radioterapii chorych na raka gruczołu krokowego z wykorzystaniem metod obrazowania funkcjonalnego NMR i markerów biochemicznych. (Zadanie 6.12.3.); B. Smolska-Ciszewska, R. Deja, M. Giglok, G. Plewicki, K. Behrendt, K. Galwas-Kliber, A. Idasiak, E. Małusecka, M. Latos, J. Mrochem-Kwarciak, R. Suwiński.....	104

Wpływ rozkładu dawek biologicznych w podobszarach GTV guza pierwotnego i sumarycznego GTV regionalnych węzłów chłonnych (śródpierście) z dawką NTD < < D100 na szacowaną szansę miejscowego wyjałowienia (TCP) w radykalnej radioterapii niedrobnokomórkowego raka płuca. (Zadanie 6.12.4.); A. Maciejewski, I. Dębosz-Suwińska, R. Suwiński, A. Napieralska, D. Gabryś, A. Namysł-Kaletka, D. Bodusz, G. Woźniak, M. Kraszkiewicz, M. Miszczyk	105
EPID – jako element QA w realizacji radioterapii. (Zadanie 6.13.1.); J. Wendykier, A. Grządziel, D. Plaza, B. Bekman, Ł. Dolla, W. Osewski, K. Śłosarek	106
Ocena przydatności aplikatorów indywidualnych, w brachyterapii nowotworów skóry, zlokalizowanych w rejonie głowy i szyi, na podstawie wybranych parametrów dozymetrycznych i wolumetrycznych rozkładów dawek. (Zadanie 6.13.2.); M. Szlag, A. Cholewka, A. Preifer, M. Stąpór-Fudzińska, K. Śłosarek, S. Kellas-Ślęczka, P. Wojcieszek.....	107
Optymalizacja i indywidualizacja radioterapii stereotaktycznej guzów i zmian nienowotworowych ośrodkowego układu nerwowego, kręgosłupa i narządów mięszkowych. (Zadanie 6.14.1.); S. Blamek, M. Stankiewicz, D. Larysz, A. Roch-Zniszczoł, D. Gabryś, I. Dębosz-Suwińska, K. Ficek, A. Kruczek, D. Syguła, A. Łuczak, K., A. Napieralska, B. Bekman, M. Stąpór-Fudzińska, A. Grządziel, M. Miszczyk, T. Latusek, K. Śłosarek, L. Miszczyk.....	108
Zbadanie wpływu zastosowania nowoczesnych technik radioterapii na funkcjonowanie wszczepialnych urządzeń elektronicznych. (Zadanie 6.14.2.); S. Blamek, D. Gabryś, B. Niewiadomska, A. Bekman, Ł. Dolla, A. Kruczek, A. Woźnica, M. Stąpór-Fudzińska, D. Larysz, M. Sokół, A. Orlef, T. Latusek, K. Śłosarek	110
Radioablacja chorych na raka stercza. (Zadanie 6.14.3.); L. Miszczyk, A. Napieralska, A. Namysł-Kaletka, M. Kraszkiewicz, G. Woźniak, A. Tukiendorf, M. Stąpór-Fudzińska, G. Głowacki, M. Miszczyk, J. Huszno	111
Ocena precyzji i skuteczności Stereotaktycznej Hipofrakcjonowanej Radiochirurgii (SHRS) Cyber Knife pojedynczych i mnogich przerzutów do kręgosłupa raka o różnych lokalizacjach. (Zadanie 6.14.4.); K. Szczepanik, B. Maciejewski, S. Blamek, A. Łuczak	113
Ocena skuteczności i tolerancji radioterapii u chorych na raka żołądka. Ocena możliwości indywidualizacji leczenia w oparciu o markery molekularne i immunologiczne. (Zadanie 6.15.1.); J. Wydmański, M. Gajek, A. Namysł-Kaletka, R. Suwiński, S. Półtorak, D. Lange, A. Chmielarz, M. Strączyński, M. Samborska-Plewicka, W. Leszczyński, K. Krysiak, Ż. Kaniżewska-Dorsz, E. Zembala-Nożyńska, P. Polanowski, J. Nieckula, W. Bal, M. Kraszkiewicz, W. Majewski, A. Chwieduk, A. Gdowicz-Kłosok, A. Chmura, Ł. Kleszyk, A. Matzullo, K. Dębiec	114
Ocena skuteczności radykalnej radioterapii i radiochemioterapii w leczeniu miejscowo zaawansowanego, pierwotnie nieresekcyjnego raka odbytnicy. (Zadanie 6.15.2.); M. Kraszkiewicz, W. Majewski, J. Wydmański, A. Napieralska, R. Kulik, B. Maciejewski	116
Napromienianie połowy ciała u chorych z mnogimi przerzutami do kości z wykorzystaniem tomoterapii. Ocena wczesnych powikłań i efektu leczenia. Porównanie tomoterapii z metodą konwencjonalną. (Zadanie 6.16.1.); B. Jochymek, E. Telka, L. Miszczyk, S. Blamek	117
Podwyższenie biologicznej dawki promieniowania w objętości tarczowej za pomocą radiochirurgii (Radiosurgery BOOST, RSB) u chorych na raka głowy i szyi poddanych definitywnej radio(chemio)terapii. (Zadanie 6.17.); T. Rutkowski, A. Wygoda, B. Pilecki, U. Dworzeczka, D. Książniak-Baran, M. Kentnowski, A. Brewczyński, A. Bieleń, K. Dębiec, D. Leś, A. Zarudzka, K. Składowski, M. Stąpór-Fudzińska, A. Grządziel, Ł. Boguszewicz, D. Wąsik, A. Tatar	118

Ocena przydatności badania krążącego DNA wirusa Epstein-Barr (EBV) w populacji polskiej jako czynnika predykcyjnego i prognostycznego u chorych na raka gardła górnego poddanych skojarzonej chemio- i radioterapii. (Zadanie 6.18.); A. Wygoda, J. Mrochem-Kwarciak, A. Mazurek, K. Składowski, T. Rutkowski, P. Polanowski, A. Heyda, M. Kentnowski, B. Pilecki, U. Dworzecka, A. Bieleń, D. Leś, D. Książniak-Baran, K. Dębiec	118
Ocena wyników leczenia chorych poddanych pooperacyjnej radioterapii z powodu raka stercza. (Zadanie 6.19.); M. Miszczyk, W. Majewski, I. Jabłońska, Ł. Magrowski, O. Masri, K. Rasławski	119
Powtórna radioterapia z powodu wznowy glejaków mózgu z wykorzystaniem technik modulacji intensywności wiązki w aspekcie bezpieczeństwa, tolerancji wczesnej i późnej oraz skuteczności (grant wewnętrzny). (Zadanie 6.20.); E. Nowicka, M. Gawkowska, H. Grzbiela, M. Jarzqb, K. Drosik-Rutowicz, K. Widera, K. Krysiak, S. Jezierska, A. Grządziel, J. Wendykier, B. Bekman, K. Ślosarek, B. Bobek-Billewicz, G. Stasik-Pres, Ł. Zarudzki, R. Tarnawski.....	120
Badanie wpływu implantów metalowych na rodzaj i prawdopodobieństwo indukowanej śmierci komórkowej (grant wewnętrzny). (Zadanie 6.21.); K. Ślosarek, R. Smolarczyk, T. Cichoń, M. Jarosz-Biej, J. Rogoliński	123
Analiza parametrów gospodarki hormonalnej chorych leczonych z powodu raka piersi w kontekście stanu menopauzalnego. (Zadanie 7.1.); M. Mianowska-Malec, M. Kubeczko, A. Łuczak, A. Michalik, A. Pasierbek, J. Mrochem-Kwarciak	124
Rekonstrukcja tchawicy szczura z wykorzystaniem acellularnej allogenicznej tchawicy oraz mezenchymalnych komórek zrębu pochodzenia tłuszczowego – badania wstępne. (Zadanie 7.2.); D. Walczak, D. Bula, Ł. Krakowczyk, E. Migacz, S. Szala, T. Cichoń, R. Smolarczyk, M. Jarosz-Biej, E. Stobiecka	124

**Wyniki prac naukowych
wykonanych w ramach Planu Naukowego za 2020 rok
w Narodowym Instytucie Onkologii
im. Marii Skłodowskiej-Curie
Państwowym Instytucie Badawczym**

2.1. Analiza z wykorzystaniem narzędzi genomiki funkcjonalnej działania szlaków sygnałowych zależnych od HSF1, HIF1, NF- κ B i p53 w komórkach poddanych stresowi indukowanemu przez czynniki stosowane w terapii przeciwnowotworowej oraz przez czynniki związane z mikrośrodowiskiem nowotworowym.

Kierownik: M. Rusin

Wykonawcy: M. Rusin, D. Butkiewicz, M. Chorąży, A. Gdowicz-Kłosok, B. Łasut-Szyska, A. Gogler-Piğłowska, P. Janus, K. Klyszcz, Z. Krawczyk, M. Krześniak, I. Matuszczyk, K. Mrowiec, M. Olbryt, D. Sojka, K. Szoltysek, D. Ściegłńska, A. Toma-Jonik, N. Vydra, W. Widlak, G. Zajac, P. Widlak, M. Adamiec

1. Zależna od czynnika transkrypcyjnego HSF1 aktywacja genu *Pmaip1* jest głównym czynnikiem prowadzącym do indukowanej stresem proteotoksycznym eliminacji komórek (na drodze apoptozy).
2. Białko PHLDA1 (również up-regulowane po aktywacji HSF1) nie jest odpowiedzialne za indukcję apoptozy w komórkach termowrażliwych, natomiast może być odpowiedzialne za indukcję śmierci komórkowej wynikającej z utraty kontaktu komórki z podłożem (anoikis). Proces ten jest wtórny do efektów indukowanych przez PMAIP1.
3. Wzrost temperatury hamuje sygnalizację NF- κ B, ale poziom zahamowania i czas powrotu do normalnej sygnalizacji jest zależny do czynnika aktywującego i temperatury. Odpowiedź NF- κ B na prozapalną cytokinę IL1 β powraca do normalnego poziomu znacznie szybciej niż odpowiedź indukowana przez TNF α . Modelowanie matematyczne wykazało, że odpowiedzi te są zależne od HSF1 i IKK, kompleksu kinazy wielobiałkowej wymaganym do aktywacji NF- κ B. Nasze dane przewidują, że IKK działa jak czujnik temperatury.
4. Przeciwnowotworowe białko p53 aktywuje ekspresję genu interleukiny 7, która stymuluje dojrzewanie limfocytów T i B. Poprzez działanie stymulujące na gen *IL7*, p53 może sprzyjać niszczeniu komórek nowotworowych przez układ odpornościowy. Kinaza blokowana przez inhibitor CHIR-98014 prawdopodobnie modyfikuje p53 w sposób, który sprawia, że białko uzyskuje zdolność silnej stymulacji ekspresji genów *TMEM173*, *CASP1*, *CRYAB*, *H19*, *TREM2*, *TYROBP* (geny odporności wrodzonej). Równoczesne wyciszenie ekspresji genów *GSK3A* i *GSK3B*, kodujących enzymy blokowane przez ten inhibitor nie wpłynęło na aktywację p53, tak więc kinaza odpowiedzialna za ten sposób aktywacji p53 pozostaje niezidentyfikowana.
5. Białka HSPA/HSP70, w szczególności HSPA1 – główna indukowana stresem izoforma oraz HSPA2 – białko syntetyzowane konstytutywnie, są uznawane za ważny element cytoprotekcyjny. Białka te wykazują bardzo wysoką homologię sekwencji aminokwasowej, co utrudnia ich selektywną detekcję przy pomocy przeciwciał. Problem ten rodzi poważne konsekwencje dla aktualnego stanu wiedzy o tych białkach, gdyż wykorzystanie w badaniach nieswoistych przeciwciał rodzi wątpliwości co do wartości i wiarygodności wniosków wyciągniętych przez badaczy. Przeprowadziliśmy analizę swoistości przeciwciał sprzedawanych

jako dedykowane do detekcji białek HSPA1 i HSPA2. W analizie uwzględniliśmy przeciwciała stosowane do detekcji o potwierdzonej wcześniej swoistości, oraz inne komercyjne przeciwciała stosowane w pracach innych badaczy. Wykazaliśmy, że jedynie przeciwciała wykorzystane w naszych pracach pozwala na swoistą detekcję białka HSPA2. Wyniki te wskazują, że część dostępnej wiedzy na temat białka HSPA2 wymaga ponownej krytycznej oceny z użyciem wiarygodnych narzędzi badawczych (Scieglinska i wsp., 2020). W kolejnej pracy pokazaliśmy, że selektywne obniżenie poziomu białka HSPA2 zmienia fenotyp prawidłowych komórek nabłonka oskrzeli powodując obniżenie ich potencjału klonogennego i zdolności do adhezji do składników macierzy zewnątrzkomórkowej. Wykazaliśmy też, że zahamowanie produkcji białka HSPA2 nie zmienia właściwości rozmaitych linii komórkowych niedrobnokomórkowego raka płuca, w tym proliferacji, potencjału klonogennego, adhezji, migracji oraz wrażliwości na chemioterapeutyki. Wynik ten wskazuje, że specyficzne funkcje białka HSPA2 ujawniają się w komórkach nienowotworowych, natomiast w nowotworowych obserwowana jest funkcjonalna wymiennosci przedstawicieli rodziny HSPA2 (Sojka i wsp., 2020).

1. Janus P, Toma-Jonik A, Vydra N, Mrowiec K, Korfanty J, Chadalski M, Widłak P, Dudek K, Paszek A, Rusin M, Polańska J, Widłak W (2020) Pro-death signaling of cytoprotective heat shock factor 1: upregulation of NOXA leading to apoptosis in heat-sensitive cells. *Cell Death Differ.* 27(7):2280-2292. doi: 10.1038/s41418-020-0501-8. 5-year IF=9,597
2. Janus P, Mrowiec K, Vydra N, Widłak P, Toma-Jonik A, Korfanty J, Smolarczyk R, Widłak W (2019) PHLDA1 Does Not Contribute Directly to Heat Shock-Induced Apoptosis of Spermatoocytes. *Int J Mol Sci.* 21(1). pii: E267. doi: 10.3390/ijms21010267. 5-year IF=4,653
3. Paszek A, Kardynska M, Bagnall J, Śmieja J, Spiller DG, Widłak P, Kimmel M, Widlak W, Paszek P (2020) Heat shock response regulates stimulus-specificity and sensitivity of the pro-inflammatory NF- κ B signalling. *Cell Commun Signal*;18(1):77. doi: 10.1186/s12964-020-00583-0. 5-year IF=4,812
4. Krześniak M, Zajkowiec A, Gdowicz-Kłosok A, Głowala-Kosińska M, Łasut-Szyszk B, Rusin M. Synergistic activation of p53 by actinomycin D and nutlin-3a is associated with the upregulation of crucial regulators and effectors of innate immunity. *Cell Signal.* 2020 May;69:109552. doi: 10.1016/j.cellsig.2020.109552. 5-year IF=3,959
5. Sojka DR, Gogler-Pigłowska A, Klarzyńska K, Klimczak M, Zylisz A, Głowala-Kosińska M, Krawczyk Z, Scieglinska D. HSPA2 chaperone contributes to the maintenance of epithelial phenotype of human bronchial epithelial cells but has non-essential role in supporting malignant features of non-small cell lung carcinoma, MCF7, and HeLa cancer cells. *Cancers* 2020;12(10):E2749. doi: 10.3390/cancers12102749.
6. Ścieglinska D, Sojka DR, Gogler-Pigłowska A, Chumak V, Krawczyk Z. Various anti-HSPA2 antibodies yield different results in studies on cancer-related functions of Heat Shock Protein A2. *Int J Mol Sci.* 2020;21:E4296. doi: 10.3390/ijms21124296.
7. Szoltysek K, Ciardullo C, Zhou P, Walaszczyk A, Willmore E, Rand V, Marshall S, Hall A, J Harrison C, Eswaran J, Soundararajan M. DAP Kinase-Related Apoptosis-Inducing Protein Kinase 2 (DRAK2) Is a Key Regulator and Molecular Marker in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Int J Mol Sci.* 2020 Oct 16;21(20):7663. doi: 10.3390/ijms21207663.

2.2. Zbadanie funkcji genów/białek wchodzących w skład negatywnej sygnatury prognostycznej w komórkach raka jajnika.

Kierownik: K. Lisowska

Wykonawcy K. Lisowska, A. Cortez, K. Kujawa, M. Tudrej, J. Syrkis, K. Klyszcz

Celem projektu jest zbadanie funkcji wybranych genów, które wchodzą w skład zidentyfikowanej przez nas wcześniej negatywnej sygnatury prognostycznej w raku jajnika.

1. W bieżącym roku opublikowaliśmy wyniki badań dotyczące genów/białek FN1 (fibronektyna) i POSTN (periostyna). Zaproponowany przez nas algorytm oceny immunohistochemicznej obu białek (joint FN1&POSTN score) był niezależnym czynnikiem rokowniczym w raku surowiczym jajnika [2,6].

2. Realizowaliśmy też badania funkcjonalne dotyczące genu/białka ITGBL1: wykazaliśmy, że białko to wpływa na adhezyjność, zdolność migracji i inwazyjność komórek raka jajnika, a także powoduje wzrost oporności na cisplatynę i paklitaksel, dwa leki stosowane w standardowym leczeniu raka jajnika. Analizowaliśmy także ścieżki sygnałowe, które wykazują zmienioną regulację w komórkach z nadekspresją ITGBL1. Były to głównie ścieżki związane ze strukturą i funkcją macierzy zewnątrzkomórkowej, sygnalizacją poprzez integriny, tworzeniem ognisk przylegania, itp [1,5].

3. Prowadziliśmy też badania nad genami *DSPG3/EPYC* (dermatan sulfate proteoglycan 2/epifikan) oraz *LOX* (kodujący oksydazę lizylową), których celem było wybranie wiarygodnych przeciwciał do detekcji tych białek metodami wetern blotting i immunohistochemii.

W 2020 roku ukazały się poniższe publikacje:

1. Cortez AJ, Kujawa KA, Wilk AM, Sojka DR, Syrkis JP, Olbryt M, Lisowska KM. Evaluation of the Role of ITGBL1 in Ovarian Cancer. *Cancers (Basel)*. 2020 Sep 19;12(9):2676. doi: 10.3390/cancers12092676 (IF 6.126 [2019]; MNiSW - 140 pkt)
2. Kujawa KA, Zembala-Nożyńska E, Cortez AJ, Kujawa T, Kupryjańczyk J, Lisowska KM. Fibronectin and Periostin as Prognostic Markers in Ovarian Cancer Cells. 2020 Jan 8;9(1):149. doi: 10.3390/cells9010149 (IF 4,366 [2019]; MNiSW – 140 pkt)

Wyniki naszych badań prezentowano w formie plakatowej na dwóch międzynarodowych konferencjach:

3. Alexander J. Cortez, Katarzyna A. Kujawa, Patrycja Tudrej, Katarzyna M. Lisowska. Detection of ITGBL1 mRNA isoforms in ovarian cancer cells. 2020 IGCS xDigital Annual Global Meeting, 10-13.09.2020, *International Journal of Gynecological Cancer*, 2020, 30, Suppl. 3, Abstract No. IGCS-1031, doi: 10.1136/ijgc-2020-IGCS.65.
4. Alexander J. Cortez, Anna Glodek, Aleksandra Krzywoń, Joanna Polańska, Katarzyna M. Lisowska. Search for predictive biomarkers of sensitivity/resistance against cisplatin in high-grade serous ovarian cancer. 2020 IGCS xDigital Annual Global Meeting, 10-13.09.2020, *International Journal of Gynecological Cancer*, 2020, 30, Suppl. 3, Abstract No. IGCS-1233, doi: 10.1136/ijgc-2020-IGCS.196.
5. Alexander J. Cortez, Katarzyna A. Kujawa, Patrycja Tudrej, Katarzyna M. Lisowska. Signaling pathways related with ITGBL1 in ovarian cancer cells. The 4th ESGO State of the Art Conference of the European Society of Gynaecological Oncology (ESGO), 14-16.12.2020, Kopenhaga, Dania, *Int. J. Gynecol. Cancer* 2020, 27, Suppl. 4, Abstract No. 419, p. 1931. doi: 10.1136/ijgc-2020-IGCS.65.

6. Katarzyna A. Kujawa, Ewa Zembala-Nożyńska, Alexander J. Cortez, Jolanta Kupryjańczyk, Katarzyna M. Lisowska. Fibronectin and periostin as prognostic markers in ovarian cancer. The 4th ESGO State of the Art Conference of the European Society of Gynaecological Oncology (ESGO), 14-16.12.2020, Kopenhaga, Dania, Int.J.Gynecol.Cancer 2020,27, Suppl. 4, Abstract No. 423, p. 1931. doi: 10.1136/ijgc-2020-IGCS.65.

2.3. Ocena przydatności modelowego układu terapeutycznego: zrekombinowany wirus myksomatozy i mezenchymalne komórki macierzyste w niszczeniu guzów nowotworowych.

Kierownik: J. Jazowiecka-Rakus

Wykonawcy: J. Jazowiecka-Rakus, A. Sochanik, A. Hadryś, M. Paździor, E. Małusecka, W. Fidyk (KTSiO)

W ramach wieloletnich badań dotyczących wirusoterapii onkolitycznej z wykorzystaniem nośników komórkowych i wirusów onkolitycznych (strategia „konja trojańskiego”) dzięki której możliwe jest niszczenie ogniska nowotworowego selektywnie na drodze tzw. onkolizy oraz pobudzenia przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej, zbadano przydatność mezenchymalnych komórek macierzystych pochodzących z tkanki tłuszczowej (ADSC) do terapii ortotopowego raka trzustki wywołanego eksperymentalnie u myszy. Najpierw oceniono zdolność ADSC do migracji w kierunku komórek linii raka trzustki Panc-1 oraz Pan02luc. Przeanalizowano tzw. permisywność komórek ADSC, Panc-1 oraz Pan02luc dla vMyxEGFP wyznaczając jednoetapowe krzywe wzrostu wirusa. Zbadano aktywację kinazy Akt-473 w liniach komórkowych ADSC, Panc-1, Pan02luc i RK13 przed i po infekcji vMyxEGFP wykorzystując metodę Western blot. Cytotoksyczność vMyxEGFP dla linii komórkowych ADSC, Panc-1 i Pan02-luc określono za pomocą testu proliferacji MTS. Rozprzestrzenianie się infekcji vMyxEGFP z zainfekowanych ADSC na hodowane w kokulturze linie komórkowe Panc-1 lub Pan02-luc obserwowano pod mikroskopem fluorescencyjnym. Możliwe hamowanie wzrostu nowotworu trzustki myszy C57BL/6 monitorowano za pomocą obrazowania bioluminescencyjnego (IVIS) po implantacji ortotopowej komórek Pan02-luc, które wcześniej hodowano w kokulturze z ADSC zainfekowanymi vMyxEGFP. Komórki ADSC wykazują wysoki tropizm do komórek nowotworowych Pan02luc oraz Panc-1. vMyxEGFP efektywnie replikuje w komórkach ADSC, Panc-1 oraz Pan02luc. Wszystkie badane linie komórkowe wykazują permisywność dla vMyxEGFP. Poziom ufosforylowanej Akt473 wzrasta po infekcji vMyxEGFP w liniach komórkowych Panc-1 oraz ADSC. vMyxEGFP wykazuje silniejsze działanie cytotoksyczne wobec komórek Pan02luc i Panc-1, niż wobec ADSC. Wykazano, że ADSC zainfekowane vMyxEGFP przekazują wirusa komórkom nowotworowym trzustki *in vitro*, tym samym potwierdzając ich przydatność do wirusoterapii *in vivo*. Ortotopowe podanie myszom C57BL/6 kokultury komórek Pan02-luc z ADSC zainfekowanymi vMyxEGFP wykazało silne zahamowanie rozwoju raka trzustki.

Jako wniosek można stwierdzić, że mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące z tkanki tłuszczowej (ADSC) zainfekowane wirusem myksomatozy umożliwiają niszczenie komórek nowotworowych trzustki *in vitro* i są obiecującym nośnikiem tego wirusa („koń trojański”) w terapii *in vivo* (przy użyciu konstruktów vMyx-LIGHT-tdTomato-Fluc o nasilonym działaniu immunoterapeutycznym).

Prezentacja „Przydatność mezenchymalnych komórek macierzystych jako nośnika wirusa myksomatozy w onkolitycznej wirusoterapii mysiego nowotworu trzustki” (autorzy: Hadryś A., Sochanik A., Kramer-

Marek G., Fidyk W., Grajek M., Rahman MM, McFadden G., Kozik V., Jazowiecka-Rakus J.) przedstawiona na VII Śląskich Spotkaniach Naukowych (Organizator: Stowarzyszenie na Rzecz Wspierania Badań nad Rakiem; online; 29-30.05.2020) zdobyła **pierwsze miejsce w kategorii „Nowe Strategie Terapeutyczne” wraz z możliwością publikacji badań na łamach czasopisma International Journal of Molecular Sciences (manuskrypt do złożenia przed 31.XII. 2020).**

Tematyka opisanych powyżej badań została przedstawiona na Seminarium wygłoszonym online w Center for Immunotherapy, Vaccines, and Virotherapy (B-CIVV), Bidesign Institute, State University of Arizona, Tempe, AZ (USA) w dniu 03.11.2020.

2.4. Charakterystyka składu molekularnego oraz funkcji egzosomów w przekazywaniu sygnałów generowanych przez komórki nowotworowe.

Kierownik: M. Pietrowska

Wykonawcy: M. Pietrowska, A. Abramowicz, K. Jelonek, M. Smolarz, G. Zając, P. Widłak, L. Ponge, M. Gawin

Zadanie wieloletnie. Najważniejsze wyniki uzyskane w roku 2020:

1. Przeprowadzono kompletną analizę proteomu egzosomów wydzielanych przez komórki czerniaka do osocza pacjentów z tym nowotworem, tzw. MTEX (egzosomy izolowano metodą immuno-capture wykorzystując przeciwciało do antygenu CSPG4 charakterystycznego dla tego nowotworu). Określono sygnaturę 73 białek charakterystycznych dla MTEX, odróżniających je od egzosomów produkowanych przez inne komórki. Ponadto, zidentyfikowano panel białek egzosomów, różnicujący pacjentów o lepszej i gorszej prognozie.
2. Zbadano metabolom egzosomów obecnych w surowicy pod kątem różnic między osobami zdrowymi i pacjentami z rakiem głowy i szyi. Stwierdzono, że charakterystyczne cechy metabolomu egzosomów pacjentów z chorobą nowotworową obejmują metabolity uczestniczące w typowych dla nowotworów procesach energetycznych (np. efekt Warburga). W przeprowadzonym badaniu pilotażowym nie wykryto swoistej sygnatury odpowiedzi na promieniowanie, tj. istotnych statystycznie różnic między materiałem pobranym przed i po radioterapii.
3. Opracowano i zoptymalizowano procedurę izolacji z surowicy ludzkiej egzosomów na potrzeby analizy składu lipidowego tych pęcherzyków. Wdrożono metodę analizy profilu lipidów obecnych w egzosomach za pomocą wysoko-rozdzielczej spektrometrii mas.
4. Sfinalizowano prace mające na celu określenie sygnatury miRNA obecnego w egzosomach uwalnianych z komórek eksponowanych na promieniowanie jonizujące.

Uzyskane wyniki opublikowano w następujących pracach:

1. Abramowicz A, Łabaj W, Mika J, Szołtysek K, Ślęzak-Prochazka I, Mielańczyk Ł, Story MD, Pietrowska M, Polański A, Widłak P. MicroRNA profile of exosomes and parental cells is differently affected by ionizing radiation. *Radiat Res.* 2020;194(2):133-142. doi: 10.1667/RADE-20-00007.
2. Wojakowska A, Żebrowska A, Skowronek A, Rutkowski T, Polański K, Widłak P, Marczak L, Pietrowska M. Metabolic Profiles of Whole Serum and Serum-Derived Exosomes Are Different in Head and Neck Cancer Patients Treated by Radiotherapy. *J Pers Med.* 2020;10(4):E229. doi: 10.3390/jpm10040229.

3. Abramowicz A, Story MD. The Long and Short of It: The Emerging Roles of Non-Coding RNA in Small Extracellular Vesicles. *Cancers* 2020;12:E1445. doi: 10.3390/cancers12061445.

4. Żebrowska A, Widlak P, Whiteside T, Pietrowska M. Signaling of tumor-derived sEV impacts melanoma progression. *Int J Mol Sci.* 2020;21:E5066. doi:10.3390/ijms21145066.

Zadanie finansowane poprzez grant NCN 2013/11/B/NZ7/01512, grant NCN 2017/27/B/NZ7/01833, grant wewnętrzny GW/CBT/3/2019.

2.5. Mikrośrodowisko guza, komórki macierzyste, waskulogeneza oraz niestabilność genetyczna jako czynniki odpowiadające za heterogenność guzów litych.

Kierownik: E. Chmielik

2.5.1. Ekspresja CD 133 i ALDH-1 oraz neowaskulogeneza jako czynniki rokownicze w rakach piersi.

Wykonawcy: A. Stanek-Widera, M. Biskup-Frużyńska, K. Widera, K. Cedor, K. Czyż, M. Wesółowski, J. Młynarczyk-Liszka, M. Środa

Badanie miało charakter retrospektywny. Analizie poddano 72 przypadki raka piersi zdiagnozowane i zoperowane w Instytucie Onkologii w Gliwicach w latach 2006-2012. Materiał obejmował preparaty z biopsji gruboigłowej piersi i materiału pooperacyjnego. Dużą trudnością w skompletowaniu materiału było zebranie jednolitej pod kątem histologicznym grupy pacjentek, które miałyby wykonaną zarówno diagnostykę wstępną (biopsję gruboigłową) jak i zabieg operacyjny w jednym ośrodku (IO), ze względu na dużą migrację pacjentek pomiędzy ośrodkami. Z materiału zostały wykonane mikromacierze tkankowe, następnie wykonano barwienia immunohistochemiczne, a preparaty zostały zeskanowane i poddane automatycznej ocenie. Do wykonania tych czynności użyto skanera 3DHISTEC PANORAMIC FLASH III, oprogramowanie 3D HISTEC CASE CENTER/ CASE VIEWER wersja 2.3.0/ quant center wersja 2.2.1. Materiał z oceny cyfrowej został przekazany do analizy statystycznej.

Badany materiał został podzielony na 3 grupy:

I grupa (21 przypadków) to przypadki, które nie były poddane chemioterapii przedoperacyjnej, a wszystkie węzły chłonne były wolne od przerzutów.

II grupa (26 przypadków) to przypadki, które były poddane chemioterapii przedoperacyjnej, a wszystkie węzły chłonne były wolne od przerzutów.

III grupa (25 przypadków) to przypadki poddane przedoperacyjnej chemioterapii, a w węzłach chłonnych stwierdzono przerzuty.

Ze względu na tą samą grupę badaną analizy do dwóch zadań badawczych (2.5.1. i 3.1.2.) zostały wykonane razem.

Zaplanowane analizy: korelacja CD3 i CD8 razem i osobno z cechą T, N, G oraz przebyłym leczeniem, ta sama korelacja dla markerów nowotworowych komórek macierzystych: CD133, CD44, ALDH1 oraz wykazanie, który z nich jest najlepszym wskaźnikiem (tzn. który wybarwił największą liczbę komórek).

Nie wykazano statystycznie istotnych różnic w parametrach CD3, CD8 oraz sumarycznym parametrze CD3 + CD8 w zależności od stopnia złośliwości nowotworu (cechy G). Nie wykazano różnic w ilości wybarwionych

komórek dla markerów CD44 oraz ALDH1. Stwierdzono natomiast statystycznie istotne różnice w ilości wybarwionych komórek na mm² dla markera CD133 ($p < 0,05$). Wykazano statystycznie istotne różnice pomiędzy parametrem CD133 dla G0 oraz G3 ($p < 0,05$).

Nie wykazano statystycznie istotnych różnic w CD3, CD8 oraz sumie CD3 + CD8 w zależności od zastosowania chemioterapii przedoperacyjnej. Nie wykazano różnic w ilości wybarwionych komórek dla markerów CD44 oraz ALDH1. Stwierdzono natomiast statystycznie istotne różnice w ilości wybarwionych komórek na mm² dla markera CD133 ($p < 0,01$). Osoby po chemioterapii miały przeciętnie niższe liczby wybarwionych markerem CD133 komórek niż osoby bez chemioterapii.

Nie wykazano różnic w parametrach CD3, CD8 i sumie CD3 + CD8 w zależności od cechy T. Podobnie dla markerów komórek macierzystych CD44 i ALDH1. Wykazano natomiast statystycznie istotne różnice w ilości wybarwionych komórek w zależności od parametru T dla markera CD133 ($p < 0,05$). W przypadku T0 zaobserwowano znacząco niższą liczbę wybarwionych komórek na 1 mm² tkanki nowotworu.

Badanie nie zostało ukończone, a ze względu na zmiany kadrowe, rezygnację części uczestników z udziału w projekcie, małą liczebność badanych grup i brak dostępu do bazy danych, nie będzie ono kontynuowane.

2.5.2. Ocena ekspresji markerów nowotworowych komórek macierzystych: CD44, ALDH1 i CD98 jako czynników prognostycznych i predykcyjnych w rakach płaskonabłonkowych gardła środkowego w zależności od statusu HPV.

Wykonawcy: M. Biskup-Frużyńska, A. Stanek-Widera, M. Śnietura, B. Nikiel, A. Kopeć, T. Rutkowski, D. Lange

Jest to badanie retrospektywne. Materiał stanowią wycinki z biopsji oraz tzw. „duży” materiał pooperacyjny z raków błony śluzowej gardła środkowego: 53 HPV(+) oraz 39 HPV(-) pacjentów diagnozowanych i leczonych w Instytucie Onkologii w Gliwicach w latach 2002-2016. Wykonano barwienia immunohistochemiczne: CD44, ALDH1, CD98, Ki67, PHH3 oraz oceniono reakcje barwne w mikroskopie świetlnym.

W bieżącym roku wykonano kolejny etap badania: zeskanowanie preparatów mikroskopowych (po 6 dla każdego z 92 przypadków: 1 preparat HE oraz 5 preparatów immunohistochemicznych) oraz wyznaczenie reprezentatywnych dla materiału adnotacji o takim samym polu powierzchni na uzyskanych slajdach. W przypadku znacznej heterogenności odczynu wyznaczono więcej niż jedno pole, do analizy statystycznej wykorzystana będzie ocena uśredniona. Analizie cyfrowej poddano takie parametry jak ilość zabarwionych komórek, oraz w przypadku markerów nowotworowych komórek macierzystych (CD44, ALDH1 i CD98) intensywność reakcji barwnej.

Wyniki wymagają jednak aktualizacji danych klinicznych w celu uzyskania dłuższych czasów obserwacji. Zostaną porównane wyniki z oceny w mikroskopie świetlnym z danymi z analizy cyfrowej obrazów mikroskopowych. Szczególnie interesujące będą wyniki dotyczące oceny reakcji typu cytoplazmatycznego i błonowego, których ocena półilościowa jest obciążona dużą subiektywnością. Być może będzie to kolejny przypadek, w którym komputer będzie skuteczniejszym narzędziem w ocenie barwień immunohistochemicznych niż człowiek.

Uzyskane dane będą przedmiotem publikacji.

2.6. Molekularne składniki egzosomów obecnych w moczu chorych na raka stercza - próba znalezienia nowych biomarkerów choroby nowotworowej.

Kierownik: L. Miszczyk

Wykonawcy: S. Blamek, A. Abramowicz, M. Smolarz, E. Telka, L. Miszczyk, W. Majewski, J. Wydmański, B. Jochymek, P. Widlak

W roku 2020 do momentu złożenia raportu wykonano większość zaplanowanych w projekcie działań, w tym między innymi:

1. Zebranie założonej w harmonogramie ilości próbek materiału biologicznego od pacjentów.
2. Wstępne opracowanie pobranego materiału (odwirowanie i krioprezerwacja).
3. Zbieranie materiału biologicznego w grupie kontrolnej.
4. Opracowanie podstawowej bazy danych klinicznych chorych włączonych do badania.
5. Opracowanie protokołu przygotowania próbek egzosomów izolowanych z moczu pacjentów do analizy proteomicznej z wykorzystaniem spektrometru masowego typu Q Exactive MS.
6. Optymalizacja procedury immunoizolacji egzosomów przy użyciu kulek magnetycznych opłaszczonych przeciwciałami.
7. Zaplanowanie eksperymentu dotyczącego charakterystyki transkryptomu egzosomów pacjentów ze szczególnym uwzględnieniem circRNA.
8. Wyizolowanie RNA z próbek pobranych od pacjentów i przygotowanie materiału do procedury sekwenjonowania nowej generacji.

W roku 2020 skompletowano odczynniki niezbędne do przeprowadzenia zaplanowanych eksperymentów. Ze względu na utrudnienia związane z sytuacją epidemiologiczną, część dostaw znacznie się opóźniła lub była niemożliwa do zrealizowania w pierwotnie zakładanych ramach czasowych. Konieczne było również opracowanie alternatywnych rozwiązań związanych z utrudnionym dostępem do niektórych produktów (np. kulek magnetycznych firmy MBL). Niezależnie od napotkanych trudności, w pierwszym półroczu 2020 roku dokonano pełnej charakterystyki egzosomów izolowanych z moczu. Dokonano również modyfikacji używanego dotychczas protokołu izolacji z uwzględnieniem specyficznych wymagań stawianych przez spektrometrię mas. Opracowano protokół pozwalający na skuteczne oczyszczenie próbki ze związków ko-izolowanych z egzosomami, które zaburzały pomiar spektrometryczny. W tym celu dokonano porównania skuteczności oczyszczania próbek przy użyciu kilku dostępnych komercyjnie produktów, których efektywność znacząco się od siebie różniła. Obecnie po przejściu wstępnej weryfikacji przy użyciu spektrometru ultrafleXtreme MALDI-ToF pierwsze próbki oczekują na pomiar przy użyciu czulszego spektrometru Q Exactive Orbitrap, będącego obecnie w trakcie naprawy. Równocześnie prowadzono prace z zakresu optymalizacji izolacji egzosomów specyficznych dla raka prostaty przy użyciu kulek magnetycznych. Badania te uległy jednak opóźnieniu ze względu na wspomniane problemy dystrybucyjne, a w końcu także produkcyjne. Aby zachować szanse na dalszą realizację tych badań, podjęto decyzję o wyborze produktu alternatywnego.

Podsumowując, pomimo znacznych ograniczeń dostępności materiałów wynikających z aktualnej sytuacji epidemiologicznej oraz awarii spektrometru uniemożliwiającej finalizację badań w zakresie analizy proteomicznej, w roku 2020 wykonano zaplanowane na ten rok zadania.

2.7. Detekcja komórek o fenotypie macierzystym w stabilnych liniach komórkowych raka jajnika.

Kierownik: P. Tudrej

Wykonawcy: P. Tudrej, M. Głowala-Kosińska, D. Sojka, K. Lisowska

W ramach projektu podjęliśmy się próby poszukiwania związku pomiędzy zidentyfikowaną przez nas wielogenową sygnaturą prognostyczną (Lisowska et al., 2016), a fenotypem macierzystym komórek raka jajnika. Model eksperymentalny obejmuje wykorzystanie trzech wariantów komórek:

- kontrolnej linii komórkowej (wrażliwej na olaparib),
- linii komórkowej wzbogaconej w komórki o fenotypie macierzystym (po traktowaniu olaparibem)
- linii komórkowej o obniżonym odsetku komórek macierzystych (traktowanych pimozydem).

Pierwszy etap projektu obejmował przygotowanie tego unikalnego schematu eksperymentalnego. W tym celu wykonana została ocena cytotoksyczności olaparibu oraz pimozydu za pomocą testu AlamarBlue na panelu linii komórkowych raka jajnika, jakimi dysponujemy (A2780, ES2, KURAMOCHI, OAW42, OVCAR3, OVCAR4, OVPA8, SKOV3). Wykorzystany test pozwala ocenić jedynie aktywność metaboliczną komórek poddanych traktowaniu, co nie zawsze odpowiada ocenie żywotności. Z tego względu zdecydowano o poszerzeniu analizy żywotności komórek raka jajnika traktowanych olaparibem i pimozydem, wykonując test z fioletem krystalicznym oraz test klonogenności. Wyniki uzyskane za pomocą tych testów okazały się zgodne z danymi dotyczącymi aktywności metabolicznej. Na ich podstawie wyznaczono wartości IC₅₀ dla poszczególnych linii i wytypowano linie najbardziej wrażliwe na olaparib. Okazały się nimi linie OVPA8 (IC₅₀ = 4,5 μM), A2780 (IC₅₀ = 6,3 μM) i KURAMOCHI (IC₅₀ = 9 μM).

Kolejny etap pracy polegał na ocenie regulacji cyklu komórkowego, aby określić mechanizm warunkujący hamowanie wzrostu traktowanych komórek. Wykonana analiza cytometryczna z wykorzystaniem jodku propidyny wykazała, że w wyniku traktowania komórek raka jajnika olaparibem dochodzi do zahamowania cyklu komórkowego w fazie G1/M. Traktowanie pimozydem nie spowodowało natomiast istotnych zmian w regulacji cyklu komórkowego.

Aby ocenić, czy zmiany zachodzące w komórkach pod wpływem traktowania olaparibem i pimozydem mają charakter apoptozy, nekrozy, czy są one wynikiem starzenia komórkowego (senescence), wykonany zostanie test cytometryczny z wykorzystaniem aneksyny V. Aby wyznaczyć warunki tego eksperymentu, wykonano kinetykę obejmującą testowanie różnych stężeń olaparibu i pimozydu (wartości IC₂₀ i IC₅₀) oraz różne czasy traktowania komórek (24h, 48h, 72h). Obecnie trwają prace nad jego optymalizacją.

Wyniki wstępne, uzyskane w ramach projektu zostały zaprezentowane w formie następujących doniesień plakatowych:

1. P. Tudrej, M. Głowala-Kosińska, D. R. Sojka, A. J. Cortez, K. M. Lisowska. Effect of olaparib treatment on cell cycle, senescence and cell death in ovarian cancer cells. xDigital Annual Global Meeting of the International Gynecologic Cancer Society, 10-13 września 2020, Włochy, Rzym, *Int. J. Gynecol. Cancer*, 2020, 30, Suppl. 3, IGCS20_1219, Abstract No. 219, p. A91, doi: 10.1136/ijgc-2020-IGCS.187 (IF = 2.095)
2. P. Tudrej, M. Głowala-Kosińska, D. R. Sojka, A. J. Cortez, K. M. Lisowska. The influence of olaparib treatment on the cell cycle and viability of ovarian cancer cells. The 5th Warsaw Conference on Perspectives of Molecular Oncology: Molecular Immunology of Cancer, 23-24 września 2020, Warszawa, Materiały Zjazdowe, Poster no. P30, p. 38

Wyniki wstępne, uzyskane w ramach grantu wewnętrznego posłużyły do przygotowania projektu grantowego pt. „Czy komórki raka jajnika z nadekspresją genów niekorzystnej sygnatury prognostycznej mają cechy komórek macierzystych? Wstępne badania w oparciu o model *in vitro* i *in vivo*” zgłoszonego w konkursie Preludium 17.

3.1. Lokalne parametry odpowiedzi immunologicznej oraz ich wpływ na rozwój guza nowotworowego.

Kierownik: E. Chmielik w zastępstwie za D. Lange

3.1.1. Analiza ekspresji receptorów CD40/CD154 w raku płaskonabłonkowym regionu głowy i szyi.

Wykonawcy: S. Pakuło, M. Śnietura, T. Rutkowski, B. Nikiel, A. Kopeć, A. Stanek-Widera, M. Wesółowski, K. Składowski

Osiągnięte cele projektu (w punktach):

Korzystając z archiwum Zakładu Patologii Nowotworów przygotowano materiał pooperacyjny 106 pacjentów leczonych w NIO.

- Wybrano bloczki parafinowe zawierające zarówno utkanie raka jak i reprezentatywny fragment nacieku zapalnego (wewnątrz guza jaki i frontu nacieku zapalnego, jeżeli występował).
- Wykonano skany preparatów w systemie Pannoramic 250 Flash II.
- Przygotowanie materiału do oznaczenia statusu HPV za pomocą podwójnego algorytmu IHC/RT-PCR w grupie 106 pacjentów.
- Wykonano barwienia immunohistochemiczne skrawków parafinowych przeciwciałami CD40 i CD154 w grupie 106 pacjentów.
- Wykonano analizę ekspresji receptorów CD40/CD154 w komórkach raka jak i w komponencie immunologicznego mikrośrodowiska guza.
- Wykonano analizę statystyczną porównania przeżyć w kontekście poszukiwania czynnika prognostycznego w grupie 85 pacjentów leczonych z powodu raka płaskonabłonkowego regionu głowy i szyi.

Etapy badania zaplanowane 2021 rok:

- Oznaczenie statusu HPV za pomocą podwójnego algorytmu IHC/RT-PCR z wykorzystaniem termocyklera ViiA7 z użyciem zestawów AmoyDX identyfikujących 21 podtypów wirusa w grupie 106 pacjentów (jeżeli będzie możliwy zakup odczynników z wykorzystaniem środków z grantu wewnętrznego).
- Uzupełnienie bazy danych klinicznych o niezbędne informacje.

Syntetyczny opis uzyskanych wyników :

- Opracowana metoda barwienia immunohistochemicznego przeciwciałami CD40 i CD154 jest wystarczająca do celów badawczych, ale wymaga dalszej walidacji w przypadku chęci wprowadzenia barwienia do postępowania diagnostycznego.
- W analizie statystycznej porównania przeżyć w grupach metoda log-rank oraz porównania krzywych przeżycia metodą Kaplana Meiera wykazano trend ($p = 0,0535$) w stosunku do ekspresji receptora CD40 oraz wznowy regionalnej.

- Zdecydowano o zwiększeniu grupy badanej z początkowych 85 do 106 pacjentów celem uzyskania istotnych statystycznie wyników. Po uzupełnieniu bazy danych klinicznych możliwe będzie sprawdzenie korelacji pozostałych parametrów.

W 2021 r. planowane jest przygotowanie publikacji wyników badania oraz przygotowanie wniosku grantowego do NCN celem kontynuacji badania.

3.1.2. Ocena „immunoscore” w rakach piersi jako czynnik o znaczeniu prognostycznym z zastosowaniem mikromacierzy tkankowych.

Wykonawcy: A. Stanek-Widera, M. Biskup-Frużyńska, M. Śnietura, M. Turska d'Amico, K. Widera, M. Śmiezek, J. Simek, A.Kopeć, R. Lamch, D. Lange

Badanie miało charakter retrospektywny. Analizie poddano 72 przypadki raka piersi zdiagnozowane i zoperowane w Instytucie Onkologii w Gliwicach w latach 2006-2012. Materiał obejmował preparaty z biopsji gruboigłowej piersi i materiału pooperacyjnego. Dużą trudnością w skompletowaniu materiału było zebranie jednolitej pod kątem histologicznym grupy pacjentek, które miałyby wykonaną zarówno diagnostykę wstępną (biopsję gruboigłową) jak i zabieg operacyjny w jednym ośrodku (IO), ze względu na dużą migrację pacjentek pomiędzy ośrodkami. Z materiału zostały wykonane mikromacierze tkankowe, następnie wykonano barwienia immunohistochemiczne, a preparaty zostały zeskanowane i poddane automatycznej ocenie. Do wykonania tych czynności użyto skanera 3DHISTEC PANORAMIC FLASH III, oprogramowanie 3D HISTEC CASE CENTER/ CASE VIEWER wersja 2.3.0/ quant center wersja 2.2.1. Materiał z oceny cyfrowej został przekazany do analizy statystycznej.

Badany materiał został podzielony na 3 grupy:

I grupa (21 przypadków) to przypadki, które nie były poddane chemioterapii przedoperacyjnej, a wszystkie węzły chłonne były wolne od przerzutów.

II grupa (26 przypadków) to przypadki, które były poddane chemioterapii przedoperacyjnej, a wszystkie węzły chłonne były wolne od przerzutów.

III grupa (25 przypadków) to przypadki poddane przedoperacyjnej chemioterapii, a w węzłach chłonnych stwierdzono przerzuty.

Zaplanowane analizy: korelacja CD3 i CD8 razem i osobno z cechą T, N, G oraz przebytym leczeniem.

Nie wykazano statystycznie istotnych różnic w parametrach CD3, CD8 oraz sumarycznym parametrze CD3 + CD8 w zależności od stopnia złośliwości nowotworu (cechy G).

Nie wykazano statystycznie istotnych różnic w CD3, CD8 oraz sumie CD3 + CD8 w zależności od zastosowania chemioterapii przedoperacyjnej.

Nie wykazano różnic w parametrach CD3, CD8 i sumie CD3 + CD8 w zależności od cechy T.

Badanie nie zostało ukończone, jednak ze względu na zmiany kadrowe, rezygnację części uczestników z udziału w projekcie, małą liczebność badanych grup i brak dostępu do bazy danych nie będzie kontynuowane.

3.1.3. Ocena wartości prognostycznej nacieków limfocytów T cytotoksycznych (CD3) i limfocytów T pamięci (CD8) w mikrośrodowisku guza z wykorzystaniem metody IMMUNOSCORE w grupie pacjentów leczonych chirurgicznie z powodu raka jelita grubego.

Wykonawcy: S. Pakuło, E. Stobiecka, B. Nikiel, W. Bal, M. Jaworska, D. Ponikiewska, B. Szcześniak-Kłusek, K. Czyż

Do badania włączono 126 pacjentów leczonych chirurgicznie z powodu raka jelita grubego w COI w Gliwicach. Badana grupa charakteryzuje się średnią wieku 62,384 (SD +/- 10,246), podziałem na płeć: kobiety 59 (46,82%), mężczyźni 67 (53,17%), stopniem zaawansowania pT: pT1-2 26 (20,6%), pT3-4 101 (79,4%), stopień zaawansowania pN: pN0 60 (47,62%), pN1-2 66(52,38%), stopień złośliwości G1 20 (15,87%), G2 94 (74,60%), G3 12 (79,52%). Ze zgromadzonego materiału tkankowego znajdującego się w bloczkach parafinowych wykonano mikromacierze tkankowe za pomocą automatycznego systemu TMA Grand Master. Markery immunohistochemiczne *CD3* oraz *CD8* zostały oznaczone w automatycznym systemie Ventana BenchMark ULTRA. Oceniono liczbę limfocytów T *CD3* i *CD8* w macierzach tkankowych za pomocą oprogramowania QuantCenter. Dla każdego pacjenta oceniano liczbę limfocytów w 4 macierzach (2 pochodzących z frontu guza i 2 z centralnej części guza) uzyskując medianę:

1. *CD3* front: 416 (SD +/-650),
2. *CD3* front: 646 (SD +/-572),
3. *CD3* centrum: 172 (SD +/- 309),
4. *CD3* centrum: 254 SD +/- 424),
5. *CD8* front: 303 (SD +/-264),
6. *CD8* front: 198 (SD +/-458),
7. *CD8* centrum: 65 (SD +/- 305),
8. *CD8* centrum: 57 (SD +/- 335).

Kolejnym etapem przewidzianym jest analiza statystyczna uzyskanych danych doświadczalnych wraz raportami histopatologicznymi oraz dostępnymi danymi klinicznymi.

3.1.4. Ocena statusu TILs metodą półilościową i automatyczną LISI oraz ekspresji PD-L1 w materiale przedoperacyjnym i pooperacyjnym w potrójnie ujemnych rakach piersi oraz korelacja z odpowiedzią na leczenie przedoperacyjne według skali Residual Cancer Burden (RCB).

Wykonawcy: E. Chmielik, D. Ławniczak-Cielińska, P.J. Paul, J. Simek, K. Czyż, B. Nikiel, J. Liszka, D. Lange

Materiał badawczy stanowiło 30 przypadków pierwotnych raków piersi G-3 potrójnie ujemnych (ER-/PR-/HER-2-/1+) zdiagnozowanych w biopsji gruboigłowej od pacjentek bez uprzedniej historii nowotworowej, u których następnie zastosowano chemioterapię przedoperacyjną i leczenie operacyjne.

Guzy przedoperacyjnie mierzyły od 9 mm do 58 mm, natomiast pooperacyjnie od 0 mm do 45 mm. Komórkowość badanych guzów oceniana przedoperacyjnie w biopsjach gruboigłowych wynosiła od 15 do 90%, natomiast w materiale pooperacyjnym wahała się od 0 do 70%.

Ocenę podścieliskowych TILs przeprowadzono z materiału przedoperacyjnego w biopsjach gruboigłowych metodą półilościową w mikroskopie świetlnym według wytycznych opublikowanych przez międzynarodową grupę roboczą Immuno-oncology Biomarker Working Group.

Ocena TILs przed leczeniem neoadjuwantowym wahała się między 5 a 90%.

Ocena Stromal TILs w materiale pooperacyjnym opierała się na wytycznych zawartych w publikacji Provenzano i wsp. metodą półilościową w preparatach HE z największego przekroju guza pozostałego po leczeniu przedoperacyjnym i uwzględniała wszystkie komórki jednojądrowe (limfocyty i plazmocyty) w podścielisku guza lub jego łożu w przypadku całkowitej odpowiedzi na leczenie. Ocena Stromal TILs w materiale pooperacyjnym wynosiła od 5 do 60%.

Ocena ekspresji PD-L1 została przeprowadzona na podstawie barwnej, błonowej reakcji immunohistochemicznej (kompletnej bądź częściowej) o jakiegokolwiek intensywności komórek odpornościowych (IC) z mysim przeciwciałem PD-L1 clone 22C3 (DAKO) oraz PD-L1 SP142 (ROCHE).

Wykonano 130 barwień PD-L1. Wybarwiono 62 biopsje gruboigłowe, 62 reprezentatywne wycinki z guza po zastosowaniu leczenia przedoperacyjnego oraz 6 węzłów chłonnych, w których stwierdzono przerzuty.

Ocena odpowiedzi na leczenie została przeprowadzona przy zastosowaniu kalkulatora Residual Cancer Burden (RCB) ze strony: http://www.mdanderson.org/breastcancer_RCB.

RCB jest obliczany w oparciu o 6 zmiennych, takich jak dwa największe wymiary łoża guza pierwotnego, wyrażona procentowo średnia komórkowość guza, udział procentowy tkania raka *in situ*, liczba węzłów chłonnych z obecnymi przerzutami raka, oraz średnica największego przerzutu.

Odpowiedź na przeprowadzone leczenie jest klasyfikowana do 4 klas: RCB0, RCBI, RCBI, RCBIII. Wśród badanej grupy 30 pacjentek 16 odpowiedziało całkowitą odpowiedzią na leczenie (RCB=0), odpowiedź częściowa była obserwowana u 3 pacjentek z RCBI, u 8 pacjentek z RCBI i 3 pacjentek z RCBIII.

Guzy z całkowitą odpowiedzią na leczenie, przedoperacyjnie charakteryzowały się średnią oceną TILs na poziomie 24%. W materiale pooperacyjnym średnia ocena TILs wynosiła 6%.

Guzy z częściową remisją RCBI w biopsjach gruboigłowych wykazywały średnią wartość TILs wynoszącą 37%. W materiale pooperacyjnym średnia ocena TILs wynosiła 38%.

Raki RCBI posiadały niską komórkowość (średnia 5%), wysokie TILs (38%).

W guzach z częściową odpowiedzią RCBI, przedoperacyjnie i pooperacyjnie średni TILs wynosił 21% i 13%,

W grupie 3 pacjentek, których raki zakwalifikowano, jako RCBIII, przedoperacyjnie i pooperacyjnie średni TILs wynosił 20% i 10%.

U wszystkich pacjentek RCB III obserwowano przerzuty do węzłów chłonnych.

	RCB 0	RCB I	RCB II	RCB III
Liczba pacjentek	16	3	8	3
TILS przedoperacyjnie	24%	37%	21%	20%
TILS pooperacyjnie	6%	38%	13%	10%
Komórkowość przedoperacyjnie	39%	43%	39%	70%
Komórkowość pooperacyjnie	0%	5%	13%	53%
PDL-1	11%	28%	9%	3%

przedoperacyjnie

(Klon 22C3)

PDL-1 pooperacyjnie	0%	31%	4%	3%
---------------------	----	-----	----	----

(Klon 22C3)

PDL-1 przedoperacyjnie	2%	5%	0,6%	0,3 %
------------------------	----	----	------	-------

(Klon SP142)

PDL-1 pooperacyjnie	2%	5%	6%	1%
---------------------	----	----	----	----

(Klon SP 142)

Wstępne obserwacje w badanej grupie raków potrójnie ujemnych pozwalają wysunąć następujące wnioski:

1. TILs pooperacyjne jest odwrotnie proporcjonalne do komórkowości guza po leczeniu przedoperacyjnym.
2. Ekspresja PDL-1 przy zastosowaniu 2 różnych klonów jest odmienna, przy czym największe różnice obserwuje się w guzach klasy RCB I.

Planujemy dalsze opracowanie uzyskanych wyników i przygotowanie manuskryptu do druku.

3.2. Ocena aktywności immunologicznej w HPV-dodatnim i HPV-ujemnym raku płaskonabłonkowym regionu głowy i szyi za pomocą osoczowych cytokin oraz immunologicznych punktów kontroli.

Kierownik: J. Mrochem-Kwarciak

Wykonawcy: R. Deja, A. Chmura, A. Kowalska, T. Rutkowski, A. Wygoda, P. Polanowski, M. Kentnowski, A. Brewczyński, A. Mazurek, K. Dulik, T. Czerw, K. Składowski.

Rak HPV-zależny, jest silnie immunogenny, o czym świadczy rozwinięta odpowiedź układu immunologicznego wobec antygenów wirusowych obecnych w nowotworze. Różnice w reaktywności układu immunologicznego w mikrośrodku guza u chorych z nowotworem HPV dodatnim (HPV+) są związane aktywacją odpowiedzi typu komórkowego. Obecność guza nowotworowego, niezależnie od etiologii powstania, powoduje wytworzenie lokalnej reakcji zapalnej w mikrośrodku guza, która stosunkowo szybko wraz ze wzrostem nowotworu ulega uogólnieniu, cechując się istotnym osłabieniem odporności komórkowej, co może osłabiać odpowiedź specyficzną na nowotwór.

Celem programu badawczego było porównanie laboratoryjnych parametrów układu immunologicznego: białka C-reaktywnego (CRP), Interleukiny 6 (Il-6), leukocytów (WBC), neutrofilii (Neut) oraz limfocytów (Limf) w dwóch grupach chorych na raka gardła środkowego (RGŚ): HPV(+) względem HPV(-).

Analizie poddano grupę 75 chorych na RGŚ, zakwalifikowanych do radioterapii samodzielnej (32%) lub skojarzonej z chemioterapią (68%). U 47% chorych rozpoznano zaawansowanie raka w stopniu T1-2, u pozostałych 53% - w stopniu T3-4. Cechę N0 stwierdzono u 44%, a cechę N+ u 56% chorych. Morfologię krwi obwodowej z różnicowaniem krwinek białych, stężenie białka CRP, oraz Il-6 wykonano przed i bezpośrednio po leczeniu. Oznaczenie HPV DNA wykonano w osoczu krwi metodą QPCR.

U chorych ze stwierdzonym RGŚ HPV (-) zaobserwowano, w porównaniu do chorych na RGŚ HPV(+) istotnie wyższą: liczbę WBC ($p=0,006$ mediana: 6,88 vs 5,69), bezwzględną liczbę Neut ($p=0,03$ mediana: 4,24 vs 3,03) i Limf ($p=0,03$ mediana: 1,96 vs 1,49) przed leczeniem oraz wyższe stężenie CRP ($p=0,0001$ mediana: 5,88 vs 1,35 mg/dl) i Il-6 ($p=0,04$ mediana: 6,81 vs 4,30 pg/ml) również przed leczeniem. Dodatkowo

stwierdzono, u chorych na RGŚ HPV (-) w porównaniu do grupy chorych na RGŚ HPV (+) wyższą liczbę WBC (p=0,03 mediana: 5,53 vs 4,17), Neut (p=0,04 mediana: 3,88 vs 3,08), Limf (p=0,02 mediana: 0,69 vs 0,44) oraz Il-6 (p=0,05 mediana: 25,53 vs 11,65 pg/ml) po leczeniu. Analiza jednoczynnikowa wykazała, że podwyższona liczba leukocytów (WBC) (p=0.001) oraz wysokie stężenie CRP i Il-6 (p=0,0001; p=0,01, odpowiednio) są czynnikami wpływającymi na krótszy czas przeżycia całkowitego u chorych na RGŚ.

Uogólniona odpowiedź zapalna jest bardziej nasiloną u chorych na RGŚ HPV (-) o czym świadczy wyższa liczba WBC oraz wyższe stężenia CRP i Il-6. WBC oraz bezwzględna liczba limfocytów i neutrofilów w krążeniu u chorych wykazuje tendencję spadkową po leczeniu, natomiast CRP i Il-6 ulega podwyższeniu, niezależnie od statusu HPV, co jest spowodowane najpewniej wystąpieniem ostrego odczynu popromiennego. Leukocytoza oraz wysokie stężenie CRP i Il-6 są niekorzystnymi czynnikami rokowniczymi u chorych na RGŚ. Badanie wydaje się potwierdzać hipotezę, że lokalna reakcja zapalna w mikrośrodowisku guza, która wraz ze wzrostem nowotworu ulega uogólnieniu, cechując się istotnym osłabieniem odporności komórkowej, jest bardziej charakterystyczna dla grupy RGŚ HPV –.

W bieżącym roku, szczególnie gromadzony był materiał do badań. Personel ZAiBK został powołany decyzją Wojewody Śląskiego do walki z pandemią i realizował w głównej mierze badania genetyczne wirusa SARS-CoV-2, wykonując w tym czasie ponad 50 tys. badań, dlatego ze względu na duże zaangażowanie personelu ZAiBK w diagnostykę genetyczną wirusa SARS-CoV-2 analizy były kontynuowane w niewielkim zakresie, również udział w konferencjach oraz prezentowanie prac było mocno ograniczone.

W 2021 roku planowana jest dalsza kontynuacja bankowania materiału biologicznego oraz sukcesywne wykonywanie badań. Planowana jest również analiza wyników badań laboratoryjnych z wynikami leczenia uzyskanymi dla każdej grupy chorych. Głównym celem proponowanego badania jest zdobycie wiedzy na temat statusu układu immunologicznego oraz mechanizmów „immunosupresji” w HPV+ i HPV- HNSCC przed i po zastosowanym leczeniu przy użyciu nieinwazyjnych testów laboratoryjnych jako narzędzia predykcyjnego i prognostycznego w leczeniu radykalnym. Wstępne wyniki badań związanych aktywnością immunologiczną będą przedstawione w postaci doniesień zjazdowych. Rekrutacja chorych do badania zajmie do 5 lat - po tym okresie będzie można dokonać szczegółowej analizy.

3.3. Naturalna komórka limfoidalna (ILC) - nowy uczestnik odpowiedzi immunologicznej w przebiegu chorób limfoproliferacyjnych.

Kierownik: S. Giebel

Wykonawcy: A. Chwieduk, M. Głowala-Kosińska, A. Ciomber, I. Mitrus, A. Smagur, W. Fidyk, P. Borzdziłowska, J. Korfanty, M. Wilkiewicz, M. Twardosz., R. Swoboda, A. Kwiatkowska-Pamuła, K. Dulik, J. Najda, M. Krawczyk-Kuliś, A. Cortez, A. Krzywoń, M. Krzempek, A. Wilk, Z. Kołosa

Celem realizowanego od 2018 r. programu badawczego jest identyfikacja rodzaju zależności między naturalnymi komórkami limfoidalnymi, adaptacyjnym układem immunologicznym i komórkami nowotworowymi. Umożliwi ona określenie roli tych komórek w powstawaniu i przebiegu chorób limfoproliferacyjnych. Objęcie badaniem odpowiednio dużej i względnie homogennej grupy pacjentów nowotworowych pozwoli na kompleksową ocenę nie tylko samych naturalnych komórek limfoidalnych obecnych w otoczeniu komórek nowotworowych, ale również ich wpływu na pozostałe komórki układu immunologicznego.

Badaniem, do tej pory, objęta została grupa 31 pacjentów ze zdiagnozowanym chłoniakiem z dużej komórki B (DLBCL) w wieku 18-65 lat, nie poddawanych leczeniu przeciwnowotworowemu, przyjętych w celach diagnostycznych i terapeutycznych do Kliniki Transplantacji Szpiku i Onkohematologii, Centrum Onkologii – Instytutu im. M. Skłodowskiej-Curie, Oddziału w Gliwicach. Grupę kontrolną stanowili dawcy szpiku (n=32).

Ilościowa i jakościowa analiza cytometryczna z wykorzystaniem ośmiokolorowego cytometru przepływowego FACSCanto™ II (BD Bioscience) obejmowała:

- identyfikację komórek ILCs o fenotypie lin- (CD3, CD4, CD16, CD19, CD8, CD20, CD34, CD15, CD14, CD203c, CD33, FcεRI) CD127+; poszczególne subpopulacje zostały wyodrębnione dzięki analizie ekspresji CD294 (CRTH2) i CD117
- ocenę konwencjonalnych limfocytów: Tc (CD45+CD3+CD8+), Th (CD45+CD3+CD4+), NK (CD45+CD56+CD3-), NKT (CD45+CD56+CD3+),
- analizę limfocytów T regulatorowych (Treg) o immunofenotypie CD4+CD25^{high}; w celu analizy funkcjonalnej tych komórek zostały przeanalizowane dwie populacje: CD4+CD25^{high}CD127-CD45RA⁺ (naïve Tregs) i CD4+CD25^{high}CD127-CD45RA⁻ (memory Tregs).

Przeprowadzone analizy statystyczne wykazały wyższy odsetek całkowitej liczby naturalnych komórek limfoidalnych (ILCs) wśród leukocytów krwi obwodowej w grupie zdrowych dawców (0,24%) w porównaniu z grupą chorych na DLBCL (0,17%) (p-value = ,0024). Jednocześnie, w grupie badanej, wśród wszystkich ILCs zaobserwowano statystycznie wyższy odsetek ILC2 (19,69%) niż w grupie kontrolnej (11,46%) (p-value = ,0056). Ponadto udział całkowitej subpopulacji ILC3 w leukocytach krwi obwodowej był niższy wśród chorych (0,06%), w porównaniu do populacji zdrowych dawców szpiku (0,12%) (p-value = ,0018). Także odsetek komórek ILC3 NKp46 zarówno w leukocytach, całkowitej populacji ILCs, jak również wśród subpopulacji komórek ILC3 uległ obniżeniu w grupie badanej vs. zdrowej i wyniósł odpowiednio 0,029% (wśród leuko), 50,92% (wśród ILCs) oraz 24% (wśród ILC3) u chorych vs. 0,083% (wśród leuko), 68,15% (wśród ILCs) oraz 33,64% (wśród ILC3) w grupie kontrolnej (p-value = ,0006) (p-value = ,0037) (p-value = ,0016).

Analiza konwencjonalnych limfocytów (TBNK) wykazała większy udział komórek NK wśród limfocytów krwi obwodowej w grupie badanej 17,81% w porównaniu do grupy zdrowych dawców szpiku - 11,36% (p-value = ,0322). Jednocześnie w populacji chorych obniżeniu uległ odsetek limfocytów B (CD19+) i wyniósł 8,15% w porównaniu z grupą kontrolną (12,18%) (p-value = ,0002).

Dane analizowano wykorzystując parametryczny test jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). Analizy przeprowadzono przy użyciu pakietu oprogramowania R w wersji 4.0.1 (R Foundation for Statistical Computing, <http://www.r-project.org>).

Zarówno grupa pacjentów jak i kontrolna będą systematycznie uzupełniane zgodnie z założonym planem. Projekt finansowany jest z Grantu NCN 2017/25/B/NZ6/01484, którego zakończenie planowane jest na styczeń 2022.

Otrzymane wyniki posłużą do opracowania artykułów w recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, indeksowanych na Liście Filadelfijskiej. Zostaną też upublicznione w środowisku naukowym w formie doniesień na międzynarodowych i krajowych konferencjach specjalistycznych.

Zadanie 3.3 jest tożsame z zadaniem 6.9.1. Analiza czynników prognostycznych i predykcyjnych w planowaniu i ocena wyników leczenia chorych na DLBCL.

3.4 Analiza subpopulacji limfocytów oraz profilu cytokinowego materiału przeszczepowego pochodzącego od zdrowych dawców szpiku kostnego.

Kierownik: S. Giebel

Wykonawcy: W. Fidyk, A. Smagur, I. Mitrus, A. Chwieduk, M. Głowala-Kosińska, P. Borzdziłowska, J. Korfanty, M. Wilkiewicz, M. Krawczyk-Kuliś

W ramach realizacji projektu zebrano materiał od 49 zdrowych dawców szpiku kostnego, co pozwoliło znacząco poszerzyć grupę badaną względem pierwotnie zakładanych 16 dawców. Z powodzeniem przeprowadzono analizę odsetkową subpopulacji limfocytów oraz ocenę stężeń cytokin w materiale badanym. Przeprowadzono również analizę parametrów morfologii zebranych materiałów.

Analiza parametrów morfologii próbek krwi i szpiku kostnego została przeprowadzona na analizatorze hematologicznym Sysmex. Analiza subpopulacji limfocytów metodą cytometrii przepływowej została przeprowadzona na fluorocytometry BD FACS Canto II. Dzięki zaprojektowanemu panelowi przeciwciał monoklonalnych, możliwe było określenie odsetka limfocytów, ogółu limfocytów T, limfocytów T-pomocniczych, limfocytów T-regulatorowych, limfocytów cytotoksycznych, limfocytów B, komórek NK oraz komórek macierzystych CD34+.

Do analizy stężenia cytokin metodą ELISA posłużono się Multidetekcyjnym czytnikiem mikroplątek Tecan Spark. Wykorzystanie zestawów do oznaczania cytokin metodą ELISA umożliwiło określenie stężenia IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TGF- β 1, IFN- γ oraz TNF- α w zebranych materiale. Otrzymane wyniki po zestawieniu z danymi określającymi parametry pobrania materiału przeszczepowego umożliwiły sformułowanie następujących wniosków i obserwacji:

Materiały badane (krew i szpik kostny) różnią się istotnie pod względem wszystkich parametrów białokrwinkowych i większości parametrów czerwokrwninkowych oraz płytkowych.

Krew i szpik kostny zdrowego dawcy szpiku różnią się istotnie pod względem 6 z 9 analizowanych cytokin (IFN- γ , IL-1, IL-4, IL-6, TGF- β 1, TNF- α). Cytokiny te są obecne w szpiku kostnym w większym stężeniu niż we krwi. Brak istotnych różnic stężeń w przypadku IL-2, IL-10, IL-17A.

Materiały badane różnią się istotnie pod względem udziału % części z subpopulacji limfocytów. Istotne różnice dotyczą całkowitego odsetka limfocytów, % limfocytów T (CD3+), limfocytów T-pomocniczych, komórek NK, stosunku CD4+/CD8+ oraz limfocytów B. Wszystkie z badanych populacji były obecne w większym % we krwi niż w szpiku z wyjątkiem limfocytów B, których odsetek był większy w szpiku kostnym.

Analiza statystyczna korelacji pomiędzy subpopulacjami limfocytów, stężeniami cytokin oraz parametrami morfologii wykazała szereg silnych, umiarkowanych i słabych zależności pomiędzy badanymi parametrami w obrębie krwi obwodowej i szpiku kostnego.

Nie wykazano istotnych statystycznie zależności pomiędzy stężeniami analizowanych cytokin we krwi obwodowej oraz szpiku kostnym a ilością hematopoetycznych komórek macierzystych w materiale przeszczepowym.

Wykazano istotne statystycznie korelacje pomiędzy całkowitym odsetkiem limfocytów w tym szczególnie między ogółem limfocytów CD3+ oraz limfocytami T-pomocniczymi a ilością hematopoetycznych komórek macierzystych w materiale przeszczepowym:

- Odsetek ogółu limfocytów we krwi obwodowej i szpiku kostnym wykazuje dodatnią korelację z ilością komórek CD34+/ml pobranego szpiku kostnego, korelacja ta jest silniejsza w szpiku kostnym niż we krwi obwodowej.
- Odsetek limfocytów T (CD3+) we krwi obwodowej i szpiku kostnym wykazuje dodatnią korelację z ilością komórek CD34+/ml pobranego szpiku kostnego, korelacja ta jest silniejsza we krwi obwodowej niż w szpiku kostnym.
- Odsetek limfocytów T-pomocniczych wykazuje dodatnią korelację z ilością komórek CD34+/ml pobranego szpiku kostnego. Korelacja jest obecna na podobnym poziomie we krwi obwodowej i szpiku kostnym.
- Odsetek komórek NK we krwi obwodowej wykazuje ujemną korelację z ilością komórek CD34+/ml pobranego szpiku kostnego.
- Odsetek limfocytów B (CD19+) w szpiku kostnym wykazuje ujemną korelację z ilością komórek CD34+/ml pobranego szpiku kostnego.

Prognozowanie skuteczności poboru krwiotwórczych komórek macierzystych ze szpiku kostnego na podstawie analizy morfologii oraz stężenia cytokin w próbkach krwi obwodowej oraz szpiku kostnego zdrowych dawców nie jest możliwe.

Wydaje się, że na podstawie analizy odsetka ogółu limfocytów T, limfocytów T-pomocniczych oraz komórek NK we krwi obwodowej dawcy szpiku kostnego, możliwe jest prognozowanie ilości hematopoetycznych komórek macierzystych w pobieranym materiale przeszczepowym. Weryfikacja hipotezy wymagałaby przeprowadzenia dalszych badań prospektywnych. Uzyskane wyniki podlegają obecnie dalszej analizie i zestawianiem z większą ilością danych klinicznych. Część wyników projektu została zaprezentowana podczas tegorocznych Gliwickich Spotkań Naukowych w postaci posteru. Po zakończeniu analizy zebranych wyników planuje się przygotowanie publikacji w 2021 roku.

4.1. Składniki proteomu, metabolomu i genomu tkanek i płynów fizjologicznych jako źródło czynników umożliwiających klasyfikację i prognozowanie nowotworów.

Kierownik: P. Widlak

Wykonawcy: P. Widlak, M. Pietrowska, K. Jelonek, M. Gawin, A. Kurczyk, A. Abramowicz, M. Smolarz, L. Ponge, A. Mazurek, E. Małusecka, B. Masarczyk, U. Bojko, A. Krzywoń, K. Składowski, T. Rutkowski, R. Suwiński, M. Gigłok, M. Chekan, D. Lange, E. Chmielik

Zadanie wieloletnie. Najważniejsze wyniki uzyskane w roku 2020.

- 1) Scharakteryzowano zmiany w profilu metabolitów (w tym lipidów) surowicy indukowanych przez różne schematy radioterapii (u pacjentów leczonych z powodu raka głowy i szyi oraz raka prostaty).

- 2) Opracowano i zweryfikowano metodę klasyfikacji (używając materiał tkankowy pochodzący z różnych typów raka tarczycy) wykorzystującą dane z obrazowania molekularnego MALDI-MSI i podejście typu „single-pixel approach”.
- 3) Zweryfikowano przydatność oceny poziomu HPV w osoczu do monitorowania odpowiedzi na leczenie w HPV-zależnym raku gardła środkowego i w raku odbytu.

Uzyskane wyniki opublikowano w następujących pracach.

- Frey B, Mika J, Jelonek K, Cruz-Garcia L, Roelants C, Testard I, Cherradi N, Lumniczky K, Polozov S, Napieralska A, Widlak P, Gaipl US, Badie C, Polanska J, Candéias SM. Systemic modulation of stress and immune parameters in patients treated for prostate adenocarcinoma by intensity-modulated radiation therapy or stereotactic ablative body radiotherapy. *Strahlenther Onkol.* 2020;196(11):1018-1033. doi: 10.1007/s00066-020-01637-5.
- Jelonek K, Krzywón A, Jablonska P, Slominska EM, Smolenski RT, Polanska J, Rutkowski T, Mrochem-Kwarciak J, Składowski K, Widlak P. Systemic effects of radiotherapy and concurrent chemoradiotherapy in head and neck cancer patients-comparison of serum metabolome profiles. *Metabolites* 2020;10:E60. doi: 10.3390/metabo10020060.
- Kurczyk A, Gawin M, Chekan M, Wilk A, Łakomiec K, Mrukwa G, Frątczak K, Polanska J, Fajarewicz K, Pietrowska M, Widlak P. Classification of thyroid tumors based on Mass Spectrometry Imaging of tissue microarrays; a single-pixel approach. *Int J Mol Sci.* 2020;21:E6289. doi: 10.3390/ijms21176289.
- Małusecka E, Chmielik E, Suwiński R, Giglok M, Lange D, Rutkowski T, Mazurek AM. Significance of HPV16 Viral Load Testing in Anal Cancer. *Pathol Oncol Res.* 2020;26(4):2191-2199. doi: 10.1007/s12253-020-00801-7.
- Rutkowski TW, Mazurek AM, Śnietura M, Hejduk B, Jędrzejaska M, Bobek-Billewicz B, d'Amico A, Pięłowski W, Wygoda A, Składowski K, Kołosza Z, Widlak P. Circulating HPV16 DNA may complement imaging assessment of early treatment efficacy in patients with HPV-positive oropharyngeal cancer. *J Transl Med.* 2020;18:167. doi: 10.1186/s12967-020-02330-y.

Zadanie finansowane poprzez: grant NCN 2017/27/B/NZ7/01833, grant NCN 2016/23/B/NZ4/03901, grant NCN 2015/17/B/NZ5/01387, grant NCBiR DZP/TANGO2/380/2016

4.2. Genomiczne i proteomiczne profilowanie nowotworów tarczycy za pomocą badań wielkoskalowych dla oceny różnic między podtypami histologicznymi oraz ich kliniczną agresywnością.

Kierownik: B. Jarzqb

4.2.1. Opracowanie polskiego klasyfikatora molekularnego złośliwości guzów tarczycy.

Wykonawcy: J. Krajewska, M. Oczko-Wojciechowska, M. Halczok, M. Cieślicka, D. Rusinek, T. Tyszkiewicz, J. Żebracka-Gala, A. Pfeifer, A. Kotecka-Blicharz, A. Kukulska, D. Handkiewicz-Junak, Z. Wygoda, A. Król, M. Kalemba, T. Gawlik, T. Olczyk, E. Paliczka-Cieślak, A. Kropińska, A. Ledwon, S. Szpak-Ulczo, B. Michalik, D. Lange, E. Chmielik, E. Zembala-Nożyńska, A. Stanek-Widera, A. Pawlaczek, R. Cyplińska, A. Czarnecka, A. Sacher, K. Hasse-Lazar, K. Steinhof-Radwańska, J. Szasny, M. Zeman, D. Kula, M. Kowalska, A. Chorąży, M. Dedecjus, E. Bakula-Zalewska, E. Kulik, E. Lewandowska-Jabłońska, A. Loba, B. Jarzqb

Opis merytoryczny zadania

Zadanie to jest częścią większego zadania zawartego w projekcie MILESTONE („Nowe narzędzia diagnostyki molekularnej i obrazowania w indywidualizowanej terapii raka piersi, tarczycy i gruczołu krokowego”, (nr umowy o wykonanie i finansowanie projektu: STRATEGMED2/267398/4/NCBR/2015) finansowanego ze środków Narodowego Centrum Badań i Rozwoju w ramach programu „Profilaktyka i leczenie chorób cywilizacyjnych” STRATEGMED).

Wole guzkowe jest częstą chorobą, rozpoznawaną przeważnie ultrasonograficznie. Szacuje się, że w Polsce, gdzie dotyczy ona około 1 miliona osób wykonuje się rocznie około 20 000 operacji tarczycy i rozpoznaje się około 2500 nowych przypadków raka tarczycy (2% wszystkich zachorowań na nowotwory złośliwe). W zdecydowanej większości guzki tarczycy mają charakter łagodny, ryzyko raka waha się w granicach 1-11%, średnio 5%. Podstawową metodę diagnostyczną stanowi biopsja aspiracyjna cienkoigłowa (BAC) pod kontrolą USG, która, jako badanie cytologiczne, pozwala postawić właściwe rozpoznanie w 62-85% przypadków. Szacuje się, że nawet w około 20-30% przypadków biopsja nie pozwala jednoznacznie zróżnicować zmiany łagodnej i złośliwej, jak w przypadku rozpoznania w BAC „zmiany pęcherzykowej bliżej nieokreślonej“, „podejrzenia nowotworu pęcherzykowego“, „nowotworu pęcherzykowego“ lub „podejrzenia złośliwości“. W chwili obecnej chorzy z powyższymi rozpoznaniem są rutynowo kierowani do leczenia operacyjnego, chociaż u większości z nich, w pooperacyjnym badaniu histopatologicznym stwierdza się zmiany łagodne. Jednocześnie, jeżeli w pooperacyjnym badaniu histopatologicznym stwierdza się raka tarczycy, to w przypadku znacznego odsetka chorych, u których pierwotnie nie wykonano całkowitego wycięcia tarczycy konieczna jest operacja wtórna. Dlatego uzupełnienie diagnostyki cytologicznej o badania molekularne w tej grupie chorych jest uzasadnione. Pozwoli to z jednej strony uniknąć leczenia operacyjnego i związanych z nim kosztów obciążających znacząco system opieki zdrowotnej jak i jego potencjalnych powikłań w grupie chorych, w których nie jest ono potrzebne, a z drugiej strony skierować tych chorych do operacji, u których może ona przynieść korzyść oraz zdecydować o zakresie leczenia operacyjnego – pierwotne całkowite wycięcie tarczycy zamiast operacji dwuetapowej.

Uważa się, że w 60-70% przypadków raka tarczycy można zidentyfikować znane zmiany ekspresji genów włączonych w proces karcinogenezy. Dotychczasowe badania potwierdzają korzyści z zastosowania diagnostyki cytologicznej i molekularnej w wątpliwych przypadkach. W 2010 Chudova i wsp. zaproponowali klasyfikator ekspresyjny (*ang. gene expression classifier; GEC*) do przedoperacyjnej diagnostyki guzków tarczycy. Kliniczna użyteczność klasyfikatora ekspresyjnego Afirma, należącego do tzw. testów wykluczających (*ang. rule-out test*) została pozytywnie zwalidowana w licznych niezależnych badaniach (Alexander 2012, Duick

2012, Harrel 2014, McIver 2014). W badaniu opublikowanym przez Alexandra przeanalizowano 265 guzków o „nieokreślonym“ wyniku badania cytologicznego, spośród których u 85 w badaniu pooperacyjnym potwierdzono raka tarczycy. Klasyfikator ekspresyjny właściwie zidentyfikował jako podejrzanę (*ang. suspicious*) 78/85 zmian (czułość 92%, swoistość 52%). Co ważniejsze, negatywna wartość predykcyjna dla „zmiany pęcherzykowej bliżej nieokreślonej“, „podejrzenia nowotworu pęcherzykowego“ lub „nowotworu pęcherzykowego“ i „podejrzenia złośliwości“ wyniosła odpowiednio 95%, 94% i 85%.

W 2015 Nikoforov i wsp. zaproponowali kolejny test molekularny Thyroseq oparty o analizę najczęstszych mutacji metodą sekwencjonowania, którego czułość, swoistość, dodatnia wartość predykcyjna i negatywna wartość predykcyjna w diagnostyce raka tarczycy wynosiła odpowiednio 90,9%, 92,1%, 76,9% i 97,2%. Wszystkie dostępne testy molekularne były tworzone i walidowane w populacji Stanów Zjednoczonych, w której szacuje się wyższe prawdopodobieństwo rozpoznania raka tarczycy w guzku tarczycy w porównaniu do warunków polskich. Fakt ten, wobec wpływu przed testowego prawdopodobieństwa raka tarczycy w populacji na negatywną i pozytywną wartość predykcyjną, ogranicza użycie testów w warunkach polskich.

Na podstawie korzystnych danych wynikających z opublikowanych badań klinicznych najnowsze rekomendacje Amerykańskiego Towarzystwa Tarczycowego, które ukazały się w 2016 roku, odniosły się przyzwalając do przedoperacyjnej diagnostyki molekularnej guzków tarczycy, a klasyfikator ekspresyjny Afirma uzyskał akceptację Amerykańskiej Agencji ds. Żywności i Leków (FDA) i jest refundowany przez amerykańskie towarzystwa ubezpieczeniowe jako element diagnostyki przedoperacyjnej guzków tarczycy, co pozwoliło na istotne ograniczenie liczby chorych kierowanych do operacji i znaczącą redukcję kosztów leczenia. Niestety wysoka cena (Afirma około 3500 \$ za jeden guzek tarczycy) uniemożliwia wprowadzenie tego testu do rutynowej praktyki klinicznej w Polsce.

Cel badania: Ocena diagnostycznej przydatności wieloczynnikowego klasyfikatora molekularnego w rozpoznawaniu ryzyka złośliwości guzków tarczycy na podstawie badania materiału z biopsji cienkoigłowej w porównaniu do standardowej oceny cytologicznej.

Pierwszorzędowy punkt końcowy: poprawa jakości klasyfikacji mierzonej odsetkiem zmian poprawnie zakwalifikowanych jako łagodne lub złośliwe przy wykorzystaniu badania cytologicznego rozszerzonego o wieloparametryczny test molekularny w stosunku do badania cytologicznego samodzielnie o minimum 5 punktów procentowych.

Schemat badania: Badanie zaakceptowane przez Komisję Bioetyczną Instytutu jest przeprowadzone z prospektywną i retrospektywną rekrutacją chorych. W pierwszym etapie (retrospektywna faza badania) planowane jest zdefiniowanie algorytmu klasyfikatora molekularnego. Pierwszy etap badania zakończono w 2017 roku. W prowadzonej obecnie fazie prospektywnej klasyfikacja oparta łącznie o wynik testu molekularnego i cytologicznego zostanie porównana z klasyfikacją opartą wyłącznie o wynik badania cytologicznego u wszystkich chorych, poddanych obu testom równocześnie.

KRYTERIA WŁĄCZENIA:

1. Stwierdzenie zmiany ogniskowej w tarczycy
2. Uzasadnione podejrzenie, że chory będzie wymagał leczenia operacyjnego tarczycy
3. Zgoda chorego na pobranie materiału molekularnego przy biopsji cienkoigłowej tarczycy

KRYTERIA WYKLUCZENIA:

1. Wiek poniżej 18 lat
2. Przeciwwskazania uniemożliwiające leczenie operacyjne
3. Wcześniejsze rozpoznanie raka tarczycy
4. Leczenie przeciwrzepliwie za wyjątkiem ASA lub heparyny drobnocząsteczkowej w dawkach profilaktycznych

Tryb rekrutacji chorych: ośrodki uczestniczące w badaniu włączają kolejnych chorych, którzy wyrażą świadomą zgodę na udział w badaniu i u których na podstawie subiektywnej oceny badacza istnieje uzasadnione prawdopodobieństwo, że po przeprowadzeniu BACC chory będzie poddany leczeniu operacyjnemu. Dotyczy to zarówno chorych, u których wcześniej wykonana BACC dała wynik niejednoznaczny lub podejrzany a także tych, u których kliniczne cechy guzka wskazują na istotne ryzyko złośliwości.

Procedura kliniczna: u każdego chorego przy nakłuciu z pobraniem do badania cytologicznego guzka tarczycy (zwykle 1-2 krotnie) jest pobierany aspirat do badania molekularnego (1-2 krotnie).

Metoda testu: materiał pobrany drogą aspiracji jest zabezpieczany w buforze konserwującym, zamrażany, a następnie w laboratorium centralnym jest wykonywana izolacja RNA, DNA, badanie ekspresji genów i mikro RNA technikami QPCR i mikromacierzy, sekwencjonowanie techniką Sangera i techniką NGS. Na podstawie klinicznych parametrów guzka, danych z badania cytologicznego, danych o ekspresji transkryptów oraz obecności mutacji przeprowadzany jest test molekularny.

Dotychczas w ZMNIEO wykonano 2 862 biopsji molekularnych oraz otrzymano z Ośrodków Zewnętrznych materiał pochodzący z 385 biopsji molekularnych.

W roku 2016 zakończono I etap badania (faza retrospektywna): zgromadzono materiał do zbioru uczącego.

W okresie 2017-2018 r. przeprowadzono ranking próbek zbioru uczącego, wykluczając z analizy próbki, w których jest wysoce prawdopodobne, że biopsja molekularna nie trafiła we właściwą lokalizację lub istnieją wątpliwości, co do lokalizacji guzka w materiale pooperacyjnym. Wykluczono ze zbioru uczącego 11 próbek z rozpoznaniem pooperacyjnym nowotworu wywodzącego się z innych komórek niż komórka pęcherzykowa tarczycy tj. raka rdzeniastego 9 próbek oraz chłoniaka 2 próbki. Ostatecznie zbiór uczący objął 336 próbek, w tym 70 guzków z rozpoznaniem cytologicznym zmiany łagodnej (Bethesda II), 68 guzków z rozpoznaniem cytologicznym zmiany pęcherzykowej bliżej nieokreślonej (Bethesda III), 61 guzków z rozpoznaniem cytologicznym podejrzeniem nowotworu pęcherzykowego (Bethesda IV), 47 guzków z podejrzeniem raka tarczycy (Bethesda V) i 90 guzków z rozpoznaniem cytologicznym raka tarczycy.

Izolacje RNA oraz wykonanie mikromacierzy oligonukleotydowych z powyższych próbek wykonano w 2017 r. Do analizy profilu ekspresji genów zastosowano mikromacierze wysokiej gęstości Human Transcriptome 2.0 (Affymetrix). Na podstawie analizy profilu ekspresji genów wytypowano geny do klasyfikatora molekularnego. Ze względu na wymagania patentowe skład genowy klasyfikatora złożono jako poufny w Dyrekcji Centrum Onkologii-Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddziału w Gliwicach.

Opracowane narzędzie osiągnęło czułość około 96% i swoistość 85%, prawidłowo klasyfikowało guzki tarczycy jako łagodne i złośliwe w 93%.

W latach 2017-2018 zgromadzono prospektywnie materiał do walidacji/ testowania stworzonego klasyfikatora. Wyselekcjonowano w badaniu prospektywnym 605 próbek do walidacji, w tym 174 guzki z rozpoznaniem cytologicznym zmiany łagodnej (Bethesda II), 121 guzków z rozpoznaniem cytologicznym zmiany pęcherzykowej bliżej nieokreślonej (Bethesda III), 126 guzków z rozpoznaniem cytologicznym podejrzenie nowotworu pęcherzykowego (Bethesda IV), 79 guzków z podejrzeniem raka tarczycy (Bethesda V) i 105 guzków z rozpoznaniem cytologicznym raka tarczycy.

W roku 2019 wyizolowano RNA dla wytypowanych próbek ze zbioru walidacyjnego/testowego i wykonano ilościową reakcję PCR dla wytypowanych próbek.

W roku 2020 przeprowadzono analizę kliniczną dokumentacji medycznej pacjentów, od których pobrano materiał z guzków tarczycy w części prospektywnej, celem testowania klasyfikatora molekularnego. W przypadku wola wieloguzkowego prowadzono analizę lokalizacyjną wyników cytologicznych i histologicznych, a w przypadku braku postępowania chirurgicznego analizę przeprowadzonych kontrolnych badań ultrasonograficznych.

Do analizy klinicznej z zebranego prospektywnie materiału włączono 174 próbek z rozpoznaniem cytologicznym Bethesda II, 119 z rozpoznaniem Bethesda III, 126 pacjentów w kategorii Bethesda IV, 76 w kategorii Bethesda V i 104 w kategorii Bethesda VI.

W grupie kategorii cytologicznej Bethesda II zoperowano 10 pacjentów, nie rozpoznając raka tarczycy. W grupie Bethesda III zoperowano 55 pacjentów, rozpoznając w 11 przypadkach raka tarczycy (1 próbka- rak rdzeniasty, 10 próbek- rak pęcherzykowy). W grupie Bethesda IV) zoperowano 85 pacjentów, rozpoznając raka w 17 przypadkach (4 próbki- rak brodawkowy, 7 próbek- rak pęcherzykowy, 3 próbki- rak z komórek Hurlta, 3 próbki - rak niskozróżnicowany). W grupie Bethesda V zoperowano 75 pacjentów, rozpoznając w 63 przypadkach raka tarczycy (61 próbek- rak brodawkowy, 2 próbki- rak rdzeniasty).

W grupie Bethesda VI poddano leczeniu chirurgicznemu wszystkich chorych, potwierdzając raka w 101 przypadkach (99 próbek rak brodawkowy, 1 próbka rak pęcherzykowy, 1 próbka rak niskozróżnicowany).

Po analizie klinicznej przeprowadzono testowanie/walidację stworzonego na podstawie zbioru uczącego klasyfikatora molekularnego.

Ostatecznie do testowania klasyfikatora wykorzystano:

1) 335 próbek z materiału prospektywnie zebranego i analizowanego w 2020 roku

Bethesda II - 42 próbki

Bethesda III - 61 próbki

Bethesda IV - 77 próbek

Bethesda V - 67 próbek

Bethesda VI - 88 próbek

2) 31 próbek z Ośrodków Zewnętrznych

Bethesda III – 2 próbki

Bethesda IV – 14 próbek

Bethesda V – 7 próbek

Bethesda VI – 8 próbek

3) 106 próbek ze zbioru uczącego

Bethesda II – 16 próbek

Bethesda III – 22 próbki

Bethesda IV – 20 próbek

Bethesda V – 24 próbki

Bethesda VI – 24 próbek

Przeprowadzono kliniczną analizę próbek błędnie ocenionych przez klasyfikator, nie stwierdzając błędów merytorycznych oraz błędów mogących wynikać z omyłkowo nadanego charakteru próbce. Dominującą grupę zmian źle klasyfikujących stanowiły zmiany małe, kilkumilimetrowe, gdzie istniało prawdopodobieństwo, iż drugie nakłucie dedykowane dla oceny molekularnej nie trafiło w zmianę (25 próbek). Kolejną grupą źle klasyfikującą się, stanowiły zmiany, które wywodziły się z komórek Huertla lub były guzami pęcherzykowymi o niepewnym potencjale złośliwości, nawet w ocenie histopatologicznej (9 próbek). Ponadto w przypadku 17 próbek nie zidentyfikowano potencjalnej przyczyny złej klasyfikacji, co dotyczyło zmian określanych jako łagodne na podstawie kategorii cytologicznej Bethesda II lub oceny histopatologicznej.

Parametry klasyfikatora Thyropred:

Parametry	Walidacja klasyfikatora z wykorzystaniem zbioru 472 próbek
dokładność (accuracy)	0.862
czułość (sensitivity)	0.760
swoistość (specificity)	0.959
wartość predykcyjna wyniku dodatniego (PPV)	0.946
wartość predykcyjna wyniku ujemnego (NPV)	0.809

Formy prezentacji wyników:

Publikacje:

1. Krajewska J, Kukulska A, Oczko-Wojciechowska M, Kotecka-Blicharz A, Drosik-Rutowicz K, Haras-Gil M, Jarzab B, Handkiewicz-Junak D. Early Diagnosis of Low-Risk Papillary Thyroid Cancer Results Rather in Overtreatment Than a Better Survival. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020 Oct 6;11:571421. doi: 10.3389/fendo.2020.571421.

2. Oczko-Wojciechowska M, Kotecka-Blicharz A, Krajewska J, Rusinek D, Barczyński M, Jarzab B, Czarniecka A. European perspective on the use of molecular tests in the diagnosis and therapy of thyroid neoplasms. *Gland Surg.* 2020 Feb;9(Suppl 2):S69-S76. doi: 10.21037/gs.2019.10.26
3. Rusinek D, Pfeifer A, Cieslicka M, Kowalska M, Pawlaczek A, Krajewska J, Szpak-Ulczoek S, Tyszkiewicz T, Halczok M, Czarniecka A, Zembala-Nozynska E, Chekan M, Lamch R, Handkiewicz-Junak D, Ledwon A, Paliczka-Cieslik E, Kropinska A, Jarzab B, Oczko-Wojciechowska M. TERT Promoter Mutations and Their Impact on Gene Expression Profile in Papillary Thyroid Carcinoma. *Cancers (Basel).* 2020 Jun 17;12(6):1597. doi: 10.3390/cancers12061597.
4. Oczko-Wojciechowska M, Pfeifer A, Jarzab M, Swierniak M, Rusinek D, Tyszkiewicz T, Kowalska M, Chmielik E, Zembala-Nozynska E, Czarniecka A, Jarzab B, Krajewska J. Impact of the Tumor Microenvironment on the Gene Expression Profile in Papillary Thyroid Cancer. *Pathobiology.* 2020;87(2):143-154. doi: 10.1159/000507223
5. Płaczek, A. Płuciennik, A. Kotecka-Blicharz, M. Jarzab and D. Mrozek, "Bayesian Assessment of Diagnostic Strategy for a Thyroid Nodule Involving a Combination of Clinical Synthetic Features and Molecular Data," in *IEEE Access*, vol. 8, pp. 175125-175139, 2020, doi: 10.1109/ACCESS.2020.3026315.

Sposób kontynuacji lub wykorzystania wyników zadania:

- 1) Postępowanie patentowe, w tym przygotowanie wniosków o ochronę własności intelektualnej.
- 2) Kontynuacja badań wdrożenia do praktyki klinicznej w ramach nowo uzyskanego grantu ABM – badanie Thyropred 2-LIMIT.

4.2.2. Wykorzystanie genomycznego i proteomicznego profilowania nowotworów tarczycy za pomocą badań wielkoskalowych (sekwencjonowanie genomowe, proteomika guza) dla oceny różnic między podtypami histologicznymi oraz ich kliniczną agresywnością.

Kierownik: B.Jarzab

Wykonawcy: B. Jarzab J. Krajewska, D. Lange, A. Kukulska, D. Handkiewicz-Junak, A. Kotecka-Blicharz, T. Gawlik, E. Paliczka-Cieślik, A. Syska-Bielak, J. Szcasy, E. Chmielik, E. Zembala-Nożyńska, A. Pawlaczek, R. Cyplińska, M. Halczok, J. Żebracka-Gala, D. Rusinek, D. Kula, T. Tyszkiewicz, M. Oczko-Wojciechowska, T. Olczyk, A. Kropińska, A. Ledwon, A. Sacher, S. Szpak-Ulczoek, A. Pfeifer, M. Cieślicka, A. Kluczevska-Galka, M. Kalinowska-Herok, M. Chekan, K. Samborski, K. Sętowska, A. Blewska, A. Czarniecka

Rokowanie w zróżnicowanych rakach tarczycy jest dobre, 10-letnie przeżycie całkowite w raku brodawkowatym, pęcherzykowym i oksyfilnym wynosi odpowiednio 93%, 85% i 76%. Pomimo to u 3-15% chorych rozpoznaje się raka tarczycy w stadium przerzutów odległych, a w ciągu obserwacji do nawrotu dochodzi u 30% chorych, z czego 2/3 przypadków występuje w ciągu pierwszej dekady od rozpoznania. 79% stanowią wznowy lokoregionalne, a u 21 % chorych stwierdza się przerzuty odległe, głównie w płucach (53-63%) i układzie kostnym (19-20%). U 16-19 % chorych przerzuty charakteryzuje mnogie umiejscowienie.

W przypadku występowania choroby uogólnionej lub nieoperacyjnej wznowy miejscowej leczeniem z wyboru jest terapia jodem promieniotwórczym, możliwa u około 2/3 chorych, która prowadzi do wieloletniej stabilizacji choroby – 10 i 20-letnie przeżycie całkowite w tej grupie wynosi odpowiednio 56% i 40%. Jednak, około 30% chorych jest opornych na leczenie jodem 131. Obecnie przyjęte kryteria oporności na jod promieniotwórczy obejmują brak zdolności gromadzenia 131-I we wszystkich bądź w części ognisk raka, progresję

pomimo jodochwytności oraz brak sanacji po podaniu skumulowanej aktywności 600 mCi ¹³¹I. Ta grupa chorych charakteryzuje się zdecydowanie gorszym rokowaniem – 10 i 15-letnie przeżycie całkowite wynosi odpowiednio zaledwie 10% i 6%. Do niedawna opcje terapeutyczne dla tych chorych były bardzo ograniczone i obejmowały jedynie leczenie paliatywne w nielicznych przypadkach. Nowe możliwości pojawiły się dzięki postępom badań molekularnych i potwierdzeniu roli kinaz tyrozynowych w patogenezie raka tarczycy i udokumentowaniu skuteczności niektórych z nich w leczeniu raka tarczycy.

Cel pracy: Poszukiwanie cech molekularnych, pozwalających na wczesne rozpoznanie postaci zróżnicowanego raka tarczycy charakteryzujących się niekorzystnym rokowaniem, nie odpowiadających na leczenie jodem promieniotwórczym, a tym samym wyselekcjonowanie grupy chorych, którzy wymagają zastosowania bardziej agresywnych metod terapeutycznych w celu poprawy rokowania i przeżycia całkowitego.

Material i metody badawcze

Grupa badana objęła 123 chorych z rozpoznaniem raka brodawkowatego tarczycy, w tym 36 osób, u których stwierdzono przerzuty odległe (M1). Przeprowadzono analizę profilu ekspresji genów w guzie pierwotnym metodą mikromacierzy (zbiór A – U133 a zbiór B – HG 1.0ST) w celu identyfikacji genów związanych z przerzutowaniem i określenia ich funkcji. Uzyskane wyniki poddano walidacji z zastosowaniem qPCR na niezależnej grupie, do której włączono 63 chorych na raka brodawkowatego tarczycy, w tym 9 osób z obecnością przerzutów odległych.

Wyniki

Analiza metodą mikromacierzy na zbiorze A wykazała obecność 11 genów różniących się ekspresją w próbkach guza pierwotnego u chorych wystąpiły przerzuty odległe i chorych, u których nie obserwowano przerzutów. Te wyniki zostały następnie zwalidowane na zbiorze B (analiza metodą mikromacierzy). Wówczas potwierdzono różnice w ekspresji pomiędzy chorymi M1 i chorymi M0 jedynie dla dwóch genów: *IGFBP3* (ang. *insulin-like growth factor binding protein 3*) oraz *ECM1* (ang. *extracellular matrix protein 1*). Jednak walidacja metodą qPCR na niezależnym zbiorze próbek raka brodawkowatego tarczycy nie potwierdziła różnic w profilu ekspresji dla genu *IGFBP3*. Analiza grup genowych wykazała różnice głównie w odniesieniu do genów związanych z odpowiedzią immunologiczną, co może wskazywać na potencjalny wpływ nacieku komórek immunokompetentnych w guzie. Na taką możliwość wskazywały już nasze wcześniejsze badania.

Wniosek

Jeżeli istnieją różnice w profilu ekspresji genów w guzie pierwotnym u chorych na raka brodawkowatego tarczycy z obecnością oraz bez przerzutów odległych to są one niewielkie i mogą zostać ujawnione jedynie w badaniach obejmujących duże grupy chorych.

Zadanie zostało zakończone publikacją (w załączeniu):

Szpak-Ulczo S, Pfeifer A, Rusinek D, Oczko-Wojciechowska M, Kowalska M, Tyszkiewicz T, Cieslicka M, Handkiewicz-Junak D, Fajarszewicz K, Lange D, Chmielik E, Zembala-Nozynska E, Student S, Kotecka-Blicharz A, Kluczevska-Galka A, Jarzab B, Czarniecka A, Jarzab M, Krajewska J. Differences in Gene

4.2.3. Analiza poziomu metylacji DNA komórek raka rdzeniastego tarczycy w kontekście mutacji inicjujących i czynników klinicznych.

Kierownik: M. Oczko-Wojciechowska

Wykonawcy M. Oczko-Wojciechowska, J. Krajewska, J. Żebracka-Gala, M. Cieślicka, A. Czarniecka, E. Chmielik, A. Pawlaczek, R. Cyplińska, A. Pfeifer, D. Rusinek, D. Kula, M. Kowalska, E. Zembala-Nożyńska, T. Gawlik, T. Tyszkiewicz, M. Halczok, A. Kotecka-Blicharz

W pierwszym etapie badania wykonana została analiza poziomu metylacji 60 guzów raka rdzeniastego tarczycy pochodzących od 58 pacjentów. Wykazano, że wyselekcjonowane sondy CpG istotnie różnicują grupy próbek z różnymi mutacjami inicjującymi pod względem poziomu metylacji oraz różnymi wynikami leczenia.

W dalszej kolejności zaplanowano szczegółową analizę różnicujących wysp CpG, które w następnym etapie zostaną przeznaczone do analizy w celu walidacji na niezależnym zbiorze próbek.

Zebrano materiał tkankowy przeznaczony do walidacji wyników uzyskanych metodą mikromacierzy, który w chwili obecnej jest analizowany pod kątem cech klinicznych. Ze względu na zaistniałą sytuację epidemiologiczną oraz zaangażowanie zespołu Zakładu Diagnostyki Genetycznej i Molekularnej w oznaczanie wirusa Sars-Cov2 nie wykonano zaplanowanej szczegółowej analizy wysp CpG.

Z tego względu zaplanowano kontynuację projektu w roku 2021.

Forma prezentacji wyników:

Current status of the prognostic molecular markers in medullary thyroid carcinoma.

Oczko-Wojciechowska M, Czarniecka A, Gawlik T, Jarzab B, Krajewska J. Endocr Connect. 2020 Oct 1:EC-20-0374. doi: 10.1530/EC-20-0374.

4.2.4. Ocena występowania genów fuzyjnych w komórkach guza raka rdzeniastego tarczycy.

Kierownik zadania.M. Oczko-Wojciechowska

Wykonawcy: M. Oczko-Wojciechowska, M. Kowalska, J. Żebracka-Gala, J. Krajewska, M. Cieślicka, A. Czarniecka, E. Chmielik, A. Pawlaczek, R. Cyplińska, A. Pfeifer, D. Rusinek, D. Kula, E. Zembala-Nożyńska, T. Gawlik, T. Tyszkiewicz, A. Zajkiewicz, A. Kotecka-Blicharz

W pierwszym etapie badania wyselekcjonowano grupę 9 próbek tkankowych, w których nie wykryto mutacji somatycznych, mutacji genów *RET* i *RAS*. W chwili obecnej 5 próbek zostało zakwalifikowanych do oceny genów fuzyjnych metodą sekwencjonowania nowej generacji (NGS). Do oceny genów fuzyjnych zastosowano zestaw pozwalający na wykrycie zmian typu fuzja genów najczęściej obserwowanych w tkance tarczycowej. Oceniane będą fuzje dla następujących genów: *AKT1*, *ALK*, *AXL*, *BRAF*, *CCND1*, *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *MET*, *NRG1*, *NTRK1/2/3*, *PPARG*, *RAF1*, *RET*, *ROS1*, *THADA*, *EGFR* jak również mutacje punktowe w genach: *H-N-RAS*, *RET*, *BRAF*.

Analizę wykonano w 48 próbkach tkankowych raka rdzeniastego tarczycy. W 45 próbkach wykryto zmiany w analizowanych genach. Kolejnych 21 próbek jest przeznaczonych do izolacji RNA i oceny fuzji i mutacji metodą NGS. Odczynniki do dalszych badań zostały zakupione.

Zaplanowano kontynuację projektu w roku 2021.

Forma prezentacji wyników:

Current status of the prognostic molecular markers in medullary thyroid carcinoma.

Oczko-Wojciechowska M, Czarniecka A, Gawlik T, Jarzab B, Krajewska J. *Endocr Connect.* 2020 Oct 1:EC-20-0374. doi: 10.1530/EC-20-0374.

4.3. Molekularne i obrazowe rozpoznanie i monitorowanie nowotworów gruczołów wydzielania wewnętrznego oraz innych nowotworów w ocenie efektywności i toksyczności terapii.

Kierownik: B. Jarzab

4.3.1. Występowanie mutacji chorobotwórczych w genach SDHC, SDHA, SDHAF2, TMEM 127, MAX, FH, KIF1B, MDH2, MERTK, MET u pacjentów z guzami chromochłonnymi i przyzwojakami, u których nie wykryto mutacji w zakresie genów vHL, RET, SDHB, SDHD.

Wykonawcy: K. Hasse-Lazar, A. Kotecka-Blicharz, M. Oczko-Wojciechowska, A. Pfeifer, A. Pawlaczek, T. Gawlik, S. Szpak-Ulczoł, J. Krajewska, D. Rusinek, B. Jarzab

Guzy chromochłonne i przyzwojaki są bardzo rzadkimi nowotworami wywodzącymi się z utkania chromochłonnego rdzenia nadnerczy i/lub zwojów autonomicznego układu nerwowego. Uważane są za najsilniej uwarunkowane dziedzicznie guzy u ludzi, a odsetek postaci dziedzicznych sięga 30%. Rozwijają się na tle mutacji germinalnych w jednym z 17 genów predysponujących. Podłoże molekularne prowadzące do ich powstania jest więc bardzo heterogenne. Najlepiej poznane i opisane są mutacje w najwcześniej poznanych genach, uważanych dziś za klasyczne - RET, vHL, SDHB, SDHD oraz NF1, wiodąc do zespołów uwarunkowanych dziedzicznie o dość dobrze poznanym obrazie klinicznym. Guzy chromochłonne/pryzwojaki występują w nich jako jedyny element zespołu lub współwystępują ze zmianami w innych narządach, przede wszystkim z innymi nowotworami. W przypadku później wykrytych genów – takich jak SDHC, SDHA, SDHAF2, TMEM, MAX, FH, KIF1B, MDH2, MERTK, MET dane molekularne oraz obraz fenotypowy mutacji są już znacznie bardziej fragmentaryczne, co wynika ze stosunkowo niskiej częstości ich występowania wśród chorych oraz ze stosunkowo krótkiego okresu gromadzenia danych.

Celem projektu jest analiza częstości występowania zmian germinalnych w wybranych 10 genach - SDHA, SDHC, SDHAF2, TMEM, MAX, FH, KIF1B, MDH2, MERTK, MET u chorych z guzami chromochłonnymi i przyzwojakami.

W trakcie dotychczasowych etapów trwania zadania badawczego (2017 - 2020) oceniono zmiany germinalne w pięciu dotychczasowych genach – SDHC, SDHA, SDHAF2, TMEM 127 i MAX – w grupie 321 chorych z guzami chromochłonnymi/pryzwojakami. Mutacje chorobotwórcze stwierdzono u 30 chorych, co stanowi 9,3% wszystkich badanych. Odpowiednio u 7 chorych z guzem chromochłonnym stwierdzono mutację genu MAX, u 10 chorych z guzem chromochłonnym stwierdzono mutację genu TMEM 127, u 3 chorych z przyzwojakami regionu głowy i szyi stwierdzono mutacje genu SDHC, u 6 chorych stwierdzono mutację genu

SDHA, u dwóch chorych mutację genu FH, u 1 chorego mutację genu SDHAF2, u jednego chorego mutację genu EPAS1.

Praca jest w stadium oczekiwania na wyniki dalszych oznaczeń genów FH, KIF1B, MDH2, MERTK, MET. W oparciu o wyniki badań planowane jest przygotowanie publikacji, mającej na celu ocenę częstości występowania zmian DNA we wszystkich 17 genach predysponujących w grupie 330 chorych z guzami chromochłonny/przywojaki, oceniającej wskazania do wykonywania badań DNA w tej grupie chorych. W oparciu o dane cząstkowe pochodzące z badanej grupy chorych przygotowano dwie publikacje w tym jedna we współpracy międzynarodowej (w załączeniu):

Primary hyperparathyroidism as first manifestation in multiple endocrine neoplasia type 2A: an international multicenter study.

Larsen LV, Mirebeau-Prunier D, Imai T, Alvarez-Escuela C, Hasse-Lazar K, Censi S, Castroneves LA, Sakurai A, Kihara M, Horiuchi K, Barbu VD, Borson-Chazot F, Gimenez-Roqueplo AP, Pigny P, Pinson S, Wohllk N, Eng C, Aydogan BI, Saranath D, Dvorakova S, Castinetti F, Patocs A, Bergant D, Links TP, Peczkowska M, Hoff AO, Mian C, Dwight T, Jarzab B, Neumann HPH, Robledo M, Uchino S, Barlier A, Godballe C, Mathiesen JS. *Endocr Connect.* 2020 Jun;9(6):489-497. doi: 10.1530/EC-20-0163. PMID: 32375120 Free PMC article.

Laparoscopic cortical sparing adrenal surgery in pheochromocytomas associated with hereditary neoplasia syndromes

Hasse-Lazar K, Zeman M, Kotecka-Blicharz A, Legutko M, Czarniecka A, Michalik B, Król A, Szymański P, Pawlaczek A, Oczko-Wojciechowska M, Grajek M, Gawlik T, Handkiewicz-Junak D, Jarzab B. *Endokrynol Pol.* 2020 Oct 30. doi: 10.5603/EP.a2020.0075. Online ahead of print. PMID: 33125693 Free article.

4.3.2. Jakość resekcji przy użyciu techniki ROLL w zależności od cech ultrasonograficznych zmiany.

Wykonawcy: M. Kalemba, Z. Wygoda, G. Woźniak, E. Stobiecka, A. Czarniecka

Wstęp

Badanie ROLL (ang. radionuclid occult lesion localisation) polega na podaniu izotopu połączonego z białkiem o wysokiej masie cząsteczkowej, do zmiany o charakterze wznowy lub przerzutu uwidocznionej w badaniu USG i potwierdzonej w badaniu biopsji cienkoigłowej. Przeprowadzane ROLL w przypadkach zmian uwidocznionych w badaniu USG pozwala na poprawę skuteczności interwencji chirurgicznej. Ocena ryzyka niepowodzenia leczenia operacyjnego przy pomocy tej techniki, może pozwolić na lepsze zaplanowanie zabiegu u pacjentów z trudno dostępnymi zmianami.

Materiał i Metodyka

Analizie cząstkowej poddano pacjentów u których wykonano zabieg operacyjny w technice ROLL od 01.2020-08.2020.

Wiek pacjentów wahał się od 27 lat do 80 lat, mediana 50 lat.

Skuteczność zabiegu operacyjnego oceniano na podstawie wyniku HP pooperacyjnego.

Usunięcie skuteczne pozwalało na identyfikację w materiale pooperacyjnym utkania nowotworu.

Stwierdzono następujące cechy:

- zmiana lita w badaniu USG – 35 pacjentów
- zmiana torbielowata w badaniu USG – 7 pacjentów
- zmiana węzłowa w badaniu USG – 8 pacjentów
- znacznik podany do zmiany – 26 pacjentów
- znacznik podany w okolicę zmiany – 24 pacjentów

Wyniki

Zmianę usunięto skutecznie u 47 badanych pacjentów.

Zmiany nie udało się skutecznie usunąć u 3 badanych pacjentów.

Wszystkie 3 nieskuteczne interwencje w technice ROLL dotyczyły przypadków zmian litych w badaniu USG, gdzie znacznik izotopowy został podany przez medyka nuklearnego do zmiany.

Wnioski

W kolejnym roku badania, planujemy poszerzyć ilość badanych cech USG (wielkość, lokalizacja, unaczynienie) oraz odpowiednio zwiększyć grupę badaną, następnie przeprowadzić analizę statystyczną materiału.

4.3.3. Raki endokrynne - analiza podłoża genetycznego i fenotypu nowotworów złośliwych gruczołów dokrewnych. Próba standaryzacji postępowania diagnostycznego i terapeutycznego.

Wykonawcy: B. Jurecka-Lubieniecka, P. Soczomski, K. Stępiński, A. Ledwon, A. Król, E. Paliczka-Cieślik, A. Kotecka-Blicharz, K. Hasse-Lazar, E. Zembala-Nożyńska, E. Chmielik, P. Majka, B. Michalik, M. Oczko-Wojciechowska

Guzy neuroendokrynne trzustki (PNET) to rzadki typ nowotworu, stanowiący około 1-2% wszystkich nowotworów trzustki. Zgodnie z ostatnimi doniesieniami częstość występowania PNET systematycznie rośnie, a ostatnio guzy neuroendokrynne jako całość przestały spełniać kryteria choroby rzadkiej. Mimo łagodniejszego przebiegu choroby niż w przypadku gruczolakoraka trzustki, PNET cechują się krótszym oczekiwanym czasem przeżycia i najgorszą medianą przeżycia wśród NET.

U około 10% pacjentów z PNET choroba rozwija się na podłożu zespołu genetycznego takiego jak: Zespół Mnogich Nowotworów Gruczołów Dokrewnych typu 1 (MEN1), zespół Von-Hippel-Lindau (VHL), zespół Nerwiakowłókniakowości typu 1 (NF1) i Stwardnienie Guzowate (TSC). Przebieg kliniczny PNET w ramach tych zespołów wydaje się odbiegać od opisanego dla sporadycznych guzów neuroendokrynnych trzustki. Niestety opisywane różnice były do tej pory oceniane bezpośrednio na małych grupach pacjentów, a w przypadku porównań grup pacjentów z różnych prac można obawiać się znacznego wpływu różnic metodologicznych np. w sposobie rozpoznania choroby. W związku z tym oraz rzadkością choroby, narosło wiele kontrowersji odnośnie leczenia i follow-upu pacjentów z PNET uwarunkowanych rodzinnie.

Z uwagi na najwyższą referencyjność oraz charakter ośrodka, posiadamy duże doświadczenie w opiece nad pacjentami z guzami neuroendokrynnymi i rzadkimi zespołami genetycznymi. Nasze doświadczenia zaowocowały publikacją dotyczącą polskiej populacji pacjentów z zespołem MEN1, która m.in. wykazała różnice dotyczące PNET, w porównaniu z dotychczas opisywanymi grupami.

Ze względu na opisywane kontrowersje i stwierdzone różnice postanowiliśmy ocenić różnice w przebiegu klinicznym PNET uwarunkowanych dziedzicznie oraz sporadycznie oraz ustalić czynniki prognostycz-

ne dla obu tych grup pacjentów. Ponadto podjęliśmy próbę stwierdzenia korelacji genotypu i fenotypu u pacjentów z PNE uwarunkowanym genetycznie. W tym projekcie oprócz pracowników ZMNIEO wzięły udział:

- Oddział Chorób Wewnętrznych i Endokrynologii, Uniwersytet Medyczny w Warszawie - opisanie przebiegu choroby u pacjentów znajdujących się pod opieką ośrodka
- Pracownia Diagnostyki Molekularnej i Genomiki Funkcjonalnej, NIO Gliwice - ocena występowania mutacji
- Dział Analiz Biostatystyczno-Bioinformatycznych, NIO Gliwice - analiza statystyczna wyników.

W toku naszej pracy włączono do oceny grupę 63 pacjentów z PNET uwarunkowanych dziedzicznie (w tym 58 z zespołem MEN1 i 5 z zespołem VHL) oraz 145 pacjentów ze sporadycznym PNET. W przebiegu klinicznym ocenialiśmy takie zmienne jak m.in. wiek, płeć, czas obserwacji, wiek w momencie rozpoznania, cechy morfologiczne i histologiczne guza, obecność przerzutów, zastosowane leczenie. U pacjentów z zespołami uwarunkowanymi genetycznie ocenialiśmy typ mutacji oraz zajęty fragment genu.

W rezultacie potwierdziliśmy niektóre z opisywanych wcześniej różnic, jak i stwierdziliśmy nowe różnice w przebiegu klinicznym PNET w zależności od posiadania lub nie mutacji germinalnej. Pacjenci z grupy uwarunkowanej rodzinie byli diagnozowani wcześniej, mieli mniejsze i częściej wieloogniskowe guzy, a sama choroba była mniej zaawansowana i związana z dłuższym przeżyciem. Wśród czynników ryzyka gorszego przeżycia stwierdzono wiek diagnozy, płeć, grade, stage, rozmiar guza, obecność i lokalizację przerzutów, rodzaj leczenia oraz choroby współistniejące. Niestety stosunkowo mało liczna grupa pacjentów z PNET uwarunkowanych genetycznie nie pozwoliła wysunąć silnych wniosków odnośnie korelacji genotypu i fenotypu, podobnie jak w pozostałych dotychczas opisywanych grupach.

Nasza praca dostarcza nowych informacji odnośnie różnic między pacjentami z PNET uwarunkowanymi rodzinie i sporadycznie oraz proponuje czynniki prognostyczne, które powinny być wzięte pod uwagę podczas decyzji terapeutycznych u tych pacjentów.

Uzyskane wyniki są po analizie statystycznej, przygotowywane do druku.

4.4. Doskonalenie systemów klasyfikacji i oceny zaawansowania nowotworów w oparciu o wskaźniki molekularne i obrazowe.

Kierownik: A. d'Amico

4.4.1. Analiza radiomiczna nowotworów głowy i szyi na podstawie obrazów PET-TK.

Wykonawcy: I. Gorczewska, D. Borys, P. Bzowski, K. Składowski, T. Rutkowski, O. Chrabański, A. Florczak, M. Turcka-d'Amico, M. Di Pietro, B. Bobek-Billewicz, A. Wygoda, K. Dębiec, D. Książniak-Baran, U. Dworzeczka, D. Leś

U 43 pacjentów z nowotworami gardła wykonano perspektywicznie badania PET-CT przed rozpoczęciem chemioterapii lub radioterapii. Na podstawie danych klinicznych i radiologicznych zidentyfikowano 9 pacjentów, u których pojawił się nawrót choroby w ciągu roku po zakończeniu leczenia. U wszystkich chorych zbadano cechy radiomiczne guza pierwotnego w obrazie PET-CT. Wyliczono 100 cech radiomicznych, z czego w przypadku 8 cech zaobserwowano zależność z dalszym przebiegiem choroby, a tym samym zależność z odpowiedzią na zastosowane leczenie (test Manna-Whitney'a; $p < 0,01$). W kolejnym etapie stworzono kla-

syfikator metodą losowego lasu decyzyjnego, który osiągał poziom dokładności 74% w przewidywaniu odpowiedzi pacjenta na leczenie. Praca aktualnie jest w trakcie redakcji. Planowane jest wysłanie pracy do czasopisma o IF pomiędzy 3 i 4.

4.5. Charakterystyka molekularna i immunochemiczna rzadkich nowotworów tarczycy o niepewnym potencjale złośliwości.

Kierownik: E. Chmielik w zastępstwie za D. Lange

4.5.1. Hyalinizing Trabecular Tumor. Guz bełczkowy szkliwiejący. Ustalenie profilu molekularnego.

Wykonawcy: A. Stanek-Widera, M. Biskup-Frużyńska, E. Zembala-Nożyńska, M. Chekan. D. Lange

Materiał stanowi 34 guzów tarczycy - HTT. Wykonano barwienia immunohistochemiczne: Ki67, CK19, CD56, Galectin-3, HBME, synaptofizyna, chromogranina, p53. Wykonano próby licznych rozcieńczeń przeciwciała przeciwko Ki67, z którym reakcja błonowa jest bardzo charakterystyczna dla HTT: od 1:50 do 1:300, uznając za najlepsze rozcieńczenie 1:100. Zostało ono wprowadzone w ZPN NIO-PIB, Oddział w Gliwicach jako standard w ocenie zmian podejrzanych o HTT.

Materiał zostanie przebadany za pomocą spektroskopii Ramana w celu ustalenia budowy chemicznej HTT. Wybrano materiał kontrolny: preparaty z normalnym utkaniem tarczycy, gruczolakami pęcherzykowymi oraz rakami brodawkowatymi.

Pierwotnie zakładano, że materiał zostanie poddany badaniu techniką masywnego równoległego sekwencjonowania (next generation sequencing - NGS) w celu znalezienia szeregu występujących mutacji, jednak ze względu na ograniczenia finansowe i konieczność poszukiwania źródła finansowania prawdopodobnie bardziej zasadne będzie wykorzystanie celowanego sekwencjonowania, które jest metodą tańszą.

W przypadku uzyskania finansowania i wykonania badań sekwencjonowania uzyskane wyniki będą przedmiotem publikacji.

4.6. Zbadanie przydatności nowych kryteriów histopatologicznej klasyfikacji raka prostaty (grade groups) w przypadkach po leczeniu skojarzonym

Kierownik: E. Chmielik w zastępstwie za D. Lange

4.6.1. Diagnostyczne i prognostyczne znaczenie oceny wznowy raka prostaty po radioterapii w świetle nowej klasyfikacji WHO z 2016 r.

Wykonawcy: A. Stanek-Widera, W. Majewski, T. Krzysztofiak, B. Itrych, M. Biskup-Frużyńska, M. Środa, M. Oczko-Wojciechowska, M. Jarząb, D. Lange

Powtórnie oceniono 139 przypadków raka gruczołu krokowego o zróżnicowaniu raka wg Gleasona 3+4 i 4+3 (2 i 3 grupa prognostyczna wg ISUP). Łącznie u 96 chorych co stanowi 69%, podwyższono stopień Gleasona z 7 do wyższych (grupa prognostyczna 4 i 5).

Odsetek 5-letnich wyleczeń biochemicznych wyniósł łącznie w całej grupie 89%. Wyleczenia biochemiczne nie różniły się pomiędzy grupą 3+4 oraz 4+3. Spośród analizowanych czynników histo-patologicznych, ze wznową biochemiczną wiązał się stopień zróżnicowania raka wg Gleason'a oraz obecność struktur sitowatych.

Odsetek 5-letnich wyleczeń biochemicznych wyniósł 100% w rakach Gleason $\leq 4+3$ i 84% w rakach o zróżnicowaniu Gleason $\geq 4+4$ ($p=0,011$). Odsetek 5-letnich wyleczeń biochemicznych wyniósł 94% jeżeli nie obserwowano struktur sitowatych oraz 83% w przypadku ich obecności ($p=0,05$).

W oparciu o uzyskane wyniki planowano dalszą ocenę genetyczną w następujących podgrupach chorych:

- Chorzy ze wznową biochemiczną
- Chorzy ze strukturami sitowatymi
- Pozostali chorzy

Po przekazaniu 36 preparatów do pierwszej analizy genetycznej uzyskano informację, że we wszystkich próbkach materiał jest zbyt skąpy do przeprowadzenia takich badań. Oznacza to, że materiał biopsyjny, w którym zazwyczaj rak obecny jest w kilku tylko wycinkach i niejednokrotnie zajmuje ich niewielki obszar nie pozwala na przeprowadzenie takich analiz.

Wyniki badań własnych zostały opracowane w formie:

1) doniesień zjazdowych:

- Majewski W. Co dla radioterapii raka gruczołu krokowego oznacza raport histopatologiczny? VII Konferencja Polskiego Towarzystwa Brachyterapii, Katowice 15.09-17.09.2020 (prez. ustna)

- Majewski W, Lange D, Stanek-Widera A, Itrych B, Krzysztofiak T, Jarząb M, Oczko-Wojciechowska M, Tarnawski R. Znaczenie czynników histo-patologicznych u chorych na raka gruczołu krokowego poddanych radykalnej radioterapii. Wysłane na V Kongres Onkologii Polskiej, Wrocław 20-23.10.2021 (Kongres przełożony o rok z powodu COVID-19)

- manuskryptu rozprawy doktorskiej dr. n. med. Bartosza Itrycha

„Ocena porównawcza wyników leczenia chorych z rozpoznaniem raka gruczołu krokowego w zależności od stopnia zróżnicowania w skali Gleasona: 3+ 4 w porównaniu do 4+3”. Stopień nadany przez Radę Naukową Narodowego Instytutu Onkologii dn. 12.06.2019

Wyniki po ostatecznym opracowaniu będą przedmiotem publikacji.

4.7. Wielodyscyplinarna charakterystyka złośliwych nowotworów tkanek miękkich regionu głowy i szyi.

Kierownik: E. Chmielik w zastępstwie za D. Lange

4.7.1. Korelacja patologiczno-radiologiczna złośliwych nowotworów tkanek miękkich regionu głowy i szyi z uwzględnieniem technik immunohistochemicznych i molekularnych.

Wykonawcy: E. Chmielik, P.J. Paul, J. Simek, B. Nikiel, R. Lamch, B. Hejduk, A. d' Amico, B. Bobek-Billewicz, C. Szymczyk, A. Maciejewski, M. Kentnowski, T. Rutkowski, B. Pilecki, K. Składowski

Przejrzano materiał histopatologiczny pacjentów operowanych w NIO-PIB Oddział w Gliwicach pod kątem występowania złośliwych nowotworów tkanek miękkich rejonu głowy i szyi. Dokonano zgromadzenia do-

kumentacji obrazów makroskopowych operowanych zmian. Dokonano zakupu sond potrzebnych do potwierdzenia rozpoznania w świetle najnowszej klasyfikacji WHO guzów tkanek miękkich z 2020 roku.

Zgromadzono materiał złożony z 6 chorych z następującymi nowotworami:

1. angiosarcoma high grade, guzy pierwotne, 2 pacjentów w lokalizacji:

-skóra czoła, kobieta lat 85

-skóra nosa, mężczyzna lat 83

2. pleomorphic dermal sarcoma, wznowa

- skóra okolicy ciemieniowej, mężczyzna lat 85

3. dermatofibrosarcoma protuberans, wznowa

- okolica ślinianki przyusznej prawej, kobieta lat 58

4. Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor (MPNST), wznowa

- guz oczodołu lewego, mężczyzna lat 72.

W guzie typu dermatofibrosarcoma protuberans badaniem FISH potwierdzono obecność rearanżacji COL1A1/PDGF Beta w 37% komórek.

Ponadto 2 przypadki wcześniej sklasyfikowane, jako mięsaki tkanek miękkich okazały się wrzecionowatymi rakami po uzupełniających badaniach immunohistochemicznych we wznowach.

Materiał guzów nawracających został porównany z guzami pierwotnymi.

Przeanalizowano diagnostykę różnicową immunohistochemiczną, jaka toczyła się przy guzach pierwotnych i kolejnych wznowach.

Przegląd materiału z całego roku wykazał, iż analizowane guzy są wyjątkowo rzadkimi nowotworami złośliwymi tkanek miękkich rejonu głowy i szyi, rzadszymi niż to pierwotnie zakładano. Należy także wziąć pod uwagę sytuację epidemiologiczną i odroczenie niektórych skomplikowanych operacji z tych lokalizacji.

W związku z tym w kolejnych latach zbiorów przypadków będzie kontynuowany, ale też zostanie uzupełniony o materiał retrospektywny. Dane kliniczne i z diagnostyki obrazowej zostaną zgromadzone i przeanalizowane w korelacji z obrazami makroskopowymi i mikroskopowymi.

4.8. Obrazowanie sodowe rezonansu magnetycznego (23Na MRI) w obszarze mózgowia.

Kierownik B. Bobek-Billewicz

4.8.1. Obrazowanie sodowe rezonansu magnetycznego (23Na MRI) w obszarze mózgowia u zdrowych ochotników.

4.8.2. Obrazowanie sodowe rezonansu magnetycznego (23Na MRI) w obszarze mózgowia u chorych z SM.

Wykonawcy: B. Bobek- Billewicz¹, A. Hebda¹, P. Wawrzyniak¹, P. Mazgaj¹, M. Holecki², J. Duława², A. Laśsek-Bal², P. Radecka²

1. Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowy Instytut Badawczy Oddział w Gliwicach

2. Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach, Klinika Chorób Wewnętrznych i Metabolicznych Katedry Chorób Wewnętrznych

W minionym roku przeprowadzono 15 badań pacjentów ze stwardnieniem rozsianym (SM) oraz zdrowych ochotników. Zbieranie grupy badawczej zostało przerwane przez pandemię COVID-19 (ochotnicy oraz pacjenci nie chcieli się narażać). W związku z powyższym nie uzyskano całej grupy zaplanowanej do analizy. Dane, które uzyskano zostały przetworzone do postaci map koncentracji sodu w mózgowiu, czyli do postaci potrzebnej do analizy. Obecnie trwają rozmowy nad wznowieniem napływu zarówno zdrowych ochotników jak i pacjentów. Jeżeli nie uda się wznowić zbierania danych, uzyskana część zostanie przeanalizowana i otrzymane rezultaty opublikowane.

4.9 Nowe narzędzia diagnostyki molekularnej i obrazowania w indywidualizowanej terapii raka piersi, gruczolu krokowego i nowotworów OUN.

Kierownik: R. Tarnawski

4.9.1. Analiza lokalizacji przerzutów raka piersi w obrębie OUN pod kątem jej związku z biologicznym podtypem raka, czasem do rozsiewu, rokowaniem i wynikami leczenia.

Wykonawcy: K. Widera, E. Nowicka, M. Jarzqb, D. Gabryś, Ł. Zarudzki, G. Stasik-Pres, B. Bobek-Billewicz, R. Tarnawski, D. Larysz

Celem zadania jest analiza lokalizacji przerzutów w obrębie mózgowia z histoklinicznymi cechami prognostyczno-predykcyjnymi raka piersi, w tym biologicznymi podtypami nowotworu. Biorąc pod uwagę rosnące znaczenie wielodyscyplinarnego podejmowania decyzji o leczeniu operacyjnym lub radioterapii stereotaktycznej w tej grupie chorych, a malejącą rolę technik obejmujących całe mózgowie, rozumienie wpływu lokalizacji guza jest konieczne nie tylko z punktu widzenia techniki chirurgicznej (dobrze rozwinięte), ale również powiązania z profilem klinicznym chorych na raka piersi i technikami napromieniania (mniej analiz w tym zakresie). W ramach kontynuacji realizacji zadania badawczego dokonano retrospektywnej analizy dokumentacji medycznej 473 pacjentek leczonych promieniami w NIO z rozsiewem do mózgowia z powodu raka piersi w latach 2005-2017, w toku jest analiza danych chorych leczonych w latach 2018. Uzupełnienie bazy jest konieczne ze względu na to, że w historycznych danych brak pełnych informacji dotyczących podtypów biologicznych raka piersi oraz brak wykonanych badań MR u wszystkich chorych - 236 os.(49,9%) lub brak oryginalnych opisów badań wykonanych poza NIO.

W dotychczas zweryfikowanym materiale mediana wieku pacjentek w czasie rozpoznania przerzutów do mózgu wynosiła 56 lat (27-87 lat). Większość z nich (63,6%) była w stanie ogólnym dobrym (ZUBROD 0-1). U 160 chorych (33,8,%) przerzuty do mózgu były pierwszą lokalizacją rozsiewu choroby. U 354 pacjentek (74,8%) przerzuty do OUN nie były jedynym miejscem aktywnej choroby, u 132 chorych (27,9%) stwierdzono 1 zmianę przerzutową do OUN, u 65 (13,7%) – 2, u 33 os. (6,9%) - 3 przerzuty, natomiast u 243 (51,3%) mnogie zmiany. Zmiany przerzutowe były zlokalizowane nadnamiotowo u 189 chorych (39,9%), u 61 (12,9%) podnamiotowo, a u 223 (47,1%) zarówno nad- jak i podnamiotowo. Wszystkie chore zostały poddane radioterapii, 88,6 % z nich napromieniono techniką WBRT, 15,6% chorych operowano, u 35,9% zastosowano radioterapię stereotaktyczną. W skojarzeniu z leczeniem operacyjnym u chorych stosowano:WBRT-29 os. (6,1%), SRS-6 os. (1,3%), WBRT wraz z SRS-39 os. (8,2%). Samodzielną SRS przeprowadzono u 48 os. (10%), samodzielne WBRT u 274 os. (57,9%), a WBRT w skojarzeniu z SRS u 77 os. (16,2%). U 224 pacjentek (47,3%) zastosowano leczenie systemowe (chemioterapię samodzielną lub z immunoterapią lub hor-

monoterapię) po rozpoznaniu przerzutów do OUN. U 432 (91,2%) pacjentek ustalono fenotyp guza pierwotnego, w tym luminalny - 151 os. (31,9%), HER2-dodatni 138 os. (29,1%), TNBC - 110 chorych (23,25%). A szczegółowo udało się ustalić podtyp biologiczny u 306 os. (64,6%) tj. luminal A- 14 os. (3%), luminal B HER 2(-) – 43 os. (9%), luminal B HER2(+) – 56 os. (11,8%), nieluminalny HER 2 (+)-83 os. (17,5%), TNBC – 110 os. (23,3%).

U pozostałych chorych nie udało się ustalić pełnego fenotypu ze względu na brak pełnego oznaczenia receptorów, trwa analiza możliwości wykonania badań dodatkowych. U 373 chorych (78,9%) udało się ocenić wyjściowy stopień zaawansowania choroby: IA - 22 os. (4,7%), IIA - 80 os. (16,9%), II B – 46 os. (9,7%), IIIA – 57 os. (12,1%), IIIB – 66 os. (13,9%), IIIC – 21 os. (4,4%), IV - 81 os. (17,1%).

Analizy rozmieszczenia przerzutów do OUN dokonano na podstawie opisów badań radiologicznych (MR,TK). W toku dokładna ocena lokalizacji dostępnych obrazów MR w sekwencji T1 po kontraście na podstawie szczegółowej re-analizy tych badań przez zespół badawczy.

Na podstawie oceny opisów badań radiologicznych rozmieszczenie przerzutów ustalono na: półkule mózgowe - 387 chorych (81,8%), tylna jama czaszki - 262 chorych (55,4%), obszar środkowy - 152 chorych (32,1%). Lokalizacja przerzutów w obrębie półkul mózgu dotyczyła: płata czołowego - 286 chorych (60,4%), płata ciemieniowego - 235 chorych (49,7%), płata skroniowego - 224 chorych (47,4%), płata potylicznego - 201 chorych (42,5%).

Zebrano na podstawie planów leczenia dawki radioterapii konwencjonalnej oraz stereotaktycznej, które zostały podane zarówno na obszary tarczowe jak i narządy krytyczne. Analiza dawek i ich skuteczności w toku. Trwa również zbieranie danych dotyczące przeżycia chorych.

Zadanie będzie kontynuowane w 2021 r., planowana publikacja wyników dotyczących przeprowadzonej szczegółowej analizy lokalizacji przerzutów raka piersi w obrębie OUN pod kątem jej związku z podtypami biologicznymi, rokowaniem chorych i wynikami leczenia. W planie realizacji zadania jest również publikacja wyników oraz rozprawa doktorska lek. K. Widery.

4.10. Wykorzystanie badań MR i PET, genomiki guza i nowych markerów surowiczych dla poprawy indeksu terapeutycznego systemowego i miejscowego leczenia raka piersi – opis zbiorczy zadań nr od 4.10.1 do 4.10.4 oraz zad. nr 6,3, 6,4, 6,5 i 7.1

Kierownik: M. Jarzqb

4.10.1. Opracowanie i wdrożenie klasyfikatora molekularnego podtypu raka piersi do wykorzystania w ocenie fenotypu nowotworu przed chemioterapią neoadjuwantową.

Wykonawcy: A. Polakiewicz-Gilowska, M. Jarzqb, M. Kowalska, T. Tyszkiewicz, E. Chmielik, E. Stobiecka, M. Cieślicka, J. Rembak-Szynkiewicz, A. Dyla, A. Czarniecka, M. Kaźmierczak-Maciejewska, M. Dobrut, M. Halczok, J. Żebracka-Gala, A. Pawlaczek, R. Cyplińska, A. Pfeifer, M. Oczko-Wojciechowska, A. Kuś, B. Łanoszka

4.10.2. Optymalizacja wykorzystania badania MRI piersi w skryningu chorych najwyższego ryzyka.

Wykonawcy: A. Badora-Rybicka, B. Grandys, K. Donocik, A. Syska-Bielak, K. Chomik, P. Malec, B. Bobek-Billewicz

4.10.3. Ocena zaawansowania raka piersi w obrębie regionalnych węzłów chłonnych – znaczenie wykorzystania badań obrazowych.

Wykonawcy: M. Kubeczko, D. Gabryś, M. Jarzqb, A. d'Amico, M. di Pietro, O. Chrabański, D. Borys, R. Ulczok, M. Kalemba, M. Raus

4.10.4. Skąpoprzerezutowa (oligometastatyczna) postać raka piersi – występowanie u chorych diagnozowanych z wykorzystaniem badania PET/TK i próbna ocena rokowania w perspektywie średnioterminowej.

Wykonawcy: A. Polakiewicz-Gilowska, A. Leśniak, K. Świdowska, B. Łanoszka, W. Bal, E. Nowicka, G. Woźniak

6.3. Przewidywanie odpowiedzi na chemioterapię na podstawie badania PET/TK pod kątem możliwości de-eskalacji leczenia raka piersi.

Wykonawcy: M. Jarzqb, A. Leśniak, A. Badora-Rybicka, M. Kubeczko, A. d'Amico, B. Bobek-Billewicz

6.4. Ocena wczesnych i odległych parametrów wskazujących na ryzyko kardiotoxyczności chemioterapii przedoperacyjnej w kontekście gęstości dawki i sekwencji leczenia raka piersi.

Wykonawcy: K. Byrczek-Godula, K. Świdowska, A. Badora-Rybicka, M. Jarzqb

6.5. Wolometryczna i teksturalna ocena regresji guza pierwotnego w trakcie chemioterapii przedoperacyjnej – ocena na podstawie badań MRI i PET/TK.

Wykonawcy: M. Stankiewicz, M. Jarzqb, M. Kaszuba, M. Mianowska-Malec, P. Malec, K. Krysiak, B. Lange, E. Nowicka, K. Widera, K. Trela-Janus, R. Szumniak, B. Bobek-Billewicz

7.1. Analiza parametrów gospodarki hormonalnej chorych leczonych z powodu raka piersi w kontekście stanu menopauzalnego.

Wykonawcy: M. Mianowska-Malec, M. Kubeczko, A. Łuczak, A. Michalik, A. Pasierbek, J. Mrochem-Kwarciaak

Realizację zadań prowadzono w ramach projektu badawczego Narodowego Centrum Badań i Rozwoju (lider: NIO, Oddział w Gliwicach, STRATEGMED2/267398/4/ NCBR/2015). Opracowywane w ramach projektu genomyczne narzędzie do klasyfikacji raka piersi dostosowane jest pierwotnie do testowania na podstawie materiału z biopsji gruboigłowej (rozwiązanie specyficznie kierowane na mały materiał biopsyjny), wykorzystuje analizę w dwóch lub więcej wycinkach pobranych z jednego guza. Opracowany został w oparciu o grupę chorych poddanych chemioterapii przedoperacyjnej z wnikliwym monitorowaniem efektu w zaawansowanych badaniach obrazowych i badaniach histopatologicznych, która została szeroko scharakteryzowana pod kątem czynników histoklinicznych i rokowania. Łącznie, zgromadzono część zbioru uczącego liczącą około 1100 biopsji gruboigłowych z zabezpieczeniem materiału na badania molekularne od 380 chorych leczonych przedoperacyjną chemioterapią i w trakcie trwania projektu zbiór uczący rozszerzono do łącznej liczby 1580 biopsji od 530 chorych z rozpoznaniem raka piersi. Łącznie, w próbkach zbioru uczącego wykonano 242 badania mikromacierzowe w materiale od 80 chorych z różnymi podtypami raka piersi (trzy wycinki z biopsji na chorego). Na podstawie tego zbioru opracowano nowy alternatywny do opatentowanych zestaw genów różnicujących podtypy raka piersi. Bazując na wynikach analizy porównawczej doboru różnych metod klasyfikacji danych wieloklasowych raka piersi zbudowano ostateczny model klasyfikatora danych nowotworów piersi, a wyniki te poddano walidacji metodą QPCR, uzyskując jakość klasyfikacji powyżej 80%. Pokazano, iż standardowe markery proliferacji (w tym MKI67 i inne transkrypty bezpośrednio powiązane z mechanizmami proliferacji komórek raka piersi, np. CDK1) nie są wystarczające, by zwiększyć wydolność rutynowo

wykorzystywanych wskaźników immunohistochemicznych. Stąd, podjęto próby poszukiwania optymalnego zwiększenia klasyfikatora.

W pierwszym etapie rozszerzanie klasyfikatora prowadzono w grupie 93 chorych, kobiet, średni wiek 42,2 roku, w tym 32% chorych o zaawansowaniu guza T1-T2, 49% T3 i 13% T4, 27% chorych bez przerzutów węzłowych (N0) i 73% chorych z przerzutami (27% N1, 16% N2, 15% N3). Chore przed chemioterapią przedoperacyjną miały pobierany drogą biopsji gruboigłowej materiał do badań molekularnych (przy okazji rutynowego pobrania do badań HP, po wyrażeniu świadomej zgody). Większość chorych (86%) otrzymywała chemioterapię opartą o antracykliny i taksany. Spośród 82 z odpowiedzią wystarczającą do leczenia operacyjnego, 20 chorych (24%) wykazywało cechy całkowitej odpowiedzi w pooperacyjnym badaniu HP (pCR). U 42% stwierdzono nowotwór luminalny HER2-ujemny, u 20% luminalny HER2-dodatni, u 9% HER2-dodatni Nieluminalny, a u 29% nowotwór o fenotypie potrójnie ujemnym. W poszukiwaniu możliwych różnic rozbieżności między histopatologiczną a genomyczną oceną parametrów związanych z pCR, zwłaszcza opisujących proliferację, przeprowadzono również szeroko zakrojone analizy nienadzorowane. Badanie wykonano w grupie 60 chorych spośród analizowanych powyżej, w sumie analizie poddano 180 badań mikromacierzowych (dla 6 chorych dane wyłączone ze względu na gorszą jakość uzyskanych danych). Oszacowania zmienności dokonano na danych mikromacierzowych poddanych tzw. ocenie nienadzorowanej, metodą analizy głównych składowych (ang. Principal Component Analysis, PCA). Analiza tych danych wskazała, że dla większości chorych profil dla pobranych wycinków – choć heterogeny – jest zbliżony, a znacznie większa jest heterogenność między chorymi niż rozbieżność między trzema wycinkami z tego samego guza. W większości sytuacji w których obserwowano heterogenność, jeden z punktów pomiaru był oddalony znacznie wyraźniej od dwóch pozostałych. W żadnej z sytuacji nie obserwowano bardzo dużych rozbieżności. Ponieważ zmienność w badanych próbkach, oceniana w analizie głównych składowych, może nie mieć znaczenia dla podejmowania decyzji klinicznych, dokonano próby oceny wybranych sygnatur genomicznych o znaczeniu prognostycznym lub predykcyjnym. Analizowano sygnatury PAM50, SSP2006, AIMS, SCMOD1, SCMOD2, Genius, intClust, wg implementacji ich badawczej wersji w pakiecie genefu.

U 40% chorych predykcja podtypu na podstawie klasyfikatora PAM50 wskazywała na bardzo podobny sygnał pochodzący z trzech niezależnie pobranych od pacjenta wycinków, nieco nieoczekiwanie dotyczyło to głównie nowotworów o fenotypie potrójnie ujemnym. U 17% chorych obserwowano drobne rozbieżności (jeden z wycinków odstający od dwóch pozostałych, a u 10% chorych rozbieżności większe) ale nie o charakterze podstawowym. Głębokie rozbieżności w klasyfikacji obserwowano głównie w nowotworach luminalnych i HER2-dodatnich. Dane przedstawiono na konferencji SABCS 2019, gdzie spotkały się z dużym zainteresowaniem (Jarząb, Heterogeneity of multigene signatures in breast cancer among multiple specimens taken by core needle biopsy. SABCS 2019, Cancer Res 2020). W podsumowaniu tej części pracy, w przeprowadzonych badaniach genomicznych obserwowano rozbieżności między genomyczną a histopatologiczno-kliniczną predykcją fenotypu raka, jednak dla dużej części chorych nie były one powiązane z heterogennością utkania guza. Tego typu różnice, znacząco wpływające na wynik oceny genomicznej, obserwowano u 1/3 chorych.

Łącznie, w latach 2011-2014 zgromadzono część zbioru uczącego liczącą około 1100 biopsji gruboigłowych z zabezpieczeniem materiału na badania molekularne od 380 chorych leczonych przedoperacyjną chemiote-

rapia. W trakcie trwania pierwszych dwóch lat projektu zbiór uczący rozszerzono do łącznej liczby 1 580 biopsji od 530 chorych z rozpoznaniem raka piersi. Łącznie, w próbkach zbioru uczącego wykonano 242 badania mikromacierzowe w materiale od 80 chorych z różnymi podtypami raka piersi (trzy wycinki z biopsji na chorego). Na podstawie tego zbioru opracowano nowy alternatywny do opatentowanych zestaw genów różnicujących podtypy raka piersi. Bazując na wynikach analizy porównawczej doboru różnych metod klasyfikacji danych wieloklasowych raka piersi zbudowano ostateczny model klasyfikatora danych nowotworów piersi. Wykorzystując klasyfikator KNN zbadano wpływ doboru metody selekcji na jakość klasyfikacji. Porównanie pozwoliło na znalezienie odpowiedniej kombinacji metod pozwalających na uzyskanie wysokiej jakości klasyfikacji, przy stosunkowo małej liczbie sygnatur genowych.

Część czynników klinicznych, które nie były ewidentnie powiązane z wiekiem chorych wpływała na szanse pCR. Do czynników takich należał stopień zróżnicowania guza, niskie zróżnicowanie G3 wiązało się z istotnie wyższym odsetkiem pCR (33%). Biorąc pod uwagę, że obserwowano zależność parametrów proliferacji od wieku, a czynnika tego nie obserwowano dla stopnia zróżnicowania, zaś przeciwny obraz obserwowano dla powiązania z odpowiedzią, dokonano re-analizy rozpoznań histopatologicznych pod kątem oceny podtypu histologicznego oraz oceny stopnia zróżnicowania. W przeanalizowanej podgrupie 75 chorych część z rozpoznań G2 okazała się być zanizona (28,2% tych rozpoznań zakwalifikowano do stopnia G3).

Inne badane czynniki, oceniane pod kątem ich wpływu na szanse uzyskania pCR, wykazywały we wcześniejszych analizach związek z wiekiem chorych. U chorych z Ki67>20% odsetek pCR był wysoki, wynosił 30,2%. Wśród chorych z ujemną lub niską ekspresją receptora estrogenowego także obserwowano duży odsetek pCR, odpowiednio 36,5% oraz 41% w obu grupach. Ujemny receptor progesteronowy także wiązał się z wyższym odsetkiem pCR (38,6%), choć niska ekspresja tego białka już nie była tak silnie powiązana z odpowiedzią. Podtyp potrójnie ujemny nowotworu wiązał się z częstym występowaniem pCR (40,9%), podczas gdy w podtypie luminalnym A odsetek ten był bardzo niski (6,2%). Większa średnica guza zmniejszała szanse na uzyskanie całkowitej odpowiedzi, w stopniu I-IIA odsetek całkowitych odpowiedzi wynosił 31,8%, podczas gdy w stopniu zaawansowania IIIA odsetek ten wynosił tylko 15,5%. Wszystkie powyżej omówione różnice są istotne statystycznie w stosunku do pozostałych podgrup chorych ($p<0,05$).

Niektóre istotne czynniki kliniczne nie były aż tak silnie powiązane z odsetkiem całkowitych odpowiedzi. Między podtypem luminalnym B HER2-ujemnym (pCR u 19,3% chorych), luminalnym B HER2-dodatnim (27%) oraz podtypem HER2-dodatnim nieluminalnym (pCR u 35,6% chorych) obserwowane różnice nie były statystycznie istotne. Grupa chorych w stopniu zaawansowania IIIB/C i IV wykazywała odsetek odpowiedzi 22,5%, nie różniący się istotnie od średniej w całej grupie i wyższy niż w stopniu IIIA. Na obserwowane wyniki może mieć wpływ fakt, że w okresie objętym badaniem większość chorych na HER2-dodatnie nowotwory, najczęstsze w wysokich stopniach zaawansowania, leczona była przedoperacyjnie (a część także pooperacyjnie) bez wykorzystania leków anti-HER2, nierefundowanych w Polsce w tym okresie.

U chorych monitorowano odpowiedź metaboliczną na terapię za pomocą badania PET/TK po 1 cyklu terapii. U chorych z pCR mediana regresji SUVmax wynosiła 50%, u chorych bez pCR 21% ($p<0,0001$). Po około 6 tygodniach leczenia wykonywano badanie MR dla wczesnej oceny odpowiedzi morfologicznej guza. U chorych z pCR mediana regresji największego wymiaru guza wynosiła około 41,4%, podczas gdy w grupie bez pCR 23,7% ($p<0,0001$). Kiedy oceniono przydatność diagnostyczną tych dwóch parametrów za pomocą

krzywej charakterystyki operacyjnej odbiornika ROC, pole pod krzywą AUC dla oceny w badaniu PET/TK wynosiło 0,70, a dla oceny w badaniu MR 0,73 (interpretując te dane należy uwzględnić, że badania nie są wykonywane w tym samym punkcie czasowym, badanie MR oceniało odpowiedź w późniejszym punkcie czasowym). Dokonano także re-analzy oceny regresji metabolicznej w badaniu PET/TK. W badanej podgrupie 94 chorych obserwowano umiarkowaną korelację stopnia regresji SUVmax ocenianego na podstawie badań rutynowych i standaryzowanych ($R=0,6$), wskazującą na konieczność opracowania lepszych metod oceny odpowiedzi w praktyce klinicznej.

Ponieważ oceniane czynniki histopatologiczne, kliniczne i obrazowe były od siebie zależne, a także częściowo powiązane z wiekiem chorych, dla oceny niezależności wieku od tych parametrów oraz możliwości przewidywania pCR na ich podstawie podjęto próbę konstrukcji modelu wieloczynnikowego. Ze wszystkich czynników ocenianych pojedynczo metodą krokowej regresji logistycznej wyselekcjonowano cztery istotne czynniki, dostępne jeszcze przed rozpoczęciem chemioterapii i w sposób niezależny powiązane z szansą pCR. Najsilniejszym z nich był Ki67, zwiększający szanse pCR o 2,8% na każdą jednostkę zmiany odsetka Ki67 w guzie. Trzy kolejne czynniki, wyraźnie mniej istotne niż Ki67, były porównywalnie silnie powiązane z szansą pCR (FDR – odsetek wyników fałszywie dodatnich dla tych cech wynosił około 5%). Były to: wiek chorych, zmniejszający ryzyko pCR o około 3% na każdy rok różnicy, fenotyp guza oraz stan receptora estrogenowego. W zakresie fenotypu istotnie większą szansę pCR obserwowano dla nowotworów HER2-dodatnich; podobnie szansę zwiększała niska ekspresja receptora estrogenowego. Rozpoznanie raka potrójnie ujemnego nie było istotne w analizie wieloczynnikowej, prawdopodobnie większość znaczenia tego czynnika ujawniła się w obrębie cechy Ki67 (wszystkie badane TNBC wykazywały Ki67 powyżej 20%). Model oparty o cztery czynniki kliniczne wykazywał zdolność przewidywania pCR wyższą niż pojedynczo oceniana regresja w PET/TK i MR (AUC dla modelu 0,79). Kiedy do modelu dodano regresję ocenianą w obu badaniach, jedynie Ki67, fenotyp guza i receptor estrogenowy pozostały istotne w ich kontekście; wiek nie był w takim modelu niezależnym czynnikiem przewidującym pCR. Pole pod krzywą ROC w modelu 6-czynnikowym było wysokie (AUC = 0,84), wskazując na dużą przydatność takiego skojarzenia badań dla przewidywania odpowiedzi. Jako ostatni etap analizy, dokonano oceny przeżycia bez nawrotu lub progresji u chorych w zależności od uzyskania pCR. W badanej grupie chorych progresję choroby stwierdzono u ogromnej większości chorych, nie poddanych leczeniu operacyjnemu (62/63 chorych, 98,4%) oraz u 94 chorych z grupy 400 chorych operowanych i utrzymanych w obserwacji (23,5%). Z obserwacji utracono 4 chorych (8,2%). W całej grupie średni szacowany czas do nawrotu wynosił 68,7 miesiąca, po 5 latach obserwacji 64,9% chorych pozostawało bez nawrotu/progresji. Mediana czasu obserwacji u 307 chorych pozostających bez nawrotu wynosiła 52,2 mies. (IQR 37,5-77,1 mies., zakres 6-112 mies.)

W grupie chorych, u których w badaniu pooperacyjnym stwierdzono pCR 5-letnie przeżycie bez nawrotu lub progresji wynosiło 87,1%, podczas kiedy w grupie chorych u których odpowiedzi nie stwierdzono 5-letnie przeżycie dotyczyło 69,8% chorych. Różnica między badanymi grupami była istotna statystycznie ($p=0,01$, log-rank).

Analizie poddano wpływ fenotypu guza i jego stopnia zaawansowania na przeżycie wolne od nawrotu/progresji. Różnice związane z obiema cechami były silnie istotne (test log-rank, $p<0,0001$). Medianę przeżycia osiągnięto dla dwóch podtypów – HER2-dodatniego (po 54,7 miesiąca) oraz luminalnego B HER2-

ujemnego (po 92,9 miesiąca). W podtypie potrójnie ujemnym większość zdarzeń wystąpiła w ciągu pierwszych 36 miesięcy, a od 51 miesiąca odsetek chorych bez nawrotu wynosi 71%.

Porównanie rokowania w zależności od wyjściowego stopnia zaawansowania wskazało, że po obserwacji 5-letniej pomiędzy stopniem I-IIA, stopniem IIB oraz stopniem IIIA różnice sięgają około 10 punktów procentowych (87,8% vs 78% vs 69,7%, $p < 0,0001$, test log-rank). Rokowanie dla łączonego stopnia IIIB-C oraz chorych w stopniu IV było wyraźnie gorsze, po 5 latach bez progresji pozostawało 31,5% badanych.

Dokonano łączonej analizy podtypu biologicznego guza oraz uzyskania pCR. Ponieważ chorzy z całkowitą odpowiedzią wykazywali mniejsze różnice w rokowaniu, związane z podtypem, a grupa ta jest względnie niewielka, analizowano ją łącznie. Odsetek przeżycia po 5 latach bez nawrotu/progresji wynosił 87,5%. Wśród chorych na nowotwory luminalne B HER2-ujemne oraz potrójnie ujemne, u których nie stwierdzono pCR, PFS po 5 latach obserwacji wynosił odpowiednio 63,6% i 59,3%, jednak w grupie TNBC do nawrotów odchodziło znacznie szybciej. W dwóch grupach nawrót stwierdzono u ponad połowy chorych. Pierwszą były HER2-dodatnie raki piersi bez pCR, medianę zdarzeń osiągnięto w tej grupie po 43 miesiącach, a po 5 latach bez nawrotu pozostawało 37,4%. Drugą grupą były HER2-ujemne nowotwory luminalne B, u których — jeśli nie osiągnięto wyjściowo pCR — zdarzenia u połowy chorych występowały po 92,9 miesiącach.

Obecnie przygotowywane jest zgłoszenie patentowe dotyczące klasyfikatora molekularnego łączącego ekspresję genów z klinicznymi parametrami nowotworu oraz publikacja dotycząca przewidywania pCR na podstawie parametrów klinicznych i obrazowych.

Na podstawie analizy zaawansowania węzłowego u 287 chorych, u których dokonano oceny PET/CT zawan-sowania w obrębie regionalnych węzłów chłonnych przy potwierdzeniu biopsyjnym ich zajęcia (cN1-cN3) na podstawie diagnostyki biopsyjnej przed chemioterapią indukcyjną. U 42 chorych (16,2%) nie stwierdzono wychwytu w badaniu PET/TK, u 65 chorych (25,1%) stwierdzono wychwyty w pojedynczym węzle chłon-nym, u 47 chorych (18,1%) w dwóch węzłach, a u 105 (40,5%) w trzech lub więcej węzłach chłonnych. Me-diana SUVmax w obrębie węzłów wynosiła 4,9 (IQR 2,1-9,8), podczas gdy mediana SUVmax w piersi wy-niosła 7,6 (IQR 4,4-12,0). U 160 chorych (70,8%) wychwyty w węzłach były niższe niż w piersi (ratio < 1), u 66 chorych (29,2%) wykazywały wartości wyższe. Mediana stosunku pacha/piers dla SUVmax to 71,4% (IQR 38,1%-110,1%). Nie obserwowano różnic w odsetku pCR związanych z zaawansowaniem węzłowym: u cho-rych cN1 obserwowano 21,8% pCR, w grupie cN2 19,8% a w grupie cN3 22,2% (n.z.). Podobnie, nie obser-wowano różnic uwzględniając liczbę węzłów obserwowaną w PET/TK.

Wyniki przedstawiono na konferencji SABCS (Marcin Kubiczko, Andrea D'Amico, Anna Polakiewicz-Gilowska, Agnieszka Badora-Rybicka, Damian Borys, Izabela Gorczewska, Marco Di Pietro, Olgierd Chra-bański, Wiesław Bal, Anna Michalik, Mateusz Raus, Agnieszka Pasierbek, Rafał Tarnawski, Barbara Bobek-Billewicz, Michał Jarzab. Association of nodal stage as assessed by FDG PET/CT with pathological complete response rate after preoperative chemotherapy [abstract]. In: Proceedings of the 2019 San Antonio Breast Cancer Symposium; 2019 Dec 10-14; San Antonio, TX. Philadelphia (PA): AACR; Cancer Res 2020;80(4 Suppl):Abstract nr P4-02-12).

Przygotowywana jest analiza optymalnego schematu wykonywania badań obrazowych (w tym MR piersi, mammografii oraz badania USG piersi) u chorych z mutacjami genów najwyższego ryzyka (BRCA1/2) – poprzez porównanie schematu wykonywania badania MR piersi co 6 miesięcy w skróconej zoptymalizowanej sekwencji i z ograniczeniem częstości badań MMG do badania MR wykonywanego raz na rok, na przemian z USG i mammografią. Dokonano analizy klinicznego przebiegu diagnostyki u ponad 100 chorych z grupy podwyższonego ryzyka, obecnie trwa przygotowywanie prospektywnego protokołu i wniosku do komisji bioetycznej. Planowane jest wnioskowanie o grant badawczy w ramach programu INFOSTRATEG.

Dokonano analizy monitorowania kardiotoxyczności przedoperacyjnej chemioterapii raka piersi w zakresie funkcji układu sercowo-naczyniowego, w kontekście przebytego leczenia oraz wczesnych wskaźników ryzyka niewydolności mięśnia sercowego. Wśród ponad 200 chorych, u których dokonano monitorowania za pomocą surowiczych markerów kardiotoxyczności (troponina, NT-proBNP) wyodrębniono około 40 chorych o podwyższonym ryzyku. Obecnie trwa analiza przebiegu klinicznego w tej grupie chorych i gromadzone są dane kliniczne dot. stanu układu sercowo-naczyniowego.

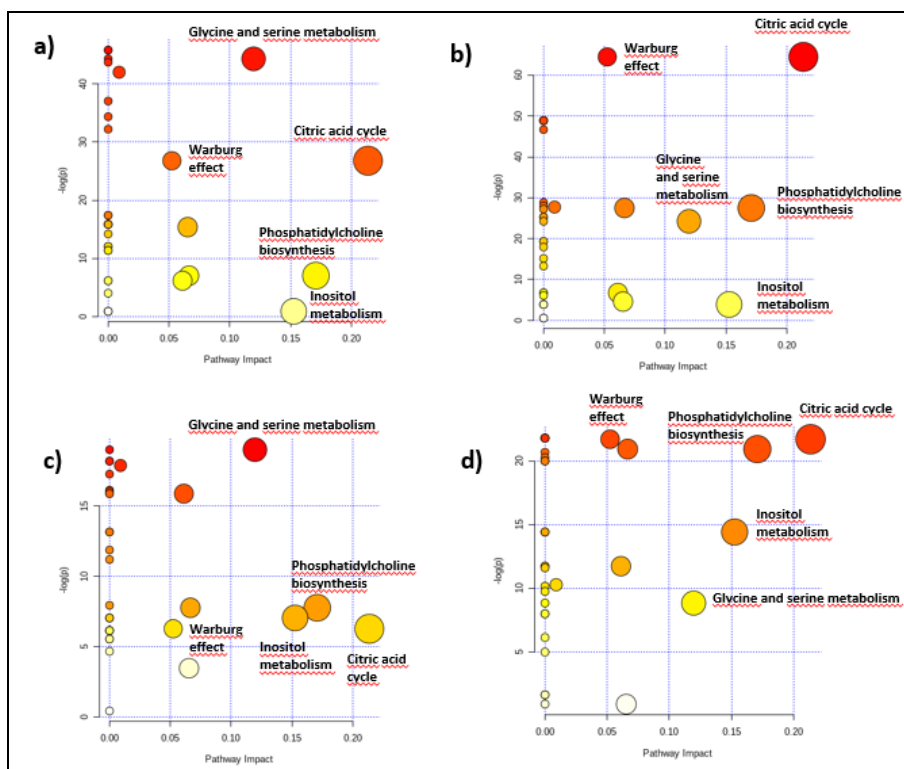
4.11. Zastosowanie techniki HR MAS NMR do charakterystyki profili metabolicznych guzów tarczycy, piersi, endometrium, jajnika oraz komórek serca.

Kierownik: M. Sokół

Wykonawcy: M. Sokół, A. Skorupa, Ł. Boguszewicz, M. Ciszek, M. Gramatyka, M. Kijonka

Cel 1: Analiza zaburzonych szlaków metabolicznych w zmianach tarczycy (złośliwych i łagodnych) w odniesieniu do tkanki makroskopowo prawidłowej

Materiał badany stanowiły 182 wycinki tkankowe pobrane z guza (38 – zmiany złośliwe, 32 – zmiany łagodne) oraz z tkanki niezmienionej makroskopowo (80 - wole koloidowe, 32 – przewlekłe zapalenie tarczycy) w trakcie operacji usunięcia guza tarczycy. Intensywności integralne sygnałów metabolitów w widmach ¹H CPMG HR MAS NMR tych wycinków zostały poddane analizie ścieżek metabolicznych (ang. pathway analysis) przy użyciu oprogramowania Metaboanalyst 4.0. Na rysunku 1 widoczna jest mapa zaburzonych ścieżek dla następujących porównań: zmiany złośliwe – wole koloidowe, zmiany złośliwe – przewlekłe zapalenie tarczycy, zmiany łagodne – wole koloidowe, zmiany łagodne – przewlekłe zapalenie tarczycy. W tabeli 1 przedstawione są krotności wzbogacenia (ang. fold enrichments) najważniejszych szlaków. Zaburzenia cyklu kwasu cytrynowego, metabolizmu glicyny i seryny, biosyntezy fosfatydylocholiny i metabolizmu inozytoli są scharakteryzowane wskaźnikami wpływu (ang. pathway impact) > 0.1 we wszystkich porównaniach. Warto jednak zaznaczyć, że wyższą krotność wzbogacenia dla cyklu kwasu cytrynowego uzyskano w porównaniach zmian złośliwych i łagodnych do woli koloidowych, niż do przewlekłego zapalenia tarczycy. Metabolizm inozytoli jest natomiast bardziej zaburzony w zmianach złośliwych i łagodnych w odniesieniu do przewlekłego zapalenia, niż do woli. Wykazano także wyższą krotność wzbogacenia dla biosyntezy fosfatydylocholiny w analizie różnic między zmianami łagodnymi a tkanką makroskopowo prawidłową niż w analizie różnic między zmianami złośliwymi a tą tkanką.



Rys. 1. Mapa zaburzonych ścieżek metabolicznych: (a) zmiany złośliwe - wole koloidowe, (b) zmiany łagodne - wole koloidowe, (c) zmiany złośliwe - przewlekłe zapalenie, (d) zmiany łagodne - przewlekłe zapalenie.

Tabela 1. Krotności wzbogacenia (ang. fold enrichments) najważniejszych ścieżek metabolicznych uzyskane dla następujących porównań: zmiany złośliwe vs. wole koloidowe, zmiany łagodne vs. wole koloidowe, zmiany złośliwe vs. przewlekłe zapalenie, zmiany łagodne vs. przewlekłe zapalenie.

Ścieżka metaboliczna	Zmiany złośliwe vs. wole koloidowe	Zmiany łagodne vs. wole koloidowe	Zmiany złośliwe vs. przewlekłe zapalenie	Zmiany łagodne vs. przewlekłe zapalenie
Metabolizm seryny i glicyny	47.72	27.81	18.51	9.18
Biosynteza fosfatydylocholiny	10.33	40.18	11.08	28.10
Metabolizm inozytolu	0.66	5.28	10.44	21.09
Cykl kwasu cytrynowego	24.74	36.33	8.74	21.00

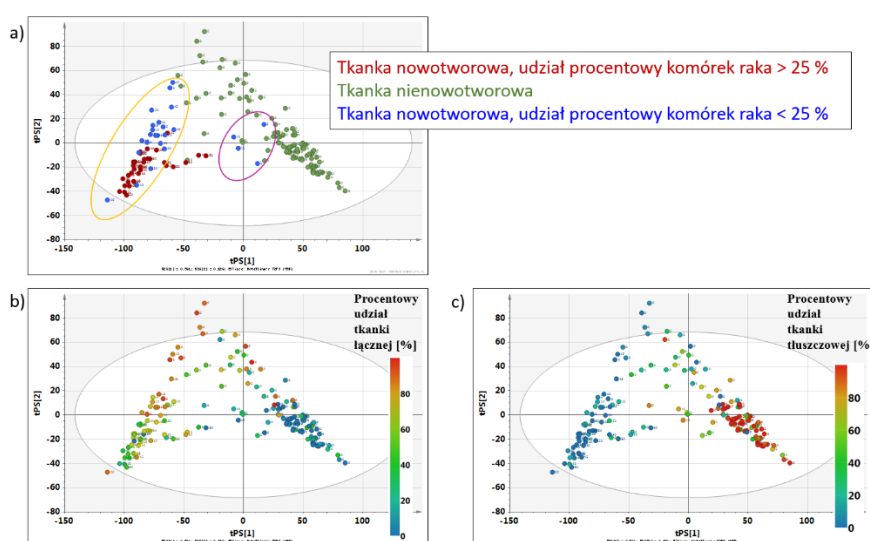
Formy prezentacji wyników:

Przygotowano publikację: Agnieszka Skorupa, Mateusz Ciszek, Ewa Chmielik, Łukasz Boguszewicz, Małgorzata Oczko – Wojciechowska, Małgorzata Kowalska, Dagmara Rusinek, Tomasz Tyszkiewicz, Aneta Kluczevska – Gałka, Agnieszka Czarniecka, Barbara Jarzab, Maria Sokół. *Shared and unique metabolic features of the malignant and benign thyroid lesions determined with use of ¹H HR MAS NMR spectroscopy* (Manuskrypt przyjęty do publikacji w *Nature. Scientific Reports*, IF = 3.998).

Finansowanie: Projekt został sfinansowany ze środków Narodowego Centrum Badań i Rozwoju w ramach programu STRATEGMED (STRATEGMED2/267398/4/NCBR/2015).

Cel 2: Określenie czułości techniki HR MAS NMR w detekcji komórek nowotworowych w materiale tkankowym pobranym śródoperacyjnie w oszczędzających pierś zabiegach usunięcia nowotworu piersi. Materiał badany stanowiły 204 wycinki tkankowe pobrane od 51 pacjentek operowanych w Narodowym Instytucie Onkologii (Oddział w Gliwicach) z powodu raka piersi. Wycinki, o różnej zawartości komórek nowotworowych, pochodziły z: guza nowotworowego, pogranicza guza i tkanki prawidłowej, tkanki makrosko-

powo prawidłowej (odległość < 1 cm od granicy guza), tkanki makroskopowo prawidłowej (odległość = 1 cm od granicy guza), tkanki prawidłowej (odległość > 1 cm od granicy guza). Widma ^1H HR MAS NMR zarejestrowano na spektrometrze NMR 400 MHz. Po pomiarze HR MAS NMR wycinki tkankowe zostały poddane ocenie histopatologicznej w celu określenia składu tkankowego. Analiza ta była możliwa dla 163 próbek. Model PLS-DA został skonstruowany w oparciu o widma CPMG próbek charakteryzujących się wysokim procentowym udziałem komórek nowotworowych (>25%) oraz próbek pochodzących z tkanki nienowotworowej. Na rysunku 2a przedstawiono pierwszą płaszczyznę (wykres wartości czynnikowych) opracowanego modelu. Na płaszczyznę tę zrzutowano próbki charakteryzujące się niskim udziałem komórek nowotworowych (<20%). Na rysunkach 2b i 2c przedstawiony jest procentowy udział tkanki łącznej i tłuszczowej, odpowiednio: 21 z 25 rzutowanych próbek testowych ułożonych jest w obszarze typowym dla raka lub w obszarze pomiędzy rakiem a tkanką prawidłową (żółta elipsa, rys. 2a). Pozostałe próbki testowe ułożone zostały w obszarze próbek pochodzących z tkanki nienowotworowej charakteryzujących się dużą zawartością tkanki tłuszczowej (elipsa fioletowa, rys. 2a). Udział tkanki tłuszczowej w tych próbkach wynosił ponad 60%.



Rys. 2. (a) Wykres wartości czynnikowych modelu PLS-DA skonstruowanego w oparciu o próbki charakteryzujące się wysokim procentowym udziałem komórek nowotworowych (>25%) oraz próbki pochodzące z tkanki nienowotworowej. Na płaszczyznę opracowanego modelu zrzutowano próbki o niższym procentowym udziale komórek nowotworowych (<20%). (b) Wykres wartości czynnikowych modelu PLS-DA przedstawiający procentowy udział tkanki łącznej. (c) Wykres wartości czynnikowych modelu PLS-DA przedstawiający procentowy udział tkanki tłuszczowej.

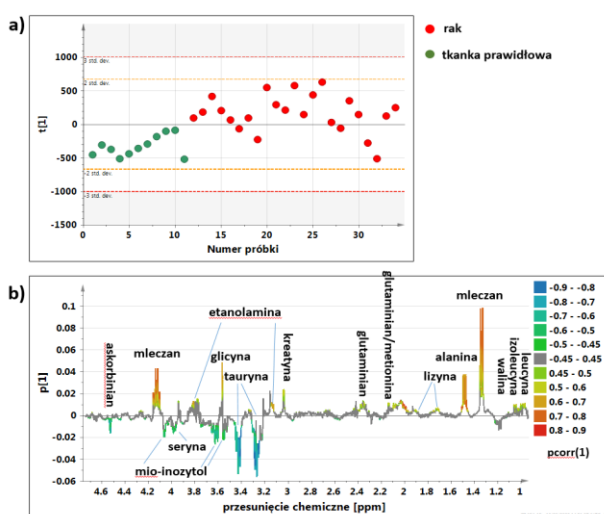
Formy prezentacji wyników:

1. Wystąpienie na konferencji XXIV Gliwickie Spotkania Naukowe, 20-21.11.2020, Gliwice, Abstract book. Agnieszka Skorupa, Mateusz Cizek, Maria Turska-d'Amico, Ewa Stobiecka, Ewa Chmielik, Andrea d'Amico, Łukasz Boguszewicz, Maria Sokół. *Sensitivity of ^1H HR MAS NMR technique in detection of breast cancer cells in post-surgical specimens.*
2. W roku 2021 planowane jest opublikowanie uzyskanych wyników.

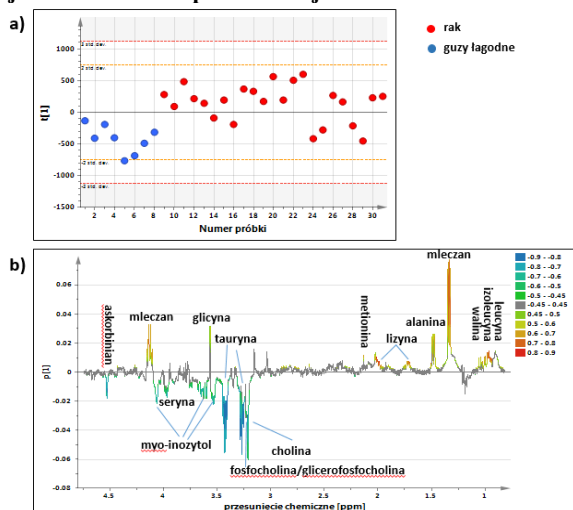
Finansowanie: Projekt został sfinansowany ze środków Narodowego Centrum Badań i Rozwoju w ramach programu STRATEGMED (STRATEGMED2/267398/4/NCBR/2015).

Cel 3: Analiza różnic w profilach metabolicznych między zmianami złośliwymi, zmianami łagodnymi oraz prawidłową tkanką jajnika

Materiał badany stanowiły 23 próbki raka jajnika, 8 próbek łagodnych zmian jajnika oraz 11 próbek zdrowej tkanki jajnika. Metoda PLS-DA została wykorzystana w celu znalezienia różnic w profilach metabolicznych uzyskanych przy użyciu techniki HR MAS NMR (widma CPMG) między tymi grupami. Wykresy wartości i ładunków czynnikowych pokazane są na rysunkach 3 i 4. Analiza wykazała wzrost poziomu waliny, leucyny, izoleucyny, mleczanu, alaniny, lizyny, glicyny i spadek askorbinianu, seryny, myo-inozytolu i tauryny w raku jajnika w odniesieniu zarówno do tkanki prawidłowej, jak i zmian łagodnych. Dodatkowo, wzrost glutamianu, kreatyny i etanolaminy został zaobserwowany w raku jajnika względem tkanki prawidłowej. Obniżenie poziomu choliny oraz fosfocholiny/glicerofosfocholiny widoczne jest w próbkach raka względem zmian łagodnych.



Rysunek 3. Wykres wartości czynnikowych (a) oraz ładunków czynnikowych (b) modelu PLS-DA skonstruowanego w oparciu o widma CPMG próbek raka jajnika oraz tkanki prawidłowej.



Rysunek 4. Wykres wartości czynnikowych (a) oraz ładunków czynnikowych (b) modelu PLS-DA skonstruowanego w oparciu o widma CPMG próbek raka jajnika oraz guzów łagodnych.

Formy prezentacji wyników:

W roku 2021 planowane jest opublikowanie uzyskanych wyników.

Finansowanie: Projekt został sfinansowany ze środków Śląskiego Uniwersytetu Medycznego we współpracy z Prof. Andrzejem Witkiem (Katedra i Klinika Położnictwa i Ginekologii Uniwersyteckiego

Centrum Klinicznego w Katowicach). Badania są prowadzone w ramach zatwierdzonej współpracy Instytutu w Gliwicach oraz ŚUM i stanowią temat pracy doktorskiej.

Cel 4: Analiza zależności między profilem metabolicznym wyznaczonym przy pomocy techniki HR MAS NMR a stopniem patomorfologicznego zróżnicowania w raku endometrium.

Materiał badany stanowiło 65 wycinków tkankowych (G1: 14, G2: 34, G3:17) pobranych z obszaru guza nowotworowego u pacjentek operowanych z powodu gruczolakoraka endometrium. Profile metaboliczne (widma CPMG) tych wycinków zostały zmierzone przy pomocy techniki HR MAS NMR na spektrometrze Bruker Avance 400 MHz. Analiza danych została przeprowadzona z użyciem techniki O-PLSDA. Guzy G1 charakteryzowały się niższym poziomem cysteiny, dimetylosulfanu, myo-inozytolu, seryny/cysteiny i askorbinianu, niż guzy G2. Wyższy poziom 3-Beta-hydroxymaślanu, glicerofosfocholiny i betainy oraz niższy poziom askorbinianu, glicyny, seryny/cysteiny, myo-inozytolu, tauryny, scyllo-inozytolu, choliny, dimetylosulfanu i kreatyny zostały zaobserwowane w guzach G3 względem guzów G1. Guzy G2 różnią się od guzów G3 niższym poziomem glicerofosfocholiny, kreatyniny i betainy oraz wyższym poziomem choliny, scyllo-inozytolu, tauryny, i myo-inozytolu.

Formy prezentacji wyników:

W roku 2021 planowane jest opublikowanie uzyskanych wyników.

Finansowanie: Projekt został sfinansowany ze środków Śląskiego Uniwersytetu Medycznego we współpracy z Prof. Andrzejem Witkiem (Katedra i Klinika Położnictwa i Ginekologii Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Katowicach). Badania są prowadzone w ramach zatwierdzonej współpracy Instytutu w Gliwicach oraz ŚUM i stanowią temat pracy doktorskiej.

Cel 5: Zastosowanie technik NMR do charakterystyki profili metabolicznych napromienianych komórek serca

Przeprowadzone w tej pracy badania in vivo na zwierzętach (myszy) miały na celu opisanie zmian metabolicznych zachodzących w sercu na skutek narażenia na jednorazowe dawki promieniowania jonizującego ≤ 2 Gy. Szczegółowymi celami pracy były: określenie czy promieniowanie jonizujące zmienia żywotność, morfologię oraz profil metaboliczny komórek serca, oraz określenie czy promieniowanie jonizujące zmienia morfologię oraz profil metaboliczny mięśnia sercowego.

Wyniki celu cząstkowego 5 przedstawiono w rozprawie doktorskiej dr Michaliny Gramatyki – tytuł pracy *Ocena wpływu promieniowania jonizującego na metabolizm kardiomiocytów*; promotor – prof. Maria Sokół. Praca została obroniona przed Radą Naukową NIO PIB z wyróżnieniem w 2020 roku.

Rozprawa doktorska została opublikowana w postaci cyklu trzech publikacji, z których dwie wydane zostały w 2020 r. Pierwsza z nich to praca przeglądowa (Michalina Gramatyka, Maria Sokół, *Radiation metabolomics in the quest of cardiotoxicity biomarkers: the review* International Journal of Radiation Biology 2020;96(3):349-359 <https://doi.org/10.1080/09553002.2020.1704299>). Omawia ona szkodliwe działanie promieniowania jonizującego ze szczególnym uwzględnieniem toksyczności dla układu sercowo-naczyniowego (kardiotoksyczność). Opisany został między innymi wpływ promieniowania na komórki i tkanki na poziomie molekularnym, efekty narażenia na średnie i niskie dawki promieniowania oraz próby poszukiwań biomarke-

rów charakterystycznych dla ekspozycji na promieniowanie. Wskazano również na potencjał badań metabolomicznych w obszarze badań nad kardiotoxycnością (i toksycnością w ogóle) promieniowania.

Druga z publikacji, praca doświadczalna (Michalina Gramatyka, Łukasz Boguszewicz, Mateusz Ciszek, Dorota Gabryś, Roland Kulik, Maria Sokół, *Metabolic changes in mice cardiac tissue after low-dose irradiation revealed by ¹H NMR spectroscopy* Journal of Radiation Research, 2020;61(1):14–26, <https://doi.org/10.1093/jrr/rrz079>), opisuje wyniki uzyskane podczas badań nad wpływem promieniowania jonizującego na mięsień sercowy myszy in vivo. Zmiany zachodzące w tkance na skutek promieniowania oceniano testami histologicznymi, a wyniki tych testów wskazują, że promieniowanie w wybranych dawkach oraz czasach obserwacji nie ma wpływu na włóknienie tkanki ani na intensywność śmierci apoptotycznej komórek. Jednak analiza metabolomiczna z wykorzystaniem spektroskopii ¹H NMR (badania ekstraktów z wycinków mięśnia sercowego) wykazała zaburzenia poziomu metabolitów na skutek napromienienia. Statystycznie istotne zmiany w profilu metabolitów polarnych wykryto 48 godzin po ekspozycji na promieniowanie. Dotyczyły one wzrostu poziomu kwasu pantotenowego, trimetyloaminy i glutaminianu oraz spadku sygnałów alaniny, glutaminy, acetylokarnityny, malonianu, glicyny i adenozy. W przypadku dawki 2 Gy obserwowano również odległe zaburzenia profilu metabolicznego (20 tygodni po napromienieniu): poziomy glutaminy i acetylokarnityny pozostały obniżone, podczas gdy stężenia pozostałych metabolitów z grupy zmienionych 48 godzin po napromienieniu wróciły do wartości obserwowanych u zwierząt kontrolnych. Ponadto zaobserwowano różnice pomiędzy profilami wczesnych (48 godzin po ekspozycji) i późnych (20 tygodni po ekspozycji) zmian metabolicznych w sercach napromienionych dawką 2 Gy. Różnice te obejmowały poziom acetylokarnityny, alaniny, glicyny, glutaminy, glutaminy, mrówczanu, mio-inozytolu i trimetyloaminy. Dla grupy napromienionej dawką 0.2 Gy nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian w profilu metabolicznym 20 tygodni po napromienieniu.

Pomimo tego, że wczesne i późne zmiany (obserwowane 48 godzin i 20 tygodni po napromienieniu) zachodzące w profilu metabolicznym różnią się między sobą, to jednak związane są z tymi samymi procesami zachodzącymi w komórkach serca: metabolizmem energetycznym, beta-oksydacją kwasów tłuszczowych, stresem oksydacyjnym oraz uszkodzeniem struktur komórkowych.

Formy prezentacji wyników:

1. Praca doktorska – Michalina Gramatyka, *Ocena wpływu promieniowania jonizującego na metabolizm kardiomiocytów*; promotor – prof. Maria Sokół.
2. Michalina Gramatyka, Łukasz Boguszewicz, Mateusz Ciszek, Dorota Gabryś, Roland Kulik, Maria Sokół, *Metabolic changes in mice cardiac tissue after low-dose irradiation revealed by ¹H NMR spectroscopy* Journal of Radiation Research, 2020;61(1):14–26, <https://doi.org/10.1093/jrr/rrz079> (IF = 1.95).
3. Michalina Gramatyka, Maria Sokół, *Radiation metabolomics in the quest of cardiotoxicity biomarkers: the review* International Journal of Radiation Biology 2020;96(3):349-359 <https://doi.org/10.1080/09553002.2020.1704299> (IF = 2.368).

Badania realizowane w ramach pracy doktorskiej finansowane były przez Narodowe Centrum Nauki: grant PRELUDIUM 2015/17/N/NZ7/04101 pt. „Zmiany w profilu metabolicznym kardiomiocytów i mięśnia sercowego zachodzące pod wpływem niskich dawek promieniowania jonizującego”, oraz ze środków Centrum

4.12. Identyfikacja mutacji patogennych predysponujących do zachorowania na raka piersi u kobiet do 39 roku życia. Badanie uzupełniające diagnostykę genetyczną raka piersi.

Kierownik: M. Oczko-Wojciechowska/ J. Pamuła-Pilat

Wykonawcy: J. Pamuła-Pilat, K. Tęcza, A. Zajkiewicz, M. Kalinowska-Herok, M. Mazur, M. Lisik, J. Huszno

W grupie 210 kobiet z rakiem piersi zidentyfikowano 38 nosicielek mutacji germinalnych (co stanowi 18%). Procentowy udział zidentyfikowanych mutacji w badanej grupie wynosił: zmiana 3020insC w genie NOD2 - 6,8%, mutacje w genie CHEK2: c.470C/T - 5%, del5395 - 2%, c.444+1G>A -1,5%, c.1100delC-1%, mutacje w genie PALB2: c.509_510delGA 1% i c.172_-175delTTGT -1%, mutacje w genie NBS1 - c.657_661delACAAA – 1%. Zidentyfikowano nosicielkę mutacji c.1100delC i delecji eksonu 8 i 9 genu CHEK2 oraz nosicielkę mutacji c.470T>C w genie CHEK2 i patogennego wariantu c.657_661delACAAA w genie NBS1. Nie stwierdzono obecności analizowanych mutacji w genach ATM i PTEN w badanej grupie pacjentek. Analizy genetyczne wykonano metodami ASA-PCR, RFLP-PCR i multiplex PCR.

W grupie 194 pacjentek wykonano sekwencjonowanie Sangera wszystkich eksonów i intronów genu TP53. Zidentyfikowano patogenny wariant rs397516436 c.637C>T (p.Arg213Ter) (wg ClinVar) genu TP53 u jednej osoby ze zdiagnozowanym rakiem piersi. Występowanie mutacji c.637C>T skutkuje przedwczesnym pojawieniem się kodonu stop (CGA>TGA), efektem czego jest synteza skróconego dysfunkcyjnego białka p53. W literaturze wariant ten raportowany jest w rodzinach z syndromem Li-Fraumeni (Frebours 1995, Vahteristo 2001, Kato 2011, Masciari 2011, Fostira 2015).

W analizowanej grupie kobiet najczęściej występującym wariantem w genie TP53 była substytucja rs1042522 c.215C>G (ekson 4) definiowana jako zmiana łagodna. Wykryto ponadto inne warianty łagodne: rs1800370 p.(Pro36=) i rs751978853 p.(Thr118=) w eksonie 4 genu TP53 oraz w eksonie 6, rs1800372 p.(Arg213=). Pozostałe zmiany w genie TP53 występowały w intronach (Tabela 1).

W planie jest ukończenie sekwencjonowania genu TP53 i wykonanie badań genetycznych w materiale od pacjentek, u których nie powiodła się pierwsza próba amplifikacji materiału (wykonano około 90% planowanych analiz genetycznych). Wykonanie tych badań ma na celu otrzymanie wyników analiz molekularnych u wszystkich włączonych do badania pacjentek.

Przygotowano i wysłano maszynopis publikacji typu *case report* do druku. Po ukończeniu wszystkich analiz molekularnych planowane jest przygotowanie publikacji z części analiz molekularnych.

Tabela 1. Zmiany zidentyfikowane sekwencjonowaniem Sangera w genie TP53 u pacjentek z rakiem piersi analizowanych w ramach projektu badawczego.

Numer rs	Zapis zmiany aminokwasowej	Występowanie zmiany	Nomenklatura	Ilość heterozygot	Ilość homozygot rzadkich
rs8079544		1 intron	c.-28-112G>A	6	
rs1642785		2 intron	c.74+38C>G	67	100
rs1376609066		3 intron	del 3-4	40	138
rs17883323		3 intron	c.97-29C>A	18	1
rs1800370	p.(Pro36=)	4 exon	c.108G>A	4	

rs1042522	p.(Pro72Arg)	4exon	c.215C>G	64	100
rs751978853	p.(Thr118=)	4exon	c.354A>T	1	1
rs9895829		4 intron	c.376-125T>C	10	1
rs35850753		4 intron	c.376-117G>A	7	
rs113530090		4 intron	c.376-86T>C	6	
rs2909430		4 intron	c.376-91G>A	38	134
rs397516436	p.(Arg213*)	6 exon	c.637C>T	1	
rs1800372	p.(Arg213=)	6 exon	c.639A>G	2	
rs1625895		6 intron	c.672+62A>G	39	139
rs12947788		7 intron	c.782+72C>T	35	2
rs12951053		7 intron	c.782+92T>G	35	2
rs1800899		9 intron	c.993+12T>C	6	
rs17880847		10 intron	c.1100+30A>T	8	

5.1. Wpływ czynników genetycznych, w tym wariantów polimorficznych genów naprawy DNA i transporterów z rodziny ABC, na toksyczność i skuteczność chemioterapii.

Kierownik: E. Grzybowska

Wykonawcy: E. Grzybowska, M. Olbryt, D. Butkiewicz, we współpracy z I KRTChT, II KRTChT, OCHD i Poradnią Genetyki Onkologicznej

Badania genetyczne 33 wariantów polimorficznych w niekodującej części 3'UTR genów ADME zostały przeprowadzone na 305 pacjentkach z rakiem piersi, które były leczone schematem chemioterapii FAC (doksorubicyna, 5'fluorouracyl, cyklofosfamid). Celem projektu było określenie wpływu wariantów polimorficznych pacjenta na skuteczność chemioterapii oraz określenie wpływu genotypu pacjenta na skuteczność chemioterapii oraz określenie genotypu pacjentów wrażliwych i opornych na określony schemat chemioterapii.

Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała, że genetyczne warianty polimorficzne występujące dość często w populacji są ważnymi niezależnymi czynnikami wpływającymi na odpowiedź na terapię. W połączeniu z czynnikami klinicznymi mają one istotny wpływ na długość całkowitego i wolnego od wznowy przeżycia. W zestawie 33 przebadanych wariantów polimorficznych SNP przeżycie wolne od progresji zostało stwierdzone dla nosicielek wariantu DPYD rs291593 CC, AKR1C3 rs3209896 AG i ujemnym statusie receptora PGR. Zaletą badania wariantów polimorficznych u pacjenta jest to, że można je wykonać przed zastosowaniem leczenia i w ten sposób określić jakie jest prawdopodobieństwo niepowodzenia terapii.

Pamuła-Piłat J, Tęcza K, Kalinowska-Herok M, Grzybowska E. Genetic 3'UTR variations and clinical factors significantly contribute to survival prediction and clinical response in breast cancer patients. *Sci Rep.* 2020 Mar 31;10(1):5736. doi: 10.1038/s41598-020-62662-z. PMID: 32235849; PMCID: PMC7109149.

Zbadano występowanie mutacji 3020insC w genie NOD2 u 209 pacjentek z rakiem piersi oraz określono cechy kliniczne charakterystyczne dla pacjentek z rakiem piersi nosicielek mutacji w genie NOD2.

Pacjentki uczestniczące w badaniach podzielono na dwie grupy: przed 50-tym rokiem życia i po 50-tym roku życia. W grupie pacjentek poniżej 50-tego roku życia nie zaobserwowano różnic pomiędzy nosicielką a osobami bez mutacji w genie NOD2. Natomiast w grupie pacjentek powyżej 50-tego roku życia stwierdzono statystycznie znamiennej asocjacje z nadekspresją onkogenu HER2. Dla tej grupy pacjentek charakterystycz-

nym podtypem molekularnym był podtyp Luminal A lub Luminal B, HER2-, który ma lepsze przeżycia niż pozostałe podtypy molekularne.

Huszno J, Kolosza Z, Nycz-Bochenek M, Lisik M, Mazur M, Pamuła-Piłat J, **Grzybowska E**. Clinicopathological characteristics of breast cancer patients with *NOD2* mutation according to age. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2020;24(2):79-86. doi: 10.5114/wo.2020.97475. Epub 2020 Jul 3. PMID: 32774132; PMCID: PMC7403763.

Zabezpieczono 45 próbek osocza od 41 pacjentów leczonych z powodu zaawansowanego czerniaka skóry lub błon śluzowych w Oddziale NIO-PIB w Gliwicach oraz opracowano bazę danych klinicznych pacjentów uczestniczących w projekcie. Wyizolowano cfDNA z 31 próbek uzyskując DNA w zakresie 2,3-1488,0 ng/ml osocza (mediana 9,9 ng/ml). Z wybranych próbek cfDNA oraz DNA z blozków FFPE uzyskano biblioteki do sekwencjonowania NGS z wykorzystaniem platformy Ion Torrent.

Publikacje z roku 2020 związane z tematyką zadania badawczego:

Olbryt M, Pięłowski W, Rajczykowski M, Pfeifer A, Student S, Fiszer-Kierzkowska A. Genetic Profiling of Advanced Melanoma: Candidate Mutations for Predicting Sensitivity and Resistance to Targeted Therapy. *Target Oncol*. 2020 Feb;15(1):101-113. doi: 10.1007/s11523-020-00695-0. PMID: 31980996; PMCID: PMC7028806.

- **Magdalena Olbryt***, Marcin Rajczykowski and Wiesława Widlak, "Biological Factors behind Melanoma Response to Immune Checkpoint Inhibitors", *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21, 4071; doi:10.3390/ijms21114071

5.2. Wpływ komórek mikrośrodowiska nowotworowego na skuteczność terapii przeciwnowotworowej.

Kierownik: T. Cichoń

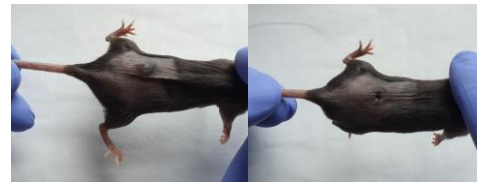
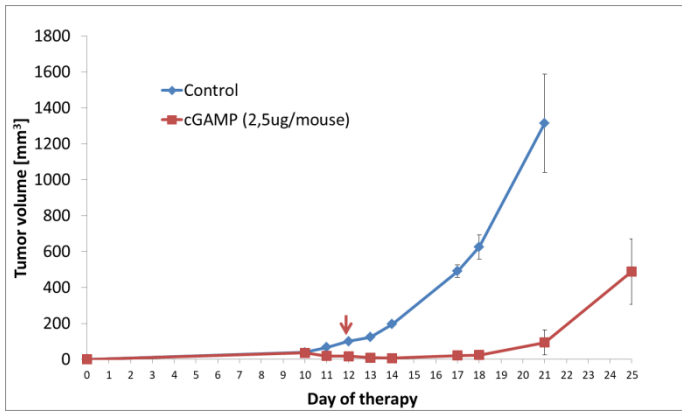
Wykonawcy: T. Cichoń, R. Smolarczyk, M. Jarosz-Biej, E. Pilny, A. Drzyzga, J. Czaplą, S. Matuszczak, A. Szymańska-Żytecka, A. Zielińska, we współpracy z Zakładem Brachyterapii (Wojcieszek P., Urbaś Z.)

W terapii nowotworów coraz częściej, poza komórkami nowotworowymi, są komórki prawidłowe im towarzyszące, tworzące tzw. mikrośrodowisko nowotworowe, tj. komórki tworzące naczynia krwionośne, makrofagi, fibroblasty, limfocyty. Mikrośrodowisko guza reguluje tworzenie się naczyń krwionośnych oraz hamuje aktywność układu odpornościowego, dzięki czemu komórki nowotworowe uciekają spod nadzoru układu odpornościowego, co prowadzi do wzrostu guza i powstawania przerzutów. Pożądana jest zatem aktywacja komórek układu odpornościowego odpowiedzialnych za niszczenie komórek nowotworowych.

Jednym z głównych białek odpowiedzialnych za aktywację układu odpornościowego jest białko STING. Ostatnie prace wskazują, że aktywacja białka STING hamuje wzrost guza, ale nie powoduje całkowitego wyleczenia. Dlatego wydaje się konieczne połączenie takiej terapii z dodatkowymi czynnikami.

Celem zadania jest zbadanie kombinacji czynnika antynaczyniowego z czynnikiem immunostymulującym.

W ramach zadania wykonano doświadczenia terapeutyczne z użyciem agonisty białka STING – cGAMP w zahamowaniu wzrostu guzów czerniaka mysiego. Zaobserwowano znamienne statystycznie zahamowanie wzrostu guzów czerniaka po jednokrotnym podaniu cGAMP. Jednak po kilku dniach obserwowano ponowny wzrost guzów u leczonych myszy (Ryc.1).

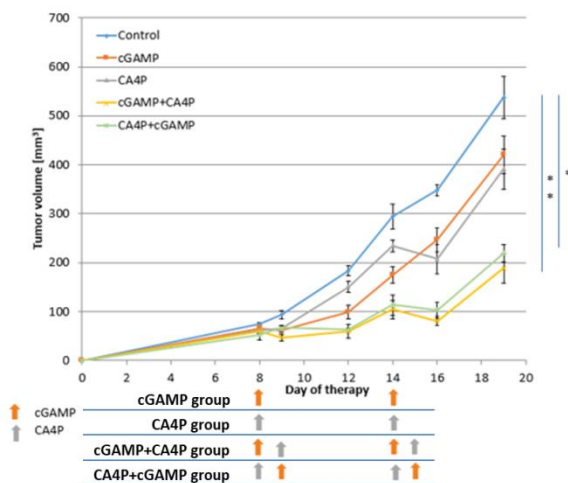


Kontrola cGAMP

Ryc. 1. Zahamowanie wzrostu guzów mysiego czerniaka.

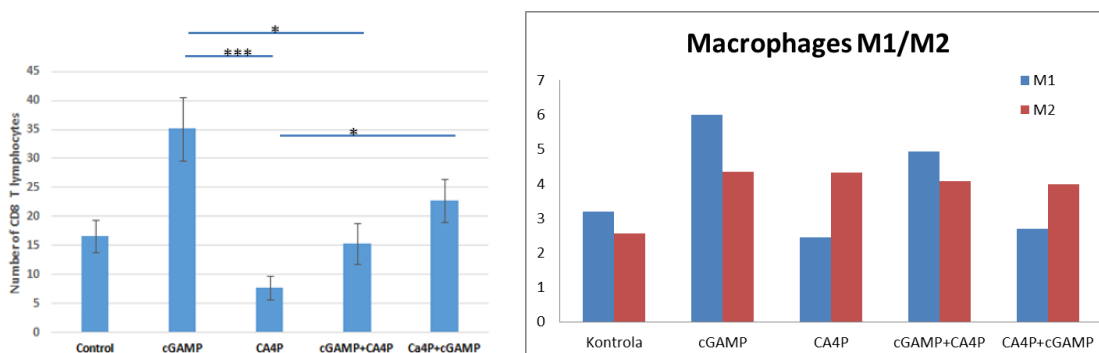
Aby zwiększyć skuteczność terapeutyczną cGAMP wykonano terapię skojarzoną z użyciem agonisty białka STING – cGAMP oraz związku antynacynynowego – kombretastatyny.

Zaobserwowano skuteczniejsze zahamowanie wzrostu guzów mysiego raka piersi – 4T1 w kombinacji związku przeciwnacynynowego (kombretastatyny – CA4P) z immunostymulującym - agonistą STING (2'3'-cGAMP) w obu schematach podawania związków w porównaniu do monoterapii i grupy kontrolnej (Ryc. 2).



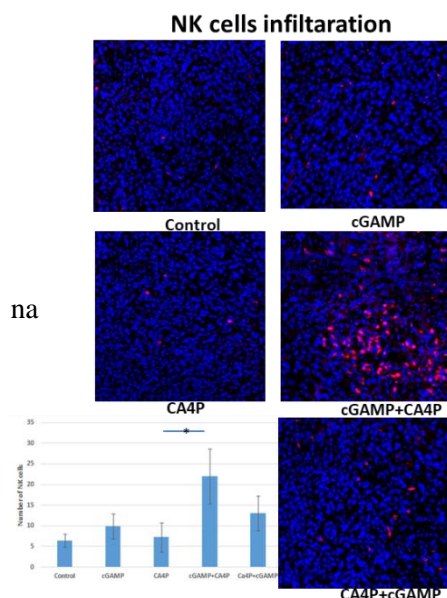
Ryc. 2. Zahamowanie wzrostu guzów mysiego raka piersi.

Za pomocą barwień immunohistochemicznych wykazano znaczący wzrost liczby cytotoksycznych limfocytów T CD8⁺ jak i makrofagów przeciwnowotworowych o fenotypie M1 zarówno w grupie myszy, którym podawano sam cGAMP jak i w terapii skojarzonej cGAMP z kombretastatyną (Ryc. 3).



Ryc. 3. Wpływ terapii kombinowanej (cGAMP z kombretastatyną) na infiltrację guzów limfocytami CD8⁺ oraz makrofagami.

Zaobserwowano także znamiennej statystycznie wzrost liczby napływających komórek NK w grupie myszy, które otrzymywały zarówno cGAMP jak i kombretastatynę (Ryc. 4).



Ryc. 4. Wpływ terapii kombinowanej (cGAMP z kombretastatyną) na infiltrację guzów komórkami NK.

Podsumowując, zauważono większą skuteczność terapeutyczną stosowanej kombinacji związku przeciwnaczyniowego (CA4P) z immunostymulującym (cGAMP). W grupie myszy, które otrzymywały oba związki zauważono zwiększony naciek cytotoksycznych limfocytów T CD8⁺, makrofagów o fenotypie M1 oraz komórek NK.

Przeprowadzone badania były finansowane z projektu grantowego nr UMO-2018/31/B/NZ5/01825 pt.: „Aktywacja białka STING skojarzona z czynnikiem antynaczyniowym jako nowe rozwiązanie terapii przeciwnowotworowej” (kierownik - dr Ryszard Smolarczyk, OPUS). Wyniki przeprowadzonych prac w ramach zadania badawczego zaprezentowano na dwóch konferencjach naukowych: V Międzynarodowa Konferencja “Perspektywy Onkologii Molekularnej” w Warszawie („The effectiveness of vascular disrupting agent (CA4P) combined with STING agonist (cGAMP) in anticancer therapy”. Alina Drzyzga, Tomasz Cichoń, Justyna Czapla, Ewelina Pilny, Sybilla Matuszczak, Ryszard Smolarczyk) oraz XXIV Gliwickich Spotkaniach Naukowych („Combination of vascular disrupting agent (CA4P) and STING agonist (cGAMP) in murine breast cancer therapy”. Ryszard Smolarczyk, Alina Drzyzga, Justyna Czapla, Sybilla Matuszczak, Ewelina Pilny, Tomasz Cichoń). Planujemy również przygotowanie publikacji naukowej dotyczącej zbadania skuteczności kombinacji związków antynaczyniowych z immunostymulacją za pomocą cGAMP.

Dodatkowo, w ramach zadania badawczego zbadano wpływ różnych dawek brachyterapii na komórki mikrośrodowiska guza nowotworowego. Mikrośrodowisko nowotworowe odgrywa kluczową rolę w skuteczności radioterapii. Immunomodulujące procesy zachodzące w mikrośrodowisku mogą być zaangażowane w aktywację układu odpornościowego czego skutkiem jest efekt szczepionki „*in situ*” bądź w stymulację immunosupresji prowadzącej do radiooporności (Jarosz-Biej M, Smolarczyk R, Cichoń T, Kułach, N. „Tumor Microenvironment as A "Game Changer" in Cancer Radiotherapy” International Journal of Molecular Sciences 2019, 29;20:3212). Nie ma jednoznacznych danych wskazujących, które dawki promieniowania wpływają na aktywację przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej, a które prowadzą do rozwoju immunosupre-

sji. Ponadto, brak jest danych w jaki sposób dane dawki brachyterapii wpływają na mikrośrodowisko guza nowotworowego.

Dlatego w ramach naszych badań skupiliśmy się na wpływie różnych dawek brachyterapii: 2Gy, 5Gy, 10Gy i 15Gy na mikrośrodowisko guza w tym na nowotworowe naczynia krwionośne i komórki układu odpornościowego w guzach leczonych myszy. Sprawdziliśmy jak wybrane dawki brachyterapii wpływają na zahamowanie wzrostu guzów mysiego czerniaka B16-F10. Uzyskane przez nas wyniki wskazują, że brachyterapia hamuje wzrost guzów mysiego czerniaka, w zależności od dawki. Pojedyncza dawka 10Gy jak i 15Gy najskuteczniej hamowały (około 80%) wzrost guzów nowotworowych u leczonych myszy. Jednak zwiększenie dawki z 10Gy do 15Gy nie poprawiło efektu terapeutycznego. Pojedyncze dawki ≥ 5 Gy brachyterapii powodowały zmniejszenie gęstości naczyń krwionośnych w guzach leczonych myszy. Natomiast brachyterapia w dawce 10Gy miała największy wpływ na poziom komórek układu odpornościowego naciekających guzy nowotworowe leczonych myszy. Zaobserwowano obniżenie poziomu makrofagów TAM o fenotypie pronowotworowym M2, które uczestniczą w tworzeniu nieprawidłowych naczyń krwionośnych i indukują immunosupresję. Dodatkowo w guzach napromienionych dawką 10Gy znacząco zwiększony był poziom cytotoksycznych limfocytów T CD8⁺. Uważamy, że aktywowana przeciwnowotworowa odpowiedź odpornościowa pod wpływem dawki 10Gy przekształca mikrośrodowisko guza w „szczepionkę *in situ*”. To w konsekwencji prowadzi do znaczącego zahamowania wzrostu guza nowotworowego.

Przeprowadzone badania były finansowane z projektu grantowego nr UMO-2018/31/D/NZ5/01754 pt.: „Kombinacja radioterapii z imikwimodem i sunitynibem jako nowa strategia terapeutyczna omijająca niektóre mechanizmy radio-oporności mikrośrodowiska nowotworowego” (kierownik: dr Magdalena Jarosz-Biej, SONATA). Wyniki przeprowadzonych badań w ramach zadania badawczego opublikowano w pracy: Jarosz-Biej M, Smolarczyk R, Cichoń T, Drzyzga A, Czapla J, Urbaś Z, Pilny E, Matuszczak S, Wojcieszek P. „Brachytherapy in a single dose of 10Gy as an "in situ" vaccination” *International Journal of Molecular Sciences* 2020; 21(13):E4585. doi: 10.3390/ijms21134585 [F=4.556].

5.3. Wpływ niskich dawek frakcyjnych promieniowania jonizującego na cytotoksyczny efekt karboplatyny i paklitakselu w komórkach raka narządów głowy i szyi.

Kierownik: D. Słonina

Wykonawcy: D. Słonina, B. Biesaga, T. Rutkowski

Głównym celem projektu: „**Wpływ niskich dawek frakcyjnych promieniowania jonizującego na cytotoksyczny efekt karboplatyny i paklitakselu w komórkach raka narządów głowy i szyi**” jest zidentyfikowanie molekularnych mechanizmów warunkujących większą wrażliwość komórek nowotworowych na niskie dawki frakcyjne (LDFR, 4 x 0,5Gy) w porównaniu do dawki konwencjonalnej 2 Gy, gdy skojarzono je z chemioterapią. W 2020 roku powyższy projekt otrzymał dofinansowanie w ramach grantu zewnętrznego NCN PRELUDIUM BIS1 (UMO-2019/35/O/NZ3/03039). Realizacja projektu rozpoczęła się w październiku 2020 roku po otrzymaniu pierwszej transzy dofinansowania.

Badania docelowo będą prowadzone na 4 liniach komórkowych raka narządów głowy i szyi, które zostaną wybrane na podstawie występowania w nich zjawiska nadwrażliwości na niskie (<0,5 Gy) dawki promieniowania jonizującego (*HRS - low-dose hyper-radiosensitivity*). Celem jest wykonanie badań na 2 liniach HRS-dodatnich i 2 liniach HRS-ujemnych i ocena czy obecność zjawiska HRS w komórkach ma wpływ na chemiowrażliwiający efekt niskich dawek promieniowania. Do oceny wpływu promieniowania i cytostatyków zostanie wykorzystany test klonogenny oraz immunofluorescencyjny test ognisk pATM. Mechanizm działania niskich dawek frakcyjnych (4 x 0,5 Gy) vs dawki pojedynczej (2 Gy) w skojarzeniu z cytostatykami zostanie określony na podstawie analizy kinetyki fosforylacji białka ATM (pATM).

W październiku 2020 roku rozpoczęto eksperymenty na pierwszej linii raka głowy i szyi FaDu (ATCC HTB-43 *human pharyngeal squamous cell carcinoma*). Oceniana jest wrażliwość komórek na niskie dawki promieniowania jonizującego i występowanie w nich zjawiska HRS. W tym celu komórki napromienia się dawkami od 0,1 Gy do 4 Gy promieniowania X 6MV na przyspieszaczu liniowym. Przeżywalność komórek oceniana jest testem klonogennym z wykorzystaniem cytofluorometru z sorterem (*FACS plating technique*). Pierwsze wyniki są w trakcie analizy.

5.4. Prospektywna ocena związku klinicznego przebiegu choroby z podłożem genetycznym oraz ocena skuteczności różnych sposobów leczenia dla weryfikacji standardów postępowania diagnostycznego i terapeutycznego u chorych z rozpoznaniem raka przytarczyc.

Kierownik: B. Jarzqb

Wykonawcy: B. Jurecka-Lubieniecka, B. Michalik, A. Kotecka-Blicharz, T. Gawlik, E. Zembala-Nożyńska, M. Szcasy, J. Siewińska

W Zakładzie Medycyny Nuklearnej i Endokrynologii Onkologicznej, Narodowego Instytutu Onkologii (NIO), Państwowego Instytutu Badawczego, Oddziale w Gliwicach, na przestrzeni 23 lat (1995 - 2018) obserwowano 49 chorych, u których rozpoznanie raka przytarczyc (RP) postawiono w ciągu 31 lat (1987 - 2017). W latach 2018 - 2019 dołączyło 9 nowych chorych na RP, co łącznie daje bazę 58 chorych – największą w Polsce. Jednakże, pacjenci z rozpoznaniem postawionym w ostatnich latach, wobec krótkiego czasu obserwacji, nie zostali włączeni do retrospektywnej analizy a zostali poddani badaniu prospektywnemu.

Prezentowana retrospektywna analiza obejmuje 49 chorych z rozpoznaniem raka przytarczyc postawionym w latach 1987 - 2017, którzy byli diagnozowani i leczeni w NIO w latach 1995 - 2018, a czas ich obserwacji był co najmniej roczny i zakończył się w dniu 31.12.2018 r.

Celem oceny chorych na raka przytarczyc, przeanalizowano wyniki przedoperacyjnych badań biochemicznych i hormonalnych (na podstawie kart wypisowych dostarczonych przez chorych lub wyników wykonanych w NIO), opisy zabiegów operacyjnych, wyniki histopatologiczne, konsultowane w NIO.

W ocenie predyspozycji genetycznej analizowano wyniki badań DNA dotyczące mutacji/zmian w genach:

- *CDC73(HRPT2)* - parafibrominy 1
- *MEN1*- meniny.

W ocenie zaawansowania i dynamiki choroby oceniono wyniki badań:

- biochemicznych [stężenia Ca⁺⁺]

- hormonalnych [stężenia PTHin]
- obrazowych, czyli morfologicznych (USG, CT, MR)
- funkcjonalnych (scyntygrafia ^{99}Tc MIBI SPECT/CT a zwłaszcza badanie ^{18}F -fluorocholina PET/CT).

W ocenie zaawansowania i dynamiki choroby oceniono wyniki badań:

- biochemicznych [stężenia Ca^{++}]
- hormonalnych [stężenia PTHin]
- obrazowych, czyli morfologicznych (USG, CT, MR)
- funkcjonalnych (scyntygrafia ^{99}Tc MIBI SPECT/CT a zwłaszcza badanie ^{18}F -fluorocholina PET/CT).

Do wyznaczania ryzyka poszczególnych zdarzeń w czasie, zastosowano model proporcjonalnego ryzyka (regresję) Coxa a w pojedynczych przypadkach oparto się na założeniach regresji logistycznej.

Do oceny proporcjonalnego przeżycia pacjentów (nawrotu choroby i całkowitych) w czasie obserwacji, posłużono się estymatorem Kaplana-Meiera.

Dla wizualizacji wyników wykorzystano też wykresy drzewkowe (forest plots).

Wynikiem przeprowadzanych analiz jest przygotowany do druku artykuł:

„ ^{18}F -fluorocholine PET/CT is a useful tool for recurrence and metastases detection and clinical decision-making in advanced parathyroid carcinoma”.

Badanie ^{18}F -fluorocholina PET/CT jako narzędzie w wykrywaniu nawrotów i przerzutów w zaawansowanym raku przytarczyc dla podejmowania decyzji terapeutycznych.

Barbara Michalik¹, Agnieszka Florczak², Tomasz Gawlik, Izabela Gorczewska², Beata Jurecka-Lubieniecka¹, Kornelia Hasse-Lazar¹, Agnieszka Kotecka-Blicharz¹, Andrea d'Amico², Barbara Jarzqb¹ Abstract

Introduction: Rak przytarczyc (RP) jest rzadkim rakiem endokrynnym i rzadką przyczyną PNP.

U chorych z przetrwałą lub nawrotową PNP po operacji RP, zwłaszcza bez odpowiednika morfologicznego w badaniach obrazowych (USG, TK, MR) i funkcjonalnych ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ MIBI), dobrym narzędziem do lokalizacji nawrotu i oceny zaawansowania RP, wydaje się być ^{18}F -fluorocholine PET/CT. Celem badania jest retrospektywna ocena efektywności wyników badania ^{18}F -fluorocholine PET/CT w praktyce klinicznej u chorych z zaawansowanym RP dla ustalenia trybu dalszego postępowania terapeutycznego jak i dla nadzoru po przeprowadzonym leczeniu.

Materials and methods: Dokonano retrospektywnej oceny wyników badań ^{18}F -fluorocholine PET/CT wykonanych w latach 2016-2019 u $n=12$ chorych (8 kobiet i 4 mężczyzn) w tym u 11 z RP i u 1-z rozpoznaniem Tis do różnicowania z RP. Przeanalizowano $n=21$ badań PET. Podawane aktywności mieściły się w zakresie od 4,8 mCi (177,6 MBq) do 7,5 mCi (277,5 MBq). Wykonywano akwizycje całego ciała (WB) oraz dodatkową głowy i szyi (HD). Wyniki badań PET oceniano w porównaniu z wykonywanymi w tym czasie badaniami (USG/TK/MR/MIBI) oraz oznaczanymi stężeniami Ca^{++} i PTHin. Analizowano podjęte decyzje terapeutyczne i skuteczność przeprowadzonego leczenia.

Results: Badanie ^{18}F -fluorocholine PET/CT wykonywano u chorych 1-4 razy. Pierwsze badanie wykonano w czasie od pół roku do 9,5 lat (mediana 3,5) od operacji, u chorych w wieku 32-71 lat. U wszystkich chorych wykazano ogniska gromadzenia znacznika a w najbardziej aktywnej zmianie odnotowane wartości SUV max w akwizycji całego ciała (WB) mieściły się w przedziale 1.25-13.3 (mediana 4.2). W dodatkowych akwizycjach HD, czasami uwidoczniło zmianę niewidoczną w akwizycji WB lub zmiana była lepiej widoczna w HD niż WB. Dzięki badaniu PET identyfikowano wznowy lub przerzuty, co stanowiło podstawę do przeprowadzenia operacji lub radioterapii a następnie dobrze nadzorowano efekt leczenia. U dwóch chorych badanie wykonane w ocenie przedoperacyjnej, pozwoliło na zweryfikowanie zaawansowania choroby i określiło zakres operacji a kontrola pozwoliła na ocenę skuteczności terapii.

Conclusions:

1. Badanie ^{18}F -fluorocholine PET/CT dobrze lokalizuje miejsce nawrotu i przerzuty u chorych z RP (zarówno w czynnym hormonalnie jak i w postaci normokalcemicznej) i może być szczególnie przydatne w przypadku progresji biochemicznej przy braku odpowiednika morfologicznego w innych badaniach obrazowych lub funkcjonalnych. Dodatkowa akwizycja HD w porównaniu do akwizycji WB jest szczególnie przydatna w detekcji wznowy miejscowej RP.

2. Badanie ^{18}F -fluorocholine PET/CT przeważa nad scyntyografią $^{99\text{m}}\text{Tc}$ MIBI (SPECT CT) w ocenie funkcjonalnej nawrotów raka przytarczyc.

3. Wyniki badania mogą być bardzo cenną wskazówką przy podejmowaniu decyzji o opcjach terapeutycznych i mogą być wykorzystane w nadzorze po przeprowadzonym leczeniu.

4. Nie rezygnując ze standardowych badań, to ^{18}F -fluorocholine PET/CT może być bardzo pomocnym, dobrym narzędziem lokalizacji nawrotowego RP i źródłem cennych informacji dla optymalizacji postępowania terapeutycznego.

Key words: rak przytarczyc, badanie ^{18}F -fluorocholine PET/CT

5.5. Mutacje somatyczne w szlakach związanych z nowotworzeniem sporadycznych guzów neuroendokrynnych trzustki (pNEN) i implikacje dla terapii tych nowotworów.

Kierownik: B. Jarzqb

Wykonawcy: B. Jurecka-Lubieniecka, P. Soczomski, A. Kotecka-Blicharz, D. Lange, J. Żebracka-Gala, K. Sieroń

Podstawowym celem programu badawczego jest sprawdzenie mutacji występujących w istotnych szlakach komórkowych związanych z rozwojem pNEN. Na podstawie otrzymanych wyników zamierzamy ustalić indywidualną charakterystykę molekularną każdego guza neuroendokrynego trzustki i podjąć próbę klasyfikacji pacjentów na jednorodne molekularnie podgrupy. Klasyfikacja molekularna guzów pNEN w perspektywie umożliwi zdefiniowanie czynników predykcyjnych terapii, wskazujących na obecność poszczególnych szlaków nowotworzenia w guzie, a w efekcie wybór odpowiedniej celowanej molekularnie terapii. Oceniane będą

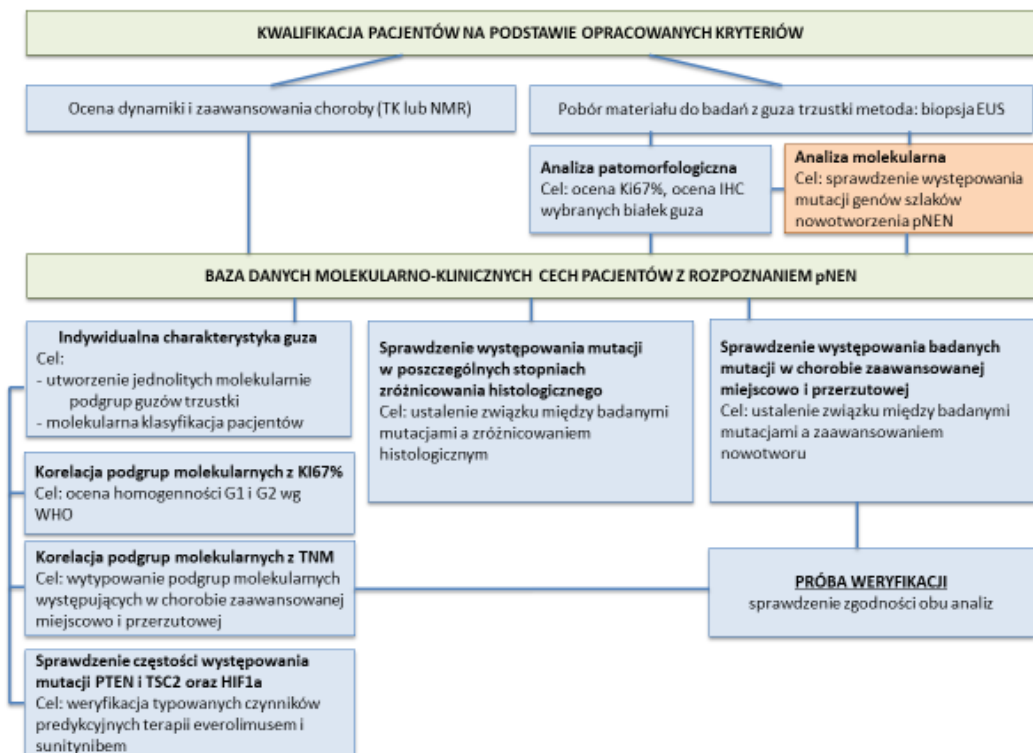
jakościowo mutacje w genach szlaku PI3K/mTOR, remodelingu chromatyny i wydłużania telomerów oraz naprawy DNA. Materiał do badań molekularnych planujemy uzyskać drogą biopsji guzów trzustki z użyciem endoskopii ultrasonograficznej (EUS).

Kolejnym celem naszego badania jest zweryfikowanie potencjalnej korelacji pomiędzy poznanymi mutacjami, a tradycyjnymi czynnikami prognostycznymi pNEN: stopniem zróżnicowania histologicznego nowotworu ocenianego według Ki67% oraz stopniem zaawansowania choroby wg TNM. Zamierzamy określić mutacje wspólne dla danego zróżnicowania i te, które występują rzadziej, stanowiąc subtelne różnice w modelu molekularnym. Planujemy określić mutacje, które występują w miejscowo zaawansowanej chorobie T1-4 N0 Mo oraz w chorobie przerzutowej T1-4 N1-2 M1.

Mała częstość zachorowań na pNEN, jak i heterogenność przebiegu tych nowotworów stanowi istotne utrudnienie w doborze jednolitej fenotypowo, odpowiednio licznej grupy koniecznej dla uzyskania dobrze uzasadnionych wniosków molekularnych. W większości opublikowanych prac badania prowadzono na małych, 20 - 30 osobowych grupach, słabo scharakteryzowanych fenotypowo. Wyniki naszych badań w tym zakresie mogą mieć pionierskie znaczenie, bowiem planowana do badań populacja pacjentów jest liczniejsza i ma bardzo dobrze scharakteryzowany fenotyp.

Badanie obejmuje 80 pacjentów grupy kaukaskiej z Polski, u których zdiagnozowano sporadyczny nowotwór neuroendokrynną trzustki. 42 pacjentów zakwalifikowanych już do badania pozostawało pod kontrolą Instytutu Onkologii od 1998 r do 2019 r. Średni okres obserwacji 3,9 lat. 40 pacjentów zostanie zakwalifikowanych w trakcie trwania badania w oparciu o wielośrodkową współpracę. Wszyscy chorzy zostaną sklasyfikowani według kryteriów nowotworów neuroendokrynnych trzustki WHO z 2017 r.

Poniższy diagram przedstawia plan badań.



W celu realizacji poszczególnych etapów projektu użyte zostaną następujące techniki i aparatura.

1. Wykonanie biopsji cienkoigłowej guzów trzustki z użyciem endoskopowej ultrasonografii EUS.
Dokładność EUS-FNA do diagnozowania oszacowano na 83–93%.
2. Analiza molekularna materiału histopatologicznego
3. Ocena histopatologiczna guza nowotworowego

Przedstawiony program badawczy został zgłoszony do konkursu Narodowego Centrum Nauki OPUS-18. Nie uzyskano dofinansowania z uwagi na zbyt wysoki koszt jednostkowy realizacji. W związku z tym nie wykonano badań.

5.6. Radiomics w radiochemioterapii NSCLC w stopniu zaawansowania III A/III B.

Kierownik: R. Tarnawski

Wykonawcy: M. Miszczyk, I. Jabłońska, Ł. Magrowski, O. Masri, K. Rasławski, E. Nowicka, R. Tarnawski

Wynikiem pracy nad tym programem w 2019 roku było stworzenie bazy danych dotyczących pacjentów leczonych radiochemioterapią z powodu NSCLC w stopniu zaawansowania IIIA-IIIIB (n=174), opracowanie zdjęć radiologicznych do analizy (PET, CT) oraz stworzenie zespołu informatyków zajmujących się analizą (prowadzoną przez A. Corteza). W związku z tym, że zgodnie z naszą wiedzą jest to pierwszy taki projekt w NIO, prace przygotowawcze zajmują więcej niż zwykle, co wynika z krzywej uczenia się. Projekt jest kontynuowany i rozszerzony na kolejne lokalizacje nowotworów, a kolejna część w planie naukowym będzie zgłaszana przez A. Corteza.

5.7. Ocena predykcyjnego i prognostycznego znaczenia cytokin proangiogennych, wykładników nasilenia stanu zapalnego, markerów uszkodzenia narządowego oraz parametrów hematologicznych u chorych na raka regionu głowy i szyi, niedrobnokomórkowego raka płuca oraz nowotwory układu krwiotwórczego.

Kierownik: J. Mrochem-Kwarciak

Wykonawcy: A. Chmura, R. Deja, M. Czech, M. Latos, A. Kowalska, Ł. Boguszewicz, T. Rutkowski, A. Wygoda, P. Polanowski, C. Szymczyk, J. Wierzoń, Ł. Krakowczyk, A. Idasiak, B. Smolska-Ciszewska, M. Gigłok, K. Dulik, T. Czerw, M. Sobczyk-Kruszelnicka, I. Mitrus, M. Sokół, A. Maciejewski, R. Suwiński, S. Giebel, K. Składowski.

Celem programu badawczego była analiza zależności pomiędzy stężeniem osteopontyny (OPN), rozpuszczalnym receptorem VEGF-1 (sFlt-1) – białek związanych z niedotlenieniem i angiogenezą oraz wskaźników czerwonych a wynikami leczenia u chorych na raka regionu głowy i szyi (RGiSz) oraz niedrobnokomórkowego raka płuc (NDRP).

Badania OPN i morfologii krwi wykonano u 563 chorych, erytropoetyny (Epo) u 228, receptorów erytropoetynowych (EpoR) u 74, natomiast u sFlt-1 205 u chorych na raka płaskonabłonkowego regionu głowy i szyi. Mediana wieku wynosiła 65 lat. Badania laboratoryjne wykonano przed i po leczeniu. Morfologię krwi wykonano za pomocą analizatora hematologicznego Sysmex XE-2100, badanie Epo wykonano metodą chemiluminescencji enzymatycznej wzmocnionej (Immulite 2000xPi), sFlt-1 metodą elektrochemiluminescencji (Cobas 801), stężenie OPN i EpoR wykonano metodą ELISA na analizatorze Elisa-Mat. Analizie poddano grupę chorych na raka: nosogardła (3%), jamy ustnej (8%), gardła środkowego (32%), gardła dolnego (13%),

krtani (44%), zakwalifikowanych do radioterapii (RT) (44%), chemio-radioterapii (ChT/RT) (30%) lub indukcyjnej ChT z następową ChT/RT lub RT (26%).

W grupie chorych z obniżonym stężeniem Hb (poniżej 11 g/ml) **przed leczeniem** wykazano ujemną korelację z młodą frakcją retikulocytów (IFR) ($p=0,0001$), Epo ($p=0,0001$) i OPN ($p=0,0004$) oraz dodatnią korelację z sFlt1 ($p=0,04$). Stwierdzono, że u chorych z wyższą liczbą retikulocytów (Ret) ($p=0,01$) oraz IFR ($p=0,03$) czas przeżycia wolnego od choroby (DFS) był istotnie krótszy od DFS chorych, u których liczba Ret i IFR była poniżej przyjętej wartości odniesienia. Dodatkowo, zaobserwowano niższy odsetek przeżyć z wyleczeniem lokoregionalnym (LRC) u chorych z wyższym stężeniem Epo od LRC chorych, oraz u których EPO było poniżej wartości mediany. Również wyższe od 8,9 mIU/ml stężenie Epo przed leczeniem związane było z gorszym rokowaniem chorych ($p=0,0001$). W analizie wielowariantowej stężenie Epo było niezależnym (od cechy T, N i anemii) czynnikiem prognostycznym $p=0,04$. W analizie jednoczynnikowej OPN przed leczeniem było niezależnym czynnikiem prognostycznym czasu przeżycia całkowitego (OS). U chorych ze stwierdzoną anemią stężenie OPN było istotnie wyższe (95 ng/ml) od stężenia OPN u chorych bez anemii (65 ng/ml).

Po leczeniu stwierdzono, że u chorych z anemią istnieje ujemna korelacja z młodą frakcją retikulocytów (IFR) ($p=0,0001$) oraz Epo ($p=0,0006$).

Dodatkowo, stwierdzono że chorzy zakwalifikowani do indukcyjnej chemioterapii z następową chemio/radioterapią mieli statystycznie wyższe stężenia Epo w porównaniu z grupą chorych leczonych samodzielnie RT lub ChT/RT.

Drugą grupę badaną stanowiło 129 chorych leczonych z powodu NDRP. Stopień zaawansowania klinicznego oceniono jako IA (2%), IB (3%), IIA (3%), IIB (4%), IIIA (37%), IIIB (35%), IV (19%). Mediana wieku wynosiła 64 lata. Chorych leczono za pomocą samodzielnej RT - 42 chorych, u 75 zastosowano ChT/RT, a 12 chorych otrzymało ChT. W badanej grupie chorych stężenie Hb niższe od 12 g/dl miało 56% badanych. U chorych ze stwierdzoną niedokrwistością zaobserwowano, w porównaniu do pozostałych chorych, istotnie wyższy odsetek: Retic ($p=0,003$), IFR ($p=0,0001$), wyższą Ret-Hb ($p=0,001$) oraz stężenie Epo ($p=0,0001$). Dodatkowo stwierdzono, że u chorych z wysokim odsetkiem IFR oraz wysokim stężeniem Epo czas przeżycia całkowitego (OS) był istotnie krótszy od OS chorych, u których stężenie było poniżej przyjętej wartości odniesienia. Wyższe od 16,9 mIU/ml stężenie Epo oraz wyższy odsetek IRF – 8,79% przed leczeniem związane były z gorszym rokowaniem dla tej grupy chorych.

U pacjentów onkologicznych niedokrwistość jest częstą chorobą, która może wpływać na skuteczność leczenia. Uzyskane powyższe wyniki wskazują na wzrost wydzielania endogennej Epo ze względu na hipoksję w guzie oraz subkliniczną hipoksję organizmu. Parametrem odzwierciedlającym intensywne działanie endogennej Epo jest zwiększona liczba retikulocytów i młodych form retikulocytów. Anemia, u chorych na RGiSz oraz NDRP, przed leczeniem posiada komponentę wzmożonej lecz nieefektywnej erytropoezy, o czym świadczą podwyższone stężenie Epo i wskaźniki młodych form krwinek czerwonych. Ten efekt kompensacyjny odzwierciedla jednak złe rokowanie, które być może jest konsekwencją aktywacji sEpoR w tej grupie pacjentów.

Brak korelacji pomiędzy obniżonym stężeniem Hgb, a wskaźnikami odnowy układu czerwokrwinkowego, w tym z młodymi formami retikulocytów u chorych po leczeniu systemowym prawdopodobnie wiąże się z mielosupresyjnym działaniem ChT na szpik kostny (RGiSz). Wzrost stężenia Epo oraz wtórnie wskaźniki laboratoryjne pobudzenia erytropoezy, przed leczeniem, są niekorzystnymi czynnikami predykcyjnymi, związanymi z większym prawdopodobieństwem niewyleczenia, wystąpienia wznowy czy przerzutu odległego.

Dodatkowo wykazano, że OPN przed i po zastosowanej terapii może odgrywać ważną rolę w procesie progresji guza i tworzenia przerzutów (RGiSz). Stężenie OPN wzrasta podczas leczenia i wskazuje na wczesny odczyn popromienny (RGiSz).

W kolejnym roku planuje się kontynuację badań, w tym oznaczenie EpoR i sFlt-1 w większej grupie chorych. W bieżącym roku, głównie materiał do badań był gromadzony i ze względu na duże zaangażowanie personelu ZAiBK w diagnostykę genetyczną wirusa SARS-CoV-2 analizy były kontynuowane w niewielkim zakresie, również udział w konferencjach oraz prezentowanie prac było mocno ograniczone.

Kolejnym celem programu badawczego było przeanalizowanie zależności pomiędzy wskaźnikami stanu zapalnego oraz stanu odżywienia w aspekcie odpowiedzi organizmu na rozwijający się proces nowotworowy oraz zastosowanego leczenia u chorych na RGiSz poddanych leczeniu operacyjnemu oraz radio i radio/chemioterapii. Analizie poddano grupę 408 chorych u których wykonano badanie CRP oraz morfologię krwi z różnicowaniem krwinek białych, u 335 – stężenie albuminy, natomiast u 145 stężenie prealbuminy. Badania wykonano u chorych na raka gardła górnego (4%), środkowego (39%), dolnego (13%), krtani (36%) oraz raka jamy ustnej (8%), zakwalifikowanych do radioterapii samodzielnej (53%) lub skojarzonej z chemioterapią (47%). U 47% chorych rozpoznano zaawansowanie raka w stopniu T1-2, u pozostałych 53% - w stopniu T3-4. Cechę N0 stwierdzono u 31%, a cechę N+ u 69% chorych. Morfologię krwi obwodowej z różnicowaniem krwinek białych, stężenie białka CRP albuminy oraz prealbuminy wykonano przed leczeniem. W trzystopniowej skali mGPS przyjęto: mGPS 0 dla CRP < 10 mg/l i albuminy > 35 g/l, mGPS 1 dla CRP > 10 mg/l i albuminy > 35 g/l oraz mGPS 2 dla CRP > 10 mg/l i albuminy < 35 g/l. Analiza jednoczynnikowa wykazała, że podwyższona liczba leukocytów (WBC) (p=0.002), wysoki wskaźnik NLR (p=0,03) są czynnikami wpływającymi na krótszy czas przeżycia wolnego od choroby (DFS). Również znamieny wpływ na DFS miał wysoki wskaźnik mGPS (p=0.006), wysokie stężenie: prealbuminy (p=0,04), albuminy (p=0,03) oraz CRP (p=0,0023). Dodatkowo wykazano, że wysoka liczba WBC (p=0,001), NLR (p=0,01) oraz CRP (p=0,03) są złym czynnikiem prognostycznym czasu przeżycia całkowitego w tej grupie chorych.

U pacjentów z rakiem głowy i szyi po radioterapii w monoterapii lub w skojarzeniu po chemioterapii wysokie początkowe poziomy WBC, NLR, CRP oraz niskie stężenie prealbuminy i albuminy wydają się przewidywać gorsze wyniki leczenia. Niski poziom wskaźników zapalnych, takich jak liczba leukocytów, liczba neutrofilii, mGPS i wysoka liczba limfocytów może być związana z dłuższym OS w tej grupie pacjentów

W kolejnym roku planowane jest wykonanie badania Il-6, które zostało wprowadzone do rutynowej diagnostyki laboratoryjnej, oraz wykonanie analizy białek: prealbumina, ferrytyna, transferryna oraz rozpuszczonego receptora transferyny.

Ostatnim celem programu badawczego było potwierdzenie przydatności lipokainy związanej z żelatynazą neutrofilii (NGAL), jako markera uszkodzenia nerek (wyprzedzającego wzrost stężenia kreatyniny i cystatyny

C, która być może pozwoli na zastosowanie interwencji klinicznej w postaci redukcji bądź odstawienia leków o działaniu nefrotoksycznym. Próbkę do badań diagnostycznych pobierano przed rozpoczęciem kondycjonowania, w dniu przeszczepienia oraz w 7, 14, 21 i 28 dobie po przeszczepieniu.

Zgromadzono dane od 36 pacjentów (16 kobiet i 20 mężczyzn, mediana wieku 47 lat, zakres 21-69 lat), leczonych przeszczepieniem allogenicznych komórek krwiotwórczych, z wykorzystaniem komórek od dawców niespokrewnionych (22 przypadki), spokrewnionych zgodnych w układzie HLA (9 przypadków) lub spokrewnionych haploidentycznych (5 przypadków). Wskazaniem do leczenia były: AML (13 pacjentów), HNL (8 pacjentów) lub inne choroby układu krwiotwórczego.

U 35 pacjentów poziom NGAL przed rozpoczęciem kondycjonowania był prawidłowy, u jednego nieznacznie przekraczał normę (mediana 6,8; zakres 0,4-140 ng/μl). W dniu przeszczepienia nie stwierdzono znamienych różnic statystycznych w poziomie NGAL w porównaniu z wartościami sprzed kondycjonowania (mediana 10,7, zakres 0,9-874 ng/μl, p=0,13, test par wiązanych). W kolejnych punktach pomiarowych stwierdzono następujące wartości:

+ 7 doba: mediana 14,0, zakres 1,4-2976,4 ng/μl, p=0,30;

+ 14 doba: mediana: 16,5; zakres: 1,4-729,8 ng/μl, p=0,05

+ 21 doba: mediana: 20,9; zakres: 2,6-4703,0 ng/μl **p=0.003**

+ 28 doba: mediana: 19,4, zakres 2,6-1217,0 ng/μl **p=0.012**

Sprawdzono korelacje pomiędzy stężeniem NGAL w moczu, a następującymi parametrami: stężeniem kreatyniny w moczu (brak korelacji) oraz kreatyniny w surowicy krwi, eGFR i poziomem białka C-reaktywnego (w przypadku wszystkich tych trzech parametrów p<0.001). Następnie sprawdzono, czy stężenie NGAL w +14 dobie po przeszczepianiu może pełnić rolę markera, pomagającego określić ryzyko powikłań po przeszczepie,

Pacjentów podzielono na 2 grupy, zależnie od stężenia NGAL w +14 dobie po przeszczepieniu.

	NGAL < 131,7 ng/μl	NGAL >131,7 ng/μl	p
Doba wypisu (mediana, zakres)	27 (21-64)	44 (31-67)	0,0023
Liczba zgonów w trakcie pierwszego pobytu	2 (na 6 pacjentów)	1 (na 30 pacjentów)	

Wniosek: Na podstawie stężenia NGAL w moczu, oznaczonego w +14 dobie, można wyodrębnić grupę pacjentów, którzy – ze względu na powikłania – są zagrożeni dłuższym pobytem na oddziale.

Wykonano również badania NGAL, kreatyniny oraz kreatyniny w moczu w grupie 150 chorych na raka płaskonabłonkowego regionu głowy i szyi. Oznaczenia wykonano u chorych zakwalifikowanych do indukcyjnej chemioterapii przed leczeniem, 6 godz. po podaniu cisplatyny oraz w drugiej dobie po ChT. W najbliższym czasie planuje się wykonanie analizy statystycznej oraz przygotowanie manuskryptu do czasopisma.

W 2021 roku planowana jest kontynuacja gromadzenia materiału biologicznego oraz sukcesywne wykonywanie badań. Również przeprowadzona analiza wyników badań laboratoryjnych z wynikami leczenia uzyskanych dla każdej grupy chorych. Wstępne wyniki badań związanych z realizacją projektu pod kątem wykorzystania markerów zapalnych i markerów procesu angiogenezy mogą mieć znaczenie w optymalizacji leczenia chorych na RGiSz oraz NDRP. W roku 2021 planowane jest przygotowanie maszynopisu do publikacji w czasopiśmie z IF.

W bieżącym roku, przede wszystkim był gromadzony materiał do badań. Personel ZAiBK został powołany decyzją Wojewody Śląskiego do walki z pandemią i realizował w głównej mierze badania genetyczne wirusa SARS-CoV-2, wykonując w ciągu roku ponad 50 tys. badań, dlatego ze względu na duże zaangażowanie personelu ZAiBK w diagnostykę genetyczną wirusa SARS-CoV-2 analizy były kontynuowane w niewielkim zakresie, również udział w konferencjach oraz prezentowanie prac było mocno ograniczone.

5.8. Opracowanie wieloparametrycznych protokołów akwizycji obrazów MRI w polu 9.4 T do oceny efektów terapeutycznych u myszy.

Kierownik: Maria Sokół

Wykonawcy: M. Sokół, A. Skorupa, Ł. Boguszewicz, M. Cizek, B. Bobek-Billewicz, A. Orlef

W roku 2020 kontynuowano badania przydatności skanera MRI 9.4 T w odczycie dawki promieniowania fotonowego zaabsorbowanej w żelach polimerowych Viparnd. Opracowana technika może być użyteczna w pomiarach rozkładów dawek generowanych przy użyciu małych pól napromieniania (poniżej 3 x 3 cm²), dużych dawek frakcyjnych i szerokiego zakresu dawek w polu napromieniania (5-25 Gy). Wyniki tych badań będą miały zastosowanie przy stosowaniu wieloparametrycznych protokołów akwizycji obrazów MRI myszy. Celem pracy było zbadanie przydatności żelu polimerowego VIPARnd w dozymetrii 3D małych pól. Odczyt dawki odbywał się metodami mikroobrazowania MR w polu 9,4 T, co pozwala na pomiary rozkładu dawki z dużą rozdzielczością przestrzenną. Żel polimerowy został umieszczony w półcieniu wiązki pola o wymiarach 10 cm × 10 cm. Uzyskany rozkład dawki porównano z danymi referencyjnymi otrzymanymi z pomiarów rozkładu przeprowadzonych za pomocą detektora diodowego i dozymetrii filmowej.

Metodyka: Próbkę VIPARnd (o średnicy zewnętrznej 3 cm i wysokości 12 cm) poddano działaniu promieniowania jonizującego przy użyciu akceleratora liniowego (Varian TrueBeam, USA; wiązka promieniowania rentgenowskiego 6 MV). Na etapie kalibracji dziewięć fiolek dozymetru żelowego naświetlano w fantomie wodnym jednorodnie w dawkach od 1,5 do 30 Gy w celu uzyskania zależności szybkości relaksacji R2 od dawki. Na etapie weryfikacji dwie fioleki dozymetru żelowego zostały napromieniowane w obszarze półcienia wiązki pola promieniowania 10 × 10 cm przy użyciu ilości jednostek monitorowych wystarczającej do dostarczenia 20 Gy w centrum pola. Żele zobrazowano na pionowym skanerze do mikroobrazowania technikami rezonansu magnetycznego (MR) 9,4 T, stosując sekwencje multiecho (90 × 7 ms) dla pojedynczej warstwy i wielowarstwowe (9 warstw) przy rozdzielczości przestrzennej 0,2–0,4 × 0,2–0,4 × 3 mm³ i 0,2–0,4 × 0,2–0,4 × 1 mm³. Żele mikroobrazowano przez okres dwóch tygodni po naświetlaniu. Dane referencyjne składały się z profili dawki mierzonych za pomocą dozymetrii diodowej, filmu radiochromowego, komory jonizacyjnej i systemu fantomu wodnego.

Wyniki: System mikroobrazowania rozkładu dawki VIPARnd – 9,4 T MR charakteryzował się czułością $0,0067 \pm 0,002 \text{ Gy}^{-1} \text{ s}^{-1}$ w 3. dobie po naświetlaniu. Rozdzielczość dawki przy 10 Gy (przy $p = 95\%$) była równa 0,42 Gy w 3. dniu po napromienianiu z użyciem sekwencji pojedynczej warstwy ($0,2 \times 0,2 \times 3 \text{ mm}^3$) i 2,0 Gy w 4. dniu po napromienianiu sekwencją wielowarstwową ($0,2 \times 0,2 \times 1 \text{ mm}^3$) dla jednej akwizycji sygnału (czas pomiaru: 15 minut). Wartości te można poprawić $\sim 1,4$ -krotnie przy użyciu czterech akwizycji dla pojedynczej warstwy i $\sim 2,78$ -krotnie przy zastosowaniu 12 akwizycji w sekwencji wielowarstwowej. Ponadto zmniejszenie rozdzielczości w płaszczyźnie z $0,2 \times 0,2 \text{ mm}^2$ do $0,4 \times 0,4 \text{ mm}^2$ skutkowało rozdzielczością dawki 0,3 Gy i 1 Gy przy 10 Gy (przy $p = 95\%$) dla jednej akwizycji sygnału odpowiednio dla sekwencji pojedynczej warstwy i wielowarstwowej, (czas pomiaru: 7,5 minuty).

Analiza indeksu gamma wykazała, że rozkłady dawek mierzone w 3-4 dniach po napromienianiu przy użyciu obu fantomów weryfikacyjnych VIPARnd są zgodne z danymi uzyskanymi przy użyciu diody krzemowej, przy założeniu kryterium 1 mm/5%. Dobrą powtarzalność międzyfantomową dozymetrii żelu polimerowego potwierdzono poprzez monitorowanie dwóch fantomów do 10 dni po naświetlaniu. Jednak zgodność między rozkładami dawek mierzonymi przy użyciu diody i żelu polimerowego pogarszała się począwszy od 5 dnia po naświetlaniu.

Wniosek: Badanie to wykazało, że system mikroobrazowania VIPARnd – 9.4T MR umożliwia uzyskanie rozdzielczości dawki 0,42 Gy przy 10 Gy (przy $p = 95\%$) przy rozdzielczości przestrzennej $0,2 \times 0,2 \times 3 \text{ mm}^3$ (czas akwizycji: 15 minut). Konieczne są dalsze badania, aby poprawić czasową stabilność rozkładu dawki na bazie żelu.

Formy prezentacji wyników:

Publikacja w Medical Physics (**IF = 3.317**): Skorupa A, Woźnica A, Cizek M, Staniszewski M, Kijonka M, Kozicki M, Woźniak B, Orlef A, Polański A, Boguszewicz Ł, Sokół M. *Application of high field magnetic resonance microimaging in polymer gel dosimetry*. Med Phys. 2020 Aug;47(8):3600-3613. doi: 10.1002/mp.14186. Epub 2020 May 15. PMID: 32301510; PMCID: PMC7496647.

5.9. Weryfikacja przydatności metody beznacznikowej izolacji nowotworowych komórek krążących z wykorzystaniem układów mikroprzepływowych do detekcji i ilościowej oceny HPV – pozytywnych komórek raka płaskonabłonkowego.

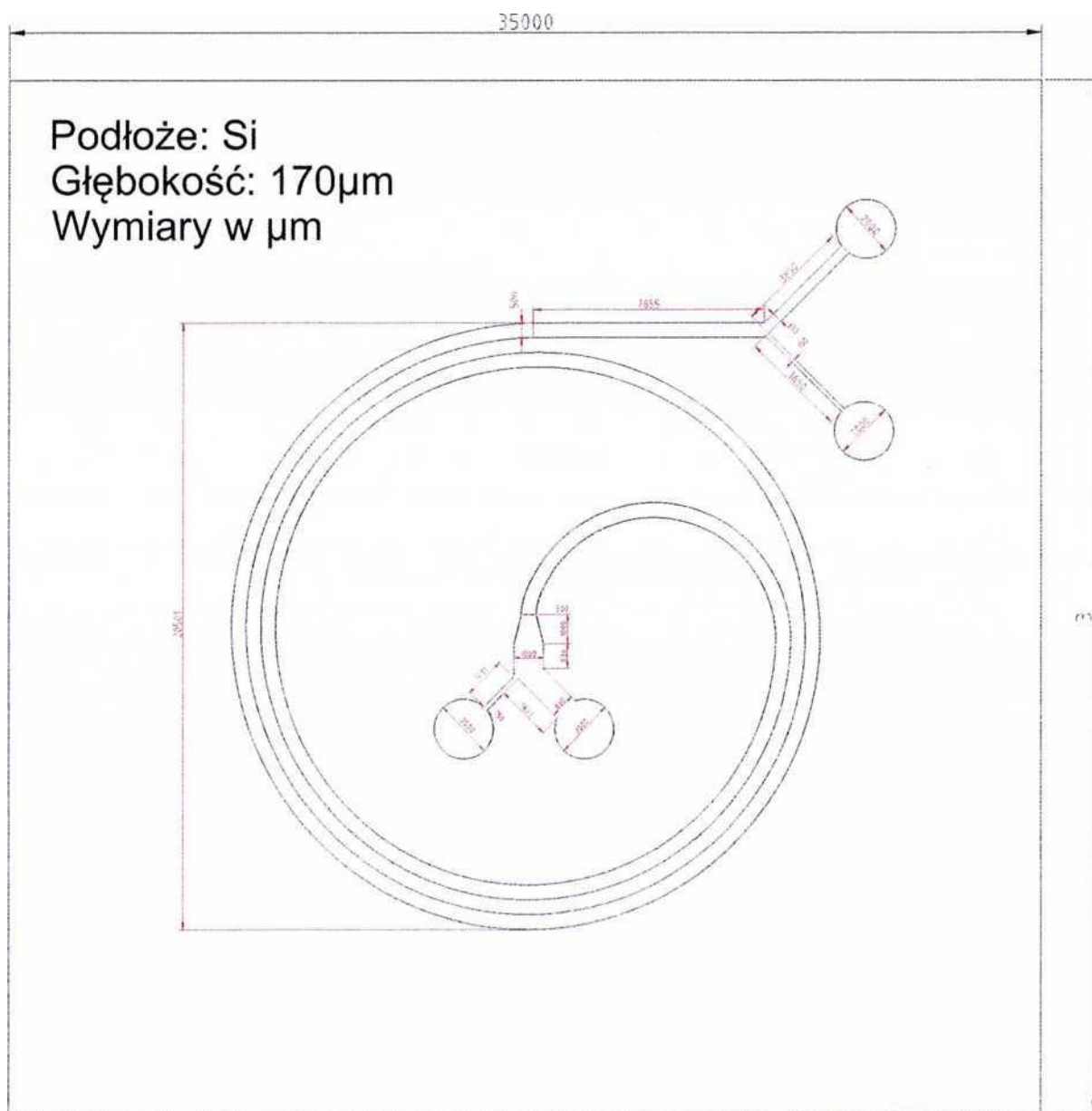
Kierownik M. Śnietura

Wykonawcy: M. Śnietura, W. Pięłowski, A. Kopeć, K. Gajda, A. Czuba, S. Student

Celem projektu jest opracowanie i wytworzenie metodą miękkiej litografii w PDMS układu mikroprzepływowego zawierającego spiralny kanał o parametrach zoptymalizowanych pod kątem izolacji z krwi pełnej nowotworowych komórek krążących raka płaskonabłonkowego regionu głowy i szyi. Przedmiotem pierwszego etapu projektu było zaprojektowanie kanału spiralnego i jego wykonanie metodą miękkiej litografii w PDMS. Z powyższych zadań zrealizowano:

- a. Wykonano projekt układu mikroprzepływowego wraz z symulacją komputerową
- b. Metodą litografii elektronowej wytworzono maski macierzyste na podłożach krzemowych
- c. Wykonano repliki robocze z PDMS na potrzeby wytworzenia właściwych układów mikroprzepływowych.

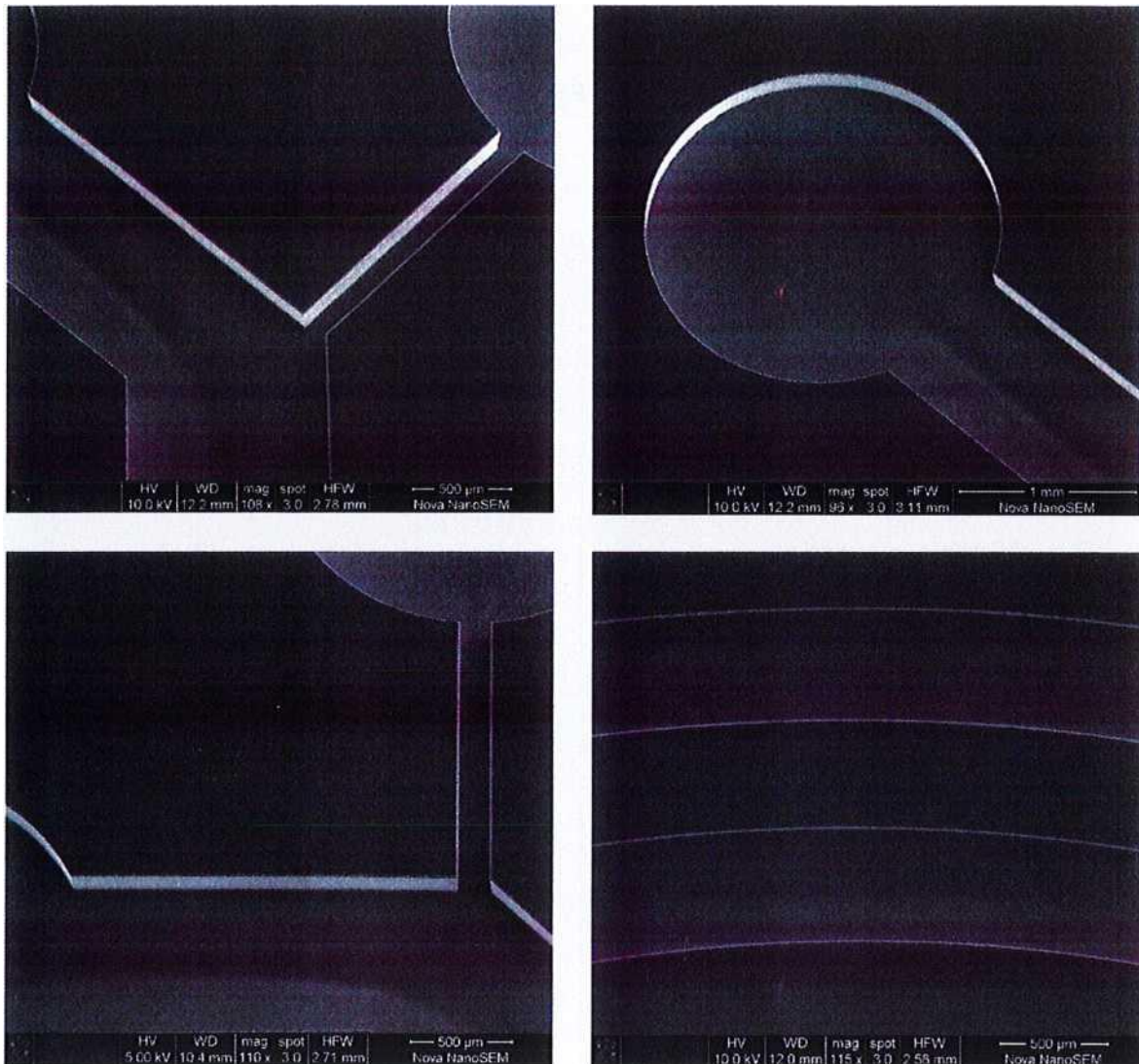
W wyniku wykonanych obliczeń oraz symulacji numerycznych zaproponowane zostały parametry geometryczne spiralnego kanału będącego zasadniczym elementem układu mikroprzepływowego separatora komórek nowotworowych. Przy założeniu minimalnej średnicy komórek raka płaskonabłonkowego wynoszącej 10 μ m spiralny kanał o przekroju prostokątnym powinien mieć kształt spirali składającej się z 1,75 zwoju o przeciętnej średnicy 20mm. Przekrój poprzeczny kanału 500x170 μ m Schemat i parametry geometryczne



Rysunek 1 Projekt geometrii spiralnego kanału do izolacji nowotworowych komórek krgżgcych

układu przedstawiono na rysunku Rys 1.

Kanał wg powyższego projektu (pozytyw) wykonany został w Instytucie Technik Elektronowych w Warszawie w krążku monokrystalicznego krzemu metodą litografii elektronowej. Technika pozwala na osiągnięcie wysokiej precyzji i rozdzielczości poziomej uzyskanych struktur. Szczegóły wykonania przedstawione zostały na obrazach ze skaningowego mikroskopu elektronowego (Rys 2). Uwagę zwraca wysoce pożądana duża stromość brzegów kanału.



Rysunek 2 Mikrofotografie SEM obrazujące szczegóły wykonania maski układu mikroprzepływowego

Litografia elektronowa z użyciem klisz (jak w przyjętym rozwiązaniu) charakteryzuje się jednak stosunkowo słabą możliwością kontrolowania głębokości uzyskanych struktur. W związku z tym konieczne było wykonanie serii masek spośród których wyselekcjonowano spełniające kryteria zadanej głębokości trawienia (170 pm). Ponieważ parametr ten jest trudny do kontrolowania i wymaga każdorazowo indywidualnego dobrania parametrów (czasu trawienia i gęstości wiązki) podjęto próbę (przy współpracy z Politechniką Śląską) zastosowania alternatywnej metody fotolitografii z wykorzystaniem żywicy światłoczułej SU-8 (zgodnie z założeniami projektu).

Wydłużeniu uległ czas realizacji projektu w związku z przedłużeniem prac projektowo-symulacyjnych nad układem mikroprzepływowym oraz na etapie wykonania struktur przez podmiot zewnętrzny (w związku z pandemią COVID-19). W związku z tym przesunięciu w czasie uległo także wydatkowanie części środków niezbędnych na późniejszych etapach prac związanych z weryfikacją laboratoryjną funkcjonowania wytworzonych struktur.

6.1. Optmalizacja i indywidualizacja terapii przeciwnowotworowej w nowotworach układu wydzielania wewnętrznego

Kierownik: B. Jarzqb

6.1.1. Ocena wyników leczenia uzupełniającego jodem promieniotwórczym chorych na zróżnicowanego raka tarczycy pośredniego ryzyka nawrotu choroby nowotworowej - prospektywne badanie obserwacyjne.

Wykonawcy: D. Handkiewicz-Junak, A. Kluczevska-Galka, D. Rusinek, J. Roskosz, A. Ledwon, E. Paliczka-Cieślík, A. Kropińska, Z. Puch, T. Olczyk, D. Syguła

Zgodnie z wytycznymi Amerykańskiego Towarzystwa Tyreologicznego uzupełniające leczenie zróżnicowanego raka tarczycy jest wskazane u chorych wysokiego ryzyka, natomiast brak jest wskazań gdy ryzyko nawrotu choroby nowotworowej jest niskie. Zalecenia dotyczących chorych pośredniego ryzyka są niejednoznaczne. Jednocześnie najnowsze zalecenia wprowadzają szereg nowych patomorfologicznych (np. inwazja naczyniowa, wielkość przerzutowo zmienionych węzłów chłonnych) i molekularnych (mutacje *BRAF*, *TERT*) czynników prognostycznych, które do tej pory nie były rutynowo oceniane podczas kwalifikacji chorych do leczenia uzupełniającego jodem promieniotwórczym.

Celem pracy jest:

1. Ocena ryzyka nawrotu choroby nowotworowej w czasie dwóch lat od leczenia uzupełniającego jodem promieniotwórczym u chorych na zróżnicowanego raka tarczycy pośredniego ryzyka leczonych jodem
2. Ocena przydatności scyntygrafii poterapeutycznej w ocenie zaawansowania choroby nowotworowej
3. Ocena ryzyka nawrotu choroby w zależności od patomorfologicznych i molekularnych czynników prognostycznych.
4. Ustalenie algorytmu monitorowania chorych

Badanie ma charakter prospektywnego badania obserwacyjnego, do którego kwalifikowani są chorzy z rozpoznaniem zróżnicowanego raka tarczycy z grupy pośredniego ryzyka nawrotu choroby zakwalifikowani do uzupełniającego leczenia ¹³¹I.

Do września 2020 do badania włączono planowanych 350 chorych, ze względu na epidemię Covid-19 rekrutację przedłużono. Większość chorych stanowiły kobiety 287 (82%) z rozpoznaniem raka brodawkowatego tarczycy 315 (90%). U ponad połowy chorych przyporządkowanie do grupy pośredniego ryzyka wynikało z naciekania tkanek miękkich poza tarczycowych (57%), lub mikroprzerzutów do węzłów chłonnych (33%). W badaniach scyntygraficznych u 2 chorych wysunięto podejrzenie mikro-rozsiewu do płuc, u 3 przerzutów do kości oraz u 6 przerzutów do węzłów chłonnych.

Przebadano również 100 chorych w ramach kontrolnej scyntygrafii – nawrót choroby nowotworowej stwierdzono u 4 chorych (4%); pozostałe badania są w trakcie opracowywania. W roku 2021 planowana jest publikacja podsumowująca wynik oceny scyntygraficznej i wczesnej odpowiedzi na leczenie

131-I. Jednocześnie będą dalej uzupełniane badania scyntygrafii diagnostycznej oceniającej ostateczny wynik leczenia (wykonywany około 2 lata po leczeniu izotopowym).

W ramach realizacji badania w roku 2020 przygotowano artykuł poglądowy "Follow-up of low-risk thyroid cancer patients: can we stop follow-up after 5 years of complete remission" Livia Lamartina and Daria Handkiewicz-Junak, *Europ J Endocrinol* 2020, 182, D1-D16. Artykuł ten był przygotowywany we współpracy z prof. Livią Lamartiną z Instytutu Gustave-Roussy w Villejuif pod Paryżem. W załączeniu przedstawiamy kopię artykułu. Przygotowano także pracę oryginalną „Thyroglobulin measurement after rhTSH aided RAI treatment has prognostic implications in follow-up of differentiated thyroid cancer” A. Ledwon, E. Paliczka-Cieślik, A. Syguła, T. Olczyk, A. Blewążka, Z. Puch, J.F Roskosz, K.A Hasse-Lazar, A.A Kluczevska-Gałka, B. Jarzab, D. Handkiewicz-Junak. Manuskrypt pracy w załączeniu.

Podsumowanie wyników dotyczących leczenia w scyntygrafii diagnostycznej planowane jest na III kwartał 2021 r.

6.1.2. Dozymetryczna ocena leczenia radiojodem raka tarczycy - standaryzacja metody stałego monitorowania dawki.

Wykonawcy: A. Kluczevska-Gałka, D. Handkiewicz-Junak, L. Wojciuch, A. Majewska-Ciba, A. Kleczko, N. Kosiak, T. Gawlik, J. Krajewska, A. Król

1. OPIS stosowanych metod:

Leczenie radiojodem I-131 (jodem radioaktywnym/promieniotwórczym I-131) to metoda stosowana w terapii zróżnicowanego raka tarczycy (ZRT), zwykle po leczeniu chirurgicznym. Terapia jodem radioaktywnym jest bezpieczną, dobrze tolerowaną i skuteczną metodą leczenia prowadzoną w trybie kilkudniowej hospitalizacji na oddziale terapii izotopowej.

Hospitalizacja pacjenta jest w głównej mierze związana z koniecznością zachowania szczególnych zasad bezpieczeństwa i ochrony radiologicznej przed niepożądanym i niekorzystnym wpływem promieniowania jonizującego w stosunku do rodziny pacjenta, osób postronnych oraz narażonych zawodowo. Przez kilka dni po zażyciu kapsułki z I-131, pacjenci muszą przebywać w odizolowanym pomieszczeniu, wyposażonym w specjalne instalacje sanitarne do zbierania radioaktywnego moczu. W tym czasie nie mogą spotykać się z rodziną w celu zachowania bezpieczeństwa radiacyjnego.

Radiofarmaceutyki stosowane w terapii należą do grupy wysokoenergetycznych, emitujących krótko zasięgowe promieniowanie beta, które dzięki swoim właściwościom działa niszcząco na komórki nowotworowe. Jednakże, w leczeniu izotopowym I-131 prócz promieniowania beta, wytwarzane jest również promieniowanie o większym zasięgu, czyli gamma. Zatem pacjent po przyjęciu izotopu promieniotwórczego, sam staje się jego źródłem. Promieniotwórczy jod-131 gromadzi się głównie w tarczycy chorego (ewentualnych przerzutach lub innych narządach mających zdolność jego gromadzenia m.in. śliniankach). Duża część izotopu promieniotwórczego wychwycona przez tarczycę, pozostaje tam aktywna przez około kilka tygodni. Część podanej dawki radiofarmaceutyku w ciągu

pierwszych kilku dni od leczenia I-131 wydalą się wraz z moczem, potem i kałem. Z tego powodu, chory po wypisaniu do domu pozostaje przez pewien czas źródłem promieniowania jonizującego. Wydzieliny jego ciała (przede wszystkim mocz, ale także łzy, pot, ślina itp.) mogą zawierać izotop promieniotwórczy. W celu ograniczenia ryzyka niepotrzebnego napromieniowania domowników i osób mających kontakt z chorym, konieczne jest przestrzeganie szczególnych zasad ochrony radiologicznej.

Po opuszczeniu oddziału zamkniętego, chorzy mogą przebywać w domu z bliskimi, bo czas kiedy promieniowanie jest najintensywniejsze, został spędzony w przystosowanym do tego oddziale szpitalnym. Należy jednak zachować ostrożność wobec osób do lat 18 oraz kobiet w ciąży i nie zbliżać się do nich na bliską odległość (zachowywać odpowiedni dystans). Taki okres kwarantanny trwa zwykle ok. 14 dni od opuszczenia szpitala, co bezpośrednio jest związane z retencją radiojodu w organizmie pacjenta.

Bezpieczeństwo radiacyjne personelu, jest nie mniej istotne z punktu widzenia zapewnienia bezpiecznych warunków pracy dla osób z personelu, którzy codziennie mają kontakt z kilkunastoma pacjentami w trakcie gdy są oni źródłem największej mocy dawki promieniowania. Wówczas emitowana przez takich pacjentów dawka jest wielokrotnie wyższa i bardziej szkodliwa niż po opuszczeniu oddziału przez pacjenta. Ponadto, ze względu na wysoki zakres promieniowania radiacyjnego emitowanego przez pacjenta poddanego leczeniu promieniotwórczemu I-131, ryzyko napromieniowania i wchłonięcia lotnego I-131 przez personel szpitala jest kluczowe. Dzięki wykorzystaniu w NIO-PIB systemu PADOS, ryzyko radiacyjne personelu w znaczący sposób zostaje ograniczone, ponieważ automatyzacja pomiaru mocy dawki promieniowania emitowanego przez pacjenta wyklucza manualny pomiar radiometrem poziomu promieniowania pacjenta, który musi zostać wykonany każdorazowo przed decyzją o możliwości wypisu pacjenta do domu.

System PADOS umożliwia okresowy pomiar i zapis aktualnej aktywności oraz dawki po podaniu kapsułki terapeutycznej. Detektory zamontowane są nad łózkami pacjentów (na suficie), dla każdego z pacjentów osobno w odległości ok. 2 m od powierzchni ciała pacjenta. Jako detektor używana jest sonda scyntylacyjna NaI (jodek sodu). Za pomocą seryjnego interfejsu detektory są podłączone do centralnego komputerowego systemu sterowania.

Zmierzone wartości mocy dawki (uSv/h) są zapisywane i przechowywane w systemie komputerowym. Do monitoringu stosowane są jedynie wartości zmierzone w stałych odstępach czasu. Na podstawie zarejestrowanych wyników, system komputerowy wylicza możliwy czas osiągnięcia aktywności poniżej limitu umożliwiającego wypisanie pacjenta z oddziału szpitalnego (poniżej pewnego progu wartości promieniowania, który uznawany jest za bezpieczny dla otoczenia – poniżej 5 uSv/h). Optymalizuje to planowanie terapii na oddziale a dodatkowo, dzięki możliwości zdalnego sterowania, zwiększa bezpieczeństwo radiacyjne personelu – personel medyczny nie styka się bezpośrednio z promieniującym pacjentem.

2. MATERIAŁ I METODY:

W terapii jodem 131 stosuje się szeroki zakres aktywności od 30 do 150 mCi, a w rzadkich sytuacjach nawet więcej. Stosowane aktywności zależą od stopnia zaawansowania choroby i innych czynników towarzyszących. Moc dawki promieniowania od pacjentów poddanych terapii I-131 jest monitorowana w trybie ciągłym za pośrednictwem systemu PADOS.

Na chwilę obecną wybrano, odfiltrowano i wyselekcjonowano pomiary spadku mocy dawki promieniowania dla grupy 200 kobiet oraz 200 mężczyzn. Zakres wieku kobiet mieści się w przedziale od 20-72 lat, natomiast dla mężczyzn od 21-87 lat. Każda z podgrup została dodatkowo podzielona na pacjentów w wieku do i powyżej 45 roku życia, ze względu na specyficzne uwarunkowania wydzielnicze.

Dodatkowo, dla ponad 150 pacjentów, zebrano równoległe pomiary próbek krwi w ściśle określonym reżimie czasowym: po 2, 6, 24, 48 i 70 godzinach od podania radiofarmaceutyku. Pomiary radioaktywności tych próbek wykonano przy użyciu komory studzienkowej ISOMED 1010. Po opracowaniu wykonanych pomiarów określona zostanie retencja I-131 we krwi pacjenta i skorelowana z pomiarami otrzymanymi przy użyciu systemu PADOS.

3. ANALIZA WYNIKÓW – w trakcie:

Na obecnym etapie analizy, po odfiltrowaniu z szumów pomiarów dozymetrycznych spadku mocy dawki promieniowania jonizującego z umiejscowienia odpowiadającego lokalizacji tarczycy, przeprowadza się porównanie retencji radiofarmaceutyku I-131 w podgrupach wiekowych dla mężczyzn i kobiet. Analiza pozwoli odpowiedzieć na pytanie, czy istnieją statystycznie istotne różnice w emisji, charakterze oraz w spadku mocy dawki promieniowania w obrębie płci oraz w wydzielonych grupach wiekowych u pacjentów poddanych terapii promieniotwórczym I-131 zróżnicowanego raka tarczycy.

4. WNIOSKI:

Automatyczny system monitorowania mocy dawki promieniowania pochodzącej od pacjenta w trakcie trwania terapii izotopowej, zapewnia doskonałe narzędzie w zdecydowanym stopniu ograniczające ryzyko radiacyjne dla personelu opiekującego się pacjentem po podaniu promieniotwórczego I-131. Taki sposób pomiaru, umożliwił wyeliminowanie manualnego pomiaru radiometrem. To w istotny sposób wpływa na obniżenie niekorzystnego działania promieniowania jonizującego na personel wykonujący pomiary dozymetryczne i opiekujący się pacjentem.

6.1.3. Leczenie analogami somatostatyny po leczeniu izotopowym nowotworów neuroendokrynych – ocena efektów leczenia i poszukiwanie czynników prognostycznych.

Wykonawcy: A. Sygula, D. Handkiewicz-Junak, B. Jurecka-Lubieniecka, A. Kluczevska-Gałka, K. Hasse-Lazar, A. Ledwon, E. Paliczka-Cieślak, T. Olczyk, B. Michalik, K. Drosik-Rutowicz, B. Jarczyk

Doniesienia literaturowe dotyczące kojarzenia leczenia analogami somatostatyny znakowanymi izotopowo oraz analogami ‘zimnymi’ w nowotworach neuroendokrynych (NEN) są nieliczne. Jeszcze

mniej doniesień dotyczy wskazań do natychmiastowego włączenia lub kontynuacji bioterapii analogami somatostatyny po zakończonym leczeniu izotopowym. Kolejnym istotnym elementem postępowania w nowotworach neuroendokrynnych poza łączeniem różnych form terapii jest monitorowanie i planowanie dalszego postępowania uwzględniającego czynniki prognostyczne. W monitorowaniu leczenia chorych z rozpoznaniem NEN szeroko stosowane jest oznaczenie stężenia chromograniny A (CgA) nieswoistego markera wydzielanego z ziarnistości cytoplazmatycznych komórek neuroendokrynnych. W badaniu RADIANT-1 (lit) oceniającym skuteczność leku everolimus (inhibitor mTOR) w leczeniu NEN trzustki stwierdzono, że spadek o co najmniej 30% stężenia CgA jest korzystnym czynnikiem prognostycznym w leczonej populacji chorych. Brak jest jednak takiej oceny po leczeniu izotopowym chorych na nowotwory neuroendokrynnne.

Celem pracy jest:

1. Ocena skuteczności leczenia izotopowego nowotworów neuroendokrynnych oraz wpływ konsolidacji leczenia izotopowego leczeniem ‘zimnym’ analogiem somatostatyny na przebieg choroby.
2. Ocena toksyczności terapii izotopowej.
3. Ocena wartości predykcyjnej chromograniny A w monitorowaniu efektów leczenia chorych z nowotworami neuroendokrynnymi.

W roku 2020 podsumowano wyniki czasu wolnego od progresji choroby u chorych leczonych analogami bezpośrednio po zakończeniu leczenia izotopowego, a grupą chorych, u których leczenie to włączano dopiero po wystąpieniu progresji. Uzupełniono dane dotyczące czasu całkowitego przeżycia. Wynikiem pracy jest wstępna wersja manuskryptu (w załączeniu) do uzupełnienia o medianę czasu przeżycia w obu ocenianych grupach.

W drugiej części badania przeanalizowano dane pochodzące od 150 chorych z NEN leczonych izotopowo i bioterapią analogami somatostatyny, w celu oceny wartości CgA jako czynnika prognostycznego. Nie stwierdzono istotnej korelacji między spadkiem stężenia CgA a odpowiedzią na leczenie izotopowe.

6.2. Retrospektywna analiza wyników leczenia u chorych w ramach NIO Oddziału w Gliwicach. Poszukiwanie nowych czynników predykcyjnych i prognostycznych na podstawie rutynowo wykonywanych badań obrazowych i laboratoryjnych oraz analiza metodyki leczenia pacjentów w ramach interdyscyplinarnych sposobów leczenia.

Kierownik: R. Tarnawski

6.2.1. Znaczenie kliniczne czasu między operacją a radiochemioterapią adjuwantową w leczeniu glejaka wielopostaciowego.

Wykonawcy: M. Miszczyk, I. Jabłońska, Ł. Magrowski, O. Masri, K. Rasławski, E. Nowicka, R. Tarnawski

Projekt jest zakończony, a wyniki zostały opisane i opublikowane w formie doniesień zjazdowych z konferencji ASTRO w czasopiśmie International Journal of Radiation Oncology Biology Physics

DOI: 10.1016/j.ijrobp.2020.07.2022.

Pełnotekstowy artykuł jest obecnie w trakcie recenzji w czasopiśmie Surgical Oncology.

6.2.2. Staging wolumentaryczny i RDW jako czynniki prognostyczne w nowotworach jamy ustnej i środkowego piętra gardła.

Wykonawcy: M. Miszczyk, I. Jabłońska, Ł. Magrowski, O. Masri, K. Rasławski, E. Nowicka, R. Tarnawski

Projekt jest w trakcie analizy danych dla staging-u wolumetrycznego, przewidywany czas zakończenia analiz i pisanie publikacji to koniec stycznia 2021. Analiza dot. wartości RDW została rozszerzona o wskaźniki NLR i PLR.

Aktualnie pełnotekstowa publikacja znajduje się w trakcie recenzji u opiekuna projektu (R. Tarnawskiego).

6.3. Przewidywanie odpowiedzi na chemioterapię na podstawie badania PET/TK pod kątem możliwości de-eskalacji leczenia raka piersi.

Kierownik: M. Jarzqb

Wykonawcy: A. Leśniak, M. Jarzqb

Raport w programie 4.10.

6.4. Ocena wczesnych i odległych parametrów wskazujących na ryzyko kardiotoxyczności chemioterapii przedoperacyjnej w kontekście gęstości dawki i sekwencji leczenia raka piersi.

Kierownik: M. Jarzqb

Wykonawcy: K. Świdarska, A. Badora-Rybicka, M. Jarzqb

Raport w programie 4.10.

6.5. Wolumetryczna i teksturalna ocena regresji guza pierwotnego u chorych na raka piersi w trakcie chemioterapii przedoperacyjnej – ocena na podstawie badań MRI i PET/TK.

Kierownik: M. Jarzqb

Wykonawcy: M. Stankiewicz, M. Jarzqb, M. Kaszuba, M. Mianowska-Malec, P. Malec, K. Krysiak, B. Lange, E. Nowicka, K. Wierdas, K. Trela-Janus, R. Szumniak, B. Bobek-Billewicz

Raport w programie 4.10.

6.6. Nowotwory tarczycy i inne nowotwory układu wydzielania wewnętrznego: indywidualizacja postępowania diagnostyczno-terapeutycznego na podstawie kliniczno-patologicznych i molekularnych czynników prognostycznych.

Kierownik A. Maciejewski

6.6.1. Rak brodawkowy tarczycy i nowotwory o niepewnym potencjale złośliwości – optymalizacja postępowania terapeutycznego w kontekście badań molekularnych.

Wykonawcy: A. Czarniecka, J. Krajewska, M. Jarząb, D. Rusinek, M. Oczko-Wojciechowska, E. Stobiecka, E. Chmielik, E. Zembala-Nożyńska, A. Sacher, G. Woźniak, B. Jarząb

Zadanie prowadzone w ramach projektu: Nowe molekularne narzędzia diagnostyki molekularnej i obrazowania w indywidualizowanej terapii raka piersi, tarczycy i gruczołu krokowego [Milestone]. STRATEGMED2/267 398/4/NCBR/2015 we współpracy z Zakładem Medycyny Nuklearnej i Endokrynologii Onkologicznej

Nadal podstawowym sposobem leczenia chorych na nowotwory tarczycy jest leczenie operacyjne. Jego zakres uzależniony jest od wyniku badania cytologicznego. Obecnie wobec większej dostępności do badań USG i badań biopsyjnych wzrasta liczba nowych rozpoznań raków tarczycy oraz guzów o niepewnym potencjale złośliwości (Bethesda III do V). Dla zmian ogniskowych o niepewnym potencjale złośliwości leczenie operacyjne jest często (w 70-85% przypadków) operacją diagnostyczną, po której stawiane jest rozpoznanie zmiany łagodnej, a zabiegu (obarczonego ryzykiem powikłań) można byłoby uniknąć. Stąd aktualne dążenie do opracowania nowoczesnych metod diagnostycznych pozwalających na przedoperacyjne określenie ryzyka złośliwości oraz konieczności, pilności i zakresu interwencji chirurgicznej.

Głównym celem wieloletniego projektu było opracowanie klasyfikatora molekularnego do diagnostyki zmian ogniskowych tarczycy w przedoperacyjnej biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej (BAC).

W ramach badania wyodrębniono 336 próbek do zbioru uczącego reprezentujących różne kategorie rozpoznań cytologicznych według Bethesda, różniące się ryzykiem złośliwości (Tab. 1).

Tab.1

Kategoria Bethesda	II	III	IV	V	VI
Liczba próbek	70	68	61	47	70

W tym zbiorze przeprowadzono analizę profilu ekspresji genów dla wyselekcjonowania genów do klasyfikatora molekularnego różnicującego zmiany łagodne od złośliwych (rozpoznanie cytologiczne weryfikowano w materiale pooperacyjnym pobranym w czasie operacji przeprowadzonych głównie w Klinice Chirurgii Onkologicznej i Rekonstrukcyjnej). Opracowanie klasyfikatora molekularnego wykonano metodą oceny profilu ekspresji RNA. Dla wyselekcjonowania genów przeprowadzono analizę pełnego transkryptomu metodą mikromacierzy DNA (HTA 2.0 Affimetrix/ThermoFisher). W obrębie zbioru uczącego opracowano 20 genowy klasyfikator molekularny o wysokiej czułości i swoistości porównywalnej do innych komercyjnych i prototypowych testów molekularnych (Tab. 2).

Tab.2

Test molekularny	Czułość	Swoistość	Źródło
Chudova 2012	92%	58%	Chudova, 2010
Analiza ekspresji genów (142/167) Affirma GEC GSC	91%	68%	Patel, 2018
Analiza ekspresji 1115 genów oraz mutacji 3 genów TGC-IVD	93%	81%	Gonzalez, 2017
Analiza ekspresji 10 genów ThyroSec3	94%	82%	Steward, 2018
Milestone (analiza 20 genów	98%	85%	Gliwice, 2018

W roku 2020 grant **STRATEGMED2/267 398/4/NCBR/2015** zakończył się. W listopadzie przeszedł pozytywnie kontrolę NCBiR i został wysoko oceniony. Aktualnie prowadzone jest przygotowanie wniosków patentowych celem komercjalizacji opracowanych testów molekularnych.

W bieżącym roku projekt „Milestone” za opracowanie procesu wdrożeniowego transkryptomicznych testów molekularnych do wykorzystywania w onkologii diagnostycznej w guzach tarczycy i nowotworach piersi uzyskał nagrodę zespołową dla Ośrodka na V Kongresie Wyzwań Medycznych. II Edycja Konkursu Start-up-Med.

Ponadto opracowany przez nasz zespół „Polski genomyczny klasyfikator złośliwości nowotworu tarczycy ThyroPred-2” znalazł się wśród tegorocznych laureatów Konkursu „Złoty skalpel” (Puls Medycyny <https://pulsmedycyny.pl/zloty-skalpel-2020-poznaj-laureatow-konkursu-1102507>) zajmując 6 miejsce wśród wyróżnionych projektów.

Innowacja projektu dotyczy zastosowania ekspresyjnego autorskiego klasyfikatora molekularnego w diagnostyce przedoperacyjnej w niejednoznacznych klinicznie i cytologicznie guzach tarczycy. Opracowany test molekularny, zastosowany do materiału pobranego przez biopsję aspiracyjną cienkoigłową z guzka tarczycy, pozwala określić ryzyko jego złośliwości lepiej niż klasyczne badanie cytologiczne. Jest on oparty na analizie ekspresji genów ocenianej metodą ilościowej PCR w czasie rzeczywistym w niewielkiej ilości materiału oligobiopsyjnego.

Prace opublikowane w 2020 r.

1. BRAF V600E status may facilitate decision-making on active surveillance of low-risk papillary thyroid microcarcinoma. Kim KJ, Kim SG, Tan J, Shen X, Viola D, Elisei R, Puxeddu E, Fugazola L, Colombo C, Jarzab B, **Czarniecka A**, Lam AK, Mian C, Vianello F, Yip L, Riesco-Eizaguirre G, Santisteban P, O'Neill CJ, Sywak MS, Clifton-Bligh R, Bendlova B, Sýkorová V, Xing M. Eur J Cancer. 2020 Jan;124:161-169. doi: 10.1016/j.ejca.2019.10.017.
2. *TERT* Promoter Mutations and Their Impact on Gene Expression Profile in Papillary Thyroid Carcinoma. Rusinek D, Pfeifer A, Cieslicka M, Kowalska M, Pawlaczek A, Krajewska J, Szpak-Ulczo S, Tyszkiewicz T, Halczok M, **Czarniecka A**, Zembala-Nozynska E, Checkan M, Lamch

- R, Handkiewicz-Junak D, Ledwon A, Paliczka-Cieślak E, Kropinska A, Jarzab B, Oczko-Wojciechowska M *Cancers* 2020, 12(6),1597; <https://doi.org/10.3390/cancers12061597>
3. Differences in Gene Expression Profile of Primary Tumors in Metastatic and Non-Metastatic Papillary Thyroid Carcinoma—Do They Exist? Sylwia Szpak-Ulczok, Aleksandra Pfeifer, Dagmara Rusinek, Malgorzata Oczko-Wojciechowska, Malgorzata Kowalska, Tomasz Tyszkiewicz, Marta Cieslicka, Daria Handkiewicz-Junak, Krzysztof Fajarewicz, Dariusz Lange, Ewa Chmielik, Ewa Zembala-Nozynska, Sebastian Student, Agnieszka Kotecka-Blicharz, Aneta Kluczevska-Galka, Barbara Jarzab, **Agnieszka Czarniecka**, Michal Jarzab, Jolanta Krajewska *Int J Mol Sci.* 2020 Jun 29;21(13):4629. doi: 10.3390/ijms21134629
 4. Impact of the tumormicroenvironment of the gene expression profile in papillary thyroid cancer. Oczko-Wojciechowska M, Pfeifer A, Jarzab M, Swierniak M, Rusinek D, Tyszkiewicz T, Kowalska M, Chmielik E, Zembala-Nozynska E, **Czarniecka A**, Jarzab B, Krajewska J. *Pathobiology.* 2020 Apr 22;1-12. doi: 10.1159/000507223.
 5. European perspective on the use of molecular tests in the diagnosis and therapy of thyroid neoplasms. Oczko-Wojciechowska M, Kotecka-Blicharz A, Krajewska J, Rusinek D, Barczyński M, Jarzab B, **Czarniecka A**. *Gland Surg.* 2020 Feb;9(Suppl 2):S69-S76. doi: 10.21037/gs.2019.10.26. Review
 6. Leczenie operacyjne zróżnicowanego raka tarczycy. Omówienie aktualnych zasad i kontrowersji (2020) M. Barczyński, **A. Czarniecka**, M. Stopa-Barczyńska *Medycyna Praktyczna – Chirurgia* 2/2020: 5-12
 7. **Czarniecka A.**, Oczko-Wojciechowska M., Barczyński M. European perspective on active surveillance for papillary thyroid microcarcinoma - are we ready? *Ann Thyroid* 2020;5:15 doi:10.21037/aot-20-37 <http://aot.amegroups.com/issue/view/404>.

6.6.2. Rodzinny rak rdzeniasty tarczycy - wyniki leczenia operacyjnego u nosicieli mutacji protoonkogenu RET w zależności od typu mutacji, stadium zaawansowania klinicznego choroby, czasu rozpoczęcia leczenia i jego zakresu.

Wykonawcy *A. Czarniecka, M. Oczko-Wojciechowska, A. Hajduk, J. Krajewska, E. Stobiecka, M. Jarzab, G. Woźniak, A. Sacher, B. Jarzab*

Odkrycie mutacji germlinalnej protoonkogenu RET dało podstawy dla podejmowania decyzji o profilaktycznej tyroidektomii na podstawie wyniku badania molekularnego. Analizę genetyczną protoonkogenu RET rozpoczęto w Centrum Onkologii w Gliwicach w 1996 r. (3 lata po odkryciu światowym). W 1997 roku przeprowadzono pierwszą profilaktyczną tyroidektomię. Oddział NIO w Gliwicach posiada największą w Polsce grupę chorych na rodzinny rak rdzeniasty tarczycy (RRRT) leczonych operacyjnie.

Cel: Podsumowanie 20-letniego doświadczenia w leczeniu chorych na RRRT w kontekście optymalnego czasu i zakresu operacji.

Materiał i metody: Materiał stanowi 200 chorych na RRRT leczonych w Centrum Onkologii w Gliwicach, podzielonych na dwie grupy: grupa 1- operowani w latach 1997-2006: 105 chorych (podgrupa 1A: 32 leczonych profilaktycznie i podgrupa 1B: 73 operowanych w okresie klinicznie jawnym oraz grupa 2 operowani w latach 2007-2017: 95 chorych (podgrupa 2A: 30 operowanych profilaktycznie (kalcytonina <10pg/ml) i podgrupa 2B: 65 operowanych w okresie klinicznie jawnym). U wszystkich chorych mutację protoonkogenu RET oznaczano dwukrotnie na podstawie analizy DNA z leukocytów krwi obwodowej. Chorych leczonych w okresie klinicznie jawnym operowano zgodnie z zaleceniami Polskich Rekomendacji ds. Leczenia Raka Tarczycy, natomiast chorych z grupy 1A poddano całkowitemu wycięciu tarczycy z układem chłonnym centralnym, w 8 przypadkach rozszerzonym dodatkowo o obustronną, elektywną, boczną limfadenektomię szyjną. W grupie 2A operację ograniczono jedynie do całkowitego usunięcia tarczycy.

Wyniki: Opóźnienie leczenia operacyjnego w RRRT niekorzystnie wpływa na rokowanie (prawdopodobieństwo 10-letniego przeżycia całkowitego chorych leczonych w okresie klinicznie jawnym- grupa 2A i 2B razem- wynosiło 70% w porównaniu do 100% chorych z grupy 1A i 1B; $p < 0,05$). W latach 1997-2006 w okresie optymalnym operowano 32 chorych (grupa 1A) co stanowiło 30% wszystkich chorych na RRRT operowanych w tym okresie. Niestety w latach 2007-2017 profilaktycznie operowano także tylko 30 osób (31,5%) - grupa 2A, co stanowi podobny odsetek. U żadnego chorego z grupy:1A i 2A nie odnotowano nawrotu choroby nowotworowej, u wszystkich uzyskano natomiast normalizację pooperacyjnego stężenia kalcytoniny, pomimo ograniczenia zakresu operacji tylko do profilaktycznej tyroidektomii bez usuwania węzłów chłonnych centralnych w grupie 2A. Natomiast w grupie 1B normalizację stężenia kalcytoniny stwierdzono u 31,5%, a w 2B u 63%. W grupie 1B nawrót lokoregionalny dotyczył 17 chorych (23,3%), w 2B 7 chorych (11%) ($p=0,05$). Odpowiednio rozsiew choroby stwierdzono w grupie 1B u 12 chorych (16,4%), a w grupie 2B u 4 osób (1%) ($p=0,05$).

Wnioski: Pomimo upływu lat i rozpowszechnienia się badań genetycznych nadal około 2/3 chorych w Polsce jest operowanych w okresie klinicznie jawnym, co wpływa na pogorszenie rokowania. Należy dążyć do optymalizacji czasu kwalifikacji do leczenia operacyjnego, pozwalającego na bezpieczne ograniczenie zakresu operacji i poprawę jakości życia chorych.

W 2020 r. lek. Anna Hajduk w ramach otwartego przewodu doktorskiego "Odległa ocena skuteczności profilaktycznego leczenia operacyjnego u nosicieli germinacyjnej mutacji proto-onkogenu RET" prowadziła uaktualnianie bazy danych chorych na RRRT.

Z uwagi na sytuację epidemiczną Covid-19 nie było możliwości przeprowadzenia założonych badań kontrolnych z oceną stężenia kalcytoniny.

Praca: "Optimization of the therapeutic strategy in hereditary medullary thyroid cancer (HMTc)."

Authors: A. Czarniecka, M. Oczko-Wojciechowska, A. Hajduk, A. Sacher, G. Woźniak, M. Zeman, D. Rusinek, E. Stobiecka, E. Chmielik, E., T. Gawlik, J. Krajewska, D. Handkiewicz-Junak, A. Maciejewski, B. Jarzab, została przyjęta do prezentacji na 9th Biennial Congress of the European Society of Endocrine Surgeon (ESES), który miał odbyć się w terminie 27.05-31.05.2020 w Atenach. Kongres został jednak przełożony z przyczyn epidemicznych na maj 2021. (wszystkie przyjęte na rok 2020 prace mają być prezentowane w roku 2021).

Wobec zaistniałej sytuacji epidemicznej uzyskano również zgodę na przedłużenie terminu zakończenia rozprawy doktorskiej.

Prace opublikowane w 2020 r.

Current status of the prognostic molecular markers in medullary thyroid carcinoma.

Oczko-Wojciechowska M, Czarniecka A, Gawlik T, Jarzab B, Krajewska J.

Endocr Connect. 2020 Oct 1:EC-20-0374. doi: 10.1530/EC-20-0374. Online ahead of print. PMID: 33112827 Review.

6.6.3. Ocena przydatności śródoperacyjnego wykorzystania światła laserowego bliskiej podczerwieni oraz zieleni indocyjaninowej u chorych na raka tarczycy dla redukcji ryzyka pooperycyjnej niedoczynności przytarczyc.

Wykonawcy: A. Czarniecka, G. Woźniak, A. Sacher, Ż. Kaniszewska-Dorsz, A. Kotecka-Blicharz, E. Chmielik, E. Stobiecka

W 2020 r. rozpoczęto prospektywne badanie śródoperacyjnej identyfikacji przytarczyc wykorzystując zjawisko autofluorescencji gruczołów w świetle lasera w bliskiej podczerwieni (o długości fali 805nm +/-10nm, maksymalnej mocy emisji:3000mW). Do badania wykorzystywano system obrazowania ICG - Visionsense Iridium. Każdy chory był informowany o celu badania, otrzymywał formularz informacyjny i podpisywał oddzielną zgodę na udział w badaniu oraz zgodę na możliwość przetwarzania jego danych osobowych.

W 2020 roku, zgodnie z założeniami wieloletniego projektu, do badania włączono 25 chorych na raka tarczycy: 20 kobiet i 5 mężczyzn, w wieku od 17 do 73 lat (średnia i mediana: 48 lat). Było to 19 chorych na raka brodawkowatego tarczycy (rbt) i 6 na raka rdzeniastego (rrt). Wszyscy byli operowani pierwotnie w Klinice Chirurgii Onkologicznej i Rekonstrukcyjnej gdzie wykonano całkowite wycięcie tarczycy z układem chłonnym środkowym. W podgrupie chorych na rrt dodatkowo u 5 osób wykonano jednostronną, zmodyfikowaną, boczną limfadenektomię szyjną, a u 1 chorego limfadenektomię boczną obustronną. Wszyscy chorzy przedoperacyjnie mieli prawidłowe stężenie wapnia zjonizowa-

nego. Chorzy na rbt byli w klinicznym stopniu zaawansowania cT1a-cT2N0M0 (18 osób) i cT3N0M1 (1 chory). Zaawansowanie kliniczne w grupie chorych na rrt przedstawiało się następująco: cT1bN0M0 - 4 osoby, cT2N0M0 - 2 chorych.

Śródoperacyjnie, wykorzystując zjawisko autofluorescencji zidentyfikowano: 1 przytarczycę u 2 chorych (8%), 2 przytarczyce u 5 osób (20%), 3 u 10 chorych (40%), 4 u 7 (28%) w jednym przypadku nie udało się zidentyfikować żadnej przytarczycy (4%). Badanie doraźne w celu potwierdzenia utkania gruczołowego wykonano w 8 przypadkach (32%). Potwierdziło ono utkanie przytarczycy u 5 chorych (62,5%), co u 3 osób pozwoliło na przeprowadzenie autotransplantacji, a u 2 na pozostawienie pozostałego fragmentu przytarczycy „na naczyniach”.

Ocenę stężenia PTH oraz Ca^{+2} i Ca całkowitego wykonywano w 1-szej dobie po operacji. Nie odnotowano odchyień od normy u 6 chorych (24%). Chorzy ci nie wymagali suplementacji wapniem i wit D3 – grupa A. U 11 osób odnotowano obniżenie stężenia PTH w przedziale (4 pg/ml – 16 pg/ml) 44% - grupa B. U tych chorych prowadzono suplementację wapnia i wit D w standardowych dawkach. U 8 chorych (32%) odnotowano spadek pooperacyjnego stężenia PTH w 1-szej dobie < 3pg/ml (prowadzono substytucję wysokimi dawkami) – grupa C.

12 chorych z gr B i C (63%) miało przedoperacyjnie rozpoznane cechy przewlekłego zapalenia tarczycy postawione na podstawie obrazu USG i/lub badania przeciwciał (co potwierdziło także pooperacyjne badanie histopatologiczne). Chorzy z gr A charakteryzowali się niższym zaawansowaniem klinicznym i patologicznym (5 chorych cT1, 1 osoba cT2; 1 chory miał rozpoznane przerzuty do układu chłonnego środkowego), tylko u 1 chorego (17%), w tej grupie rozpoznano i potwierdzono cechy PZT.

W grupach B i C 5 chorych było w stopniu zaawansowania wyższym niż T2– 26%. U 26% chorych występowały przerzuty do układu chłonnego centralnego. Powtórna ocenę gospodarki wapniowo-fosforanowej dokonano podczas pierwszej kontroli na ZNE-ZGT, po około 4 tyg. od operacji. U chorych z grupy B i C (n=19) odnotowano pełny powrót do prawidłowych stężeń PTH u 6 osób (32%). Obniżenie stężenia PTH w przedziale (4-16 pg/ml) obserwowano nadal u 7 chorych (37%) natomiast niskie stężenie PTH (< 3pg/ml) utrzymywało się u 3 chorych (16%).

Pierwszy z nich to chory na bardzo zaawansowanego raka rdzeniastego tarczycy pT41bMx, u którego śródoperacyjnie zidentyfikowano 2 przytarczyce: fragment 1 pozostawiono „na naczyniach”; fragment 2 wszczepiono do mięśnia m-s.o. Druga osoba to chora na rrt, u której zidentyfikowano i pozostawiono „na naczyniach” 2 przytarczyce, 2 kolejne po rozdrobnieniu wszczepiono do m. m-s.o. Ostatnia osoba to chora na rbt, z potwierdzonym AZT i przerzutami do układu chłonnego środkowego.

Wykonanie badań w pilotowej grupie 25 chorych pozwoliło na dopracowanie metodologii badania i ustalenia algorytmu postępowania na dalszych etapach projektu, co stanowiło jego główny cel na rok 2020.

Badanie potwierdziło nie tylko konieczność identyfikacji przytarczyc, lecz także oceny ich ukrwienia, czemu ma służyć podawanie na następnym etapie badania zieleni indocyjaninowej.

Dla oceny znaczenia zaawansowania choroby oraz występowania cech przewlekłego zapalenia tarczycy dla ryzyka wystąpienia pooperacyjnej niedoczynności przytarczyc konieczna jest analiza bardziej licznych grup chorych w dłuższym okresie obserwacji dlatego też planowana jest kontynuacja badania w latach następnych.

6.7. Ocena czynników prognostycznych i predykcyjnych w diagnostyce i leczeniu chirurgicznym chorych na nowotwory złośliwe.

Kierownik: A. Maciejewski

6.7.1. Ocena czynników prognostycznych u chorych na raka jelita grubego w IV stopniu klinicznego zaawansowania choroby leczonych chirurgicznie. Badanie prospektywne.

Wykonawcy: M. Zeman, M. Czarnecki, W. Skalba, A. Chmielarz, M. Strączyński, S. Pakuło, M. Chekan, M. Biskup-Frużyńska, A. Stanek-Widera, J. Rembak-Szynkiewicz, M. Gola, W. Bal, D. Lange, A. Maciejewski

W latach 2017-2020 w Klinice Chirurgii Onkologicznej i Rekonstrukcyjnej COI w Gliwicach operowano 72 chorych (23 kobiety i 49 mężczyzn) z powodu przerzutów raka jelita grubego do wątroby. W 29 (40,3%) przypadkach ognisko pierwotne było zlokalizowane w odbytnicy, a w pozostałych 43 (59,7%) przypadkach w okrężnicy. U 29 (40,3%) chorych stwierdzono przerzuty synchroniczne, a u pozostałych 43 (59,7%) metachroniczne. Przerzuty, które ujawniły się do 3 miesięcy od operacji ogniska pierwotnego uznano za synchroniczne. W przypadku przerzutów metachronicznych czas od operacji ogniska pierwotnego do rozpoznania przerzutów wahał się od 5 do 78 miesięcy i średnio wyniósł 21 miesięcy. W 47 (65%) przypadkach stwierdzono obecność pojedynczego przerzutu, a w 25 (35%) co najmniej 2 przerzutów. Wykonano 24 dużych (>2 segmenty) anatomicznych resekcji, w tym 5 dwuetapowych (ALPPS), 20 anatomicznych resekcji jednego lub dwóch segmentów, 20 metastazektomii oraz 8 samodzielnych lub połączonych z resekcją termoablacji (RFA).

Powikłania pooperacyjne oceniano w skali Claviena. Stwierdzono 3 (4,2%) zgony w przebiegu pooperacyjnym. Powikłania w stopniu 4 wystąpiły u 3 chorych, w stopniu 3 u 4 chorych, w stopniu 2 u 9 chorych, w stopniu 1 u jednego chorego. Przed zabiegiem operacyjnym oraz w pierwszej, trzeciej i piątej dobie pooperacyjnej wykonywano jednolity zestaw badań laboratoryjnych. Chorych u których wykonano termoablację, wykluczono z dalszej analizy.

Przeanalizowano przeżycia bezobjawowe (DFS). W całej badanej grupie prawdopodobieństwo 18-miesięcznego DFS wyniosło 29%. Nie wykazano wpływu na DFS przedoperacyjnych stężeń białek ostrej fazy takich jak: fibrynogen, ferrytyna i prealbumina. Nie wykazano również wpływu na DFS wskaźników stanu zapalnego takich jak PLR, NLR oraz stężenia D-dimerów. Korzystnym czynnikiem wpływającym na DFS okazały się natomiast: pojedynczy przerzut w porównaniu do 2 i więcej przerzutów ($p=0,03$) oraz czas od operacji pierwotnej do rozpoznania przerzutów większy niż 12 miesięcy ($p=0,000$). Dodatkowo podjęto próbę stworzenia prostego modelu prognostycznego opartego na tych dwóch parametrach. W tym celu korzystnym prognostycznie parametrom przyznawano 1 punkt, na-

tomiast niekorzystnym 0 punktów. W ten sposób otrzymano 3 grupy chorych. W grupie, która otrzymała 2 punkty znaleźli się chorzy u których stwierdzono 1 zmianę przerzutową, która ujawniła się po 12 miesiącach od operacji ogniska pierwotnego, w grupie, która otrzymała 0 punktów znaleźli się chorzy, u których zdiagnozowano co najmniej 2 zmiany przerzutowe, które ujawniły się do 12 miesięcy od operacji ogniska pierwotnego, natomiast w grupie, która otrzymała 1 punkt, pozostali chorzy. Wykazano istotną statystycznie różnicę prawdopodobieństwa przeżycia bezobjawowego grupy chorych, która otrzymała 2 punkty, w porównaniu do dwóch pozostałych grup ($p=0,001$). Powyższy model jawi się jako prosta możliwość stratyfikacji grupy chorych na raka jelita grubego w IV stopniu zaawansowania klinicznego. Wydaje się, że może on być pomocny przy podejmowaniu decyzji dotyczącej sekwencji leczenia, jednak wymaga potwierdzenia na większej grupie chorych.

6.7.2. Ocena morfometrycznej charakterystyki sieci naczyń limfatycznych raka regionu głowy i szyi i regionalnych węzłów chłonnych oraz stopnia korelacji z profilem molekularnym marginesów jako czynników predykcyjnych dla pooperacyjnej radioterapii.

Wykonawcy: Ł. Krakowczyk, A. Stanek-Widera, D. Lange, A. Maciejewski, M. Stankiewicz, C. Szymczyk, B. Maciejewski

Cel pracy: Czy parametryczny morfometryczny profil sieci naczyń limfatycznych w guzie i w regionalnych węzłach chłonnych (z przerzutami i bez) można wykorzystać jako uzupełnienie (wskazanie precyzji) kliniczno-molekularnego systemu szacowania ryzyka wznowy miejscowej i lub węzłowej po leczeniu operacyjnym raków regionu głowy i szyi? Aktualnie powszechnie stosowany kliniczny system oceny ryzyka wg Pelersa nie podlegał nowelizacji. Od ponad 30 lat i w sytuacji wdrożenia wielu nowoczesnych metod i technik radiochirurgii (3D-CRT, IMRT i GRT) jest niedostatecznie precyzyjny jako predyktor indywidualnej optymalizacji pooperacyjnego leczenia uzupełniającego.

Uzasadnienie: Z dotychczasowych nielicznych badań wynika, że stopień nasilenia patologicznej angio- i limfangiogenezy w guzie i ogniskach przerzutowych może mieć istotną wartość predykcyjną i prognostyczną. Z kolei morfometryczne zmiany limfangiogenezy w regionalnych węzłach chłonnych bez ognisk przerzutowych mogą hipotetycznie stanowić wczesny rekwizyt ryzyka powstania w nich przerzutów (i np. źródeł dla następczego rozsiewu). A zatem parametryczna i morfometryczna analiza sieci limfatycznej w guzie i w regionalnych węzłach chłonnych może stanowić ważny uzupełniający czynnik predykcyjny i prognostyczny zwiększający kliniczną wartość statusu molekularno-histopatologicznego guza pierwotnego i regionalnych węzłów chłonnych nie tylko dla pooperacyjnej ale i samodzielnej radioterapii nowotworów regionu głowy i szyi. To uzasadnia celowość własnego projektu badawczego.

Zalecany przez obecnie obowiązującą 8. edycję AJCC schemat oceny ryzyka agresywnego przebiegu klinicznego (Risk Model) nie uwzględnia angioinwazji, natomiast obejmuje ocenę nasilenia nacieku zapalnego złożonego z limfocytów. Ten schemat oceny jest przez nas stosowany zaledwie od roku i omawiany przy okazji wielodyscyplinarnych decyzji o leczeniu uzupełniającym.

Poszerzenie oceny o korelację pomiędzy statusem sieci naczyń chłonnych, a intensywnością odpowiedzi limfocytarnej gospodarza zwiększyłyby wartość pracy, poprzez połączenie kryteriów naukowych z aktualnymi patologicznymi kryteriami diagnostycznymi. Stąd nasz wniosek o przedłużenie trwania tego zadania badawczego.

Materiał i metodyka: Retrospektywny etap badania obejmuje materiał kliniczny ok. 150 chorych na raka różnych lokalizacji regionu głowy i szyi i w różnym stopniu zaawansowania klinicznego, leczonych operacyjnie z co najmniej 5-letnim okresem obserwacji, których pooperacyjny wynik histopatologiczny będzie dostępny w bazie tkanek Zakładu Patologii Nowotworów. Oprócz oznaczenia profilu molekularnego (jak w badaniu CHR-ZP-ZRT nr 01/2017) ocena morfometryczna sieci limfatycznej z użyciem molekularnych przeciwciał CD34 i podoplaniny obejmuje parametryzacje gęstości naczyń limfatycznych, średnicy ich przekroju i długości i indeksu wariancji uzyskanych oznaczeń. Wieloparametryczna analiza korelacyjna pozwoli oznaczyć siłę związku i jego powtarzalność oznaczeń molekularnych w relacji do uzyskanych wyników leczenia (tzw. analiza zwrotna). Uzyskane wyniki wykorzystano do oznaczenia stopnia sprzężenia z :

1. 5-letnim miejscowym i loko regionalnym wyleczeniem
2. Częstością, kinetyką i lokalizacją wznów miejscowych i węzłowych
3. Częstością i kinetyką przerzutów odległych.

Jeśli uzyskane wyniki okażą się wystarczająco reprezentatywne zostanie podjęta próba zdefiniowania (nowelizacji) kliniczno-molekularno-naczyniowej skali ryzyka niepowodzeń (wznowy, przerzuty) i opracowania algorytmu indywidualnych taktyk terapeutycznych.

Wstępne wyniki:

1. Istnieje korelacja profilu naczyniowego guza i węzłów chłonnych z profilem molekularnym.
2. Wykorzystanie obu profili dla opracowania złożonego predykcyjnego systemu szacowania ryzyka z uwzględnieniem wyjściowej objętości guza (T_v) i węzłów chłonnych (N_v) stworzy racjonalny parametryczny system wyboru indywidualnej taktyki skojarzonej terapii nowotworów głowy i szyi.

Na etapie badań retrospektywnych zadanie nie wymaga konieczności zapewnienia źródeł finansowania, dalsze realizowanie projektu badawczego będzie możliwe w ramach realizacji grantu wewnętrznego.

6.8. Obecność i znaczenie ferroptotycznego mechanizmu śmierci komórek w reperfuzji płatów wolnych po zabiegach rekonstrukcyjnych.

Kierownik: A. Maciejewski

Wykonawcy:

Prof. dr hab. n. med. Adam Maciejewski – Klinika Chirurgii Onkologicznej i Rekonstrukcyjnej – kierownik projektu, planowanie projektu, koordynacja badań, kierownik komórki organizacyjnej

Dr hab. n. med. Łukasz Krakowczyk - Klinika Chirurgii Onkologicznej i Rekonstrukcyjnej - koordynacja badań, wykonywanie biopsji, magazynowanie bioptatów, opieka nad pacjentami po biopsji

Dr n. med. Maciej Grajek - Klinika Chirurgii Onkologicznej i Rekonstrukcyjnej - wykonywanie biopsji, magazynowanie bioptatów, opieka nad pacjentami po biopsji –

Lek. Daniel Bula - Klinika Chirurgii Onkologicznej i Rekonstrukcyjnej – planowanie projektu, magazynowanie bioptatów, obsługa logistyczna projektu

Dr n. med. Daria Gendosz de Carillo – Katedra Histologii Śląskiego Uniwersytetu Medycznego – wykonywanie i interpretacja badań molekularnych

Lek. Dominik Walczak - Klinika Chirurgii Onkologicznej i Rekonstrukcyjnej - wykonywanie biopsji, magazynowanie bioptatów, opieka nad pacjentami po biopsji

W pierwszych 20 miesiącach prowadzenia programu badawczego pt. „Obecność i znaczenie ferroptotycznego mechanizmu śmierci komórek w reperfuzji płatów wolnych po zabiegach rekonstrukcyjnych” zostały osiągnięte następujące cele:

1. Udoskonalenie selekcji pacjentów zakwalifikowanych do pobrania biopsji
2. Pobranie biopsji od 17 pacjentów (34 bioptatów)
3. Walidacja protokołu do izolacji RNA przy zastosowaniu homogenizacji kulkowej z bioptatów
4. Walidacja protokołu do izolacji białka całkowitego przy zastosowaniu homogenizacji kulkowej z bioptatów
5. Określenie specyficzności starterów dla badanych genów, w tym ACSL4, SLC7A11, NRF2
6. Walidacja protokołu do reakcji odwrotnej transkrypcji dla mRNA pozyskanego z biopsji od pacjentów, którzy zostali zdyskwalifikowani do biopsji nr 2 (martwica płata).

Zespół badawczy z przykrością musi stwierdzić, iż nie będzie w stanie ukończyć projektu NR DN/SN-08WP/19 w wyznaczonym terminie. Jednocześnie wnioskuje o przedłużenie terminu realizacji projektu o następne 12 miesięcy. Swój wniosek uzasadnia zmniejszoną ilością pacjentów zakwalifikowanych do zabiegów resekcyjno-rekonstrukcyjnych w ostatnich 6 miesiącach w Klinice Chirurgii Onkologicznej i Rekonstrukcyjnej w związku z epidemią wirusa SARS-CoV-2. Ze względów bezpieczeństwa, w okresie od 02.2020 do 08.2020 zostało zawieszona pobieranie i magazynowanie bioptatów od pacjentów. Sprawę dodatkowo skomplikowało zamknięcie części Śląskiego Uniwersytetu Medycznego, który współpracując z naszym zespołem jest odpowiedzialny za część laboratoryjną projektu badawczego. Jednakże od momentu wznowienia badań (druga połowa 08.2020), przy pełnej mobilizacji całego zespołu, zbliżamy się do ukończenia pierwszego etapu projektu. Na ten moment zostało pobranych 34 biopsje (od 17 pacjentów), co daje 85 % zaplanowanych bioptatów. Tak jak to miało miejsce w roku 2019, część pacjentów pomimo udzielenia zgody na udział w badaniu została zdyskwalifiko-

wana ze względu na brak spełnienia kryteriów włączenia. Powodem tego były najczęściej: zbyt mała wyspa skórna lub użycie płata wolnego bez wykorzystania wyspy skórnej. Część pacjentów w przypadku których wyspy skórne mogłyby być użyte w badaniu, nie wyraziły zgody na udział w projekcie. W 2021 roku dzięki ukończeniu pobierania biopłatów skórnych (I etapu badań) i skupieniu się na części laboratoryjnej, zespół badawczy przewiduje sprawne ukończenie projektu DN/SN-08WP/19 i tym samym realizację założeń programu badawczego.

6.9. Optymalizacja terapii chorych na schorzenia układu krwiotwórczego.

Kierownik: S. Giebel

6.9.1. Analiza czynników prognostycznych i predykcyjnych w planowaniu i ocena wyników leczenia chorych na DLBCL.

Wykonawcy: A. Chwieduk, M. Głowala-Kosińska, A. Ciomber, I. Mitrus, A. Smagur, W. Fidyk, P. Borzdziłowska, J. Korfanty, M. Wilkiewicz, M. Twardosz, R. Swoboda, A. Kwiatkowska-Pamuła, K. Dulik, J. Najda, M. Krawczyk-Kuliś, A. Cortez, A. Krzywoń, M. Krzempek, A. Wilk, Z. Kołosa

Celem realizowanego od 2018 r. programu badawczego jest identyfikacja rodzaju zależności między naturalnymi komórkami limfoidalnymi, adaptacyjnym układem immunologicznym i komórkami nowotworowymi. Umożliwi ona określenie roli tych komórek w powstawaniu i przebiegu chorób limfoproliferacyjnych. Objęcie badaniem odpowiednio dużej i względnie homogennej grupy pacjentów nowotworowych pozwoli na kompleksową ocenę nie tylko samych naturalnych komórek limfoidalnych obecnych w otoczeniu komórek nowotworowych, ale również ich wpływu na pozostałe komórki układu immunologicznego.

Badaniem, do tej pory, objęta została grupa 31 pacjentów ze zdiagnozowanym chłoniakiem z dużej komórki B (DLBCL) w wieku 18-65 lat, nie poddawanych leczeniu przeciwnowotworowemu, przyjętych w celach diagnostycznych i terapeutycznych do Kliniki Transplantacji Szpiku i Onkohematologii, Centrum Onkologii – Instytutu im. M. Skłodowskiej-Curie, Oddziału w Gliwicach. Grupę kontrolną stanowili dawcy szpiku (n=32).

Ilościowa i jakościowa analiza cytometryczna z wykorzystaniem ośmiokolorowego cytometru przepływowego FACSCantoTM II (BD Bioscience) obejmowała:

- identyfikację komórek ILCs o fenotypie lin- (CD3, CD4, CD16, CD19, CD8, CD20, CD34, CD15, CD14, CD203c, CD33, FcεRI) CD127+; poszczególne subpopulacje zostały wyodrębnione dzięki analizie ekspresji CD294 (CRTH2) i CD117
- ocenę konwencjonalnych limfocytów: Tc (CD45+CD3+CD8+), Th (CD45+CD3+CD4+), NK (CD45+CD56+CD3-), NKT (CD45+CD56+CD3+),
- analizę limfocytów T regulatorowych (Treg) o immunofenotypie CD4+CD25high; w celu analizy funkcjonalnej tych komórek zostały przeanalizowane dwie populacje: CD4+CD25highCD127-CDCD45RA+ (naïve Tregs) i CD4+CD25highCD127-CDCD45RA- (memory Tregs).

Przeprowadzone analizy statystyczne wykazały wyższy odsetek całkowitej liczby naturalnych komórek limfoidalnych (ILCs) wśród leukocytów krwi obwodowej w grupie zdrowych dawców (0,24%) w porównaniu z grupą chorych na DLBCL (0,17%) (p-value = ,0024). Jednocześnie, w grupie badanej, wśród wszystkich ILCs zaobserwowano statystycznie wyższy odsetek ILC2 (19,69%) niż w grupie kontrolnej (11,46%) (p-value = ,0056). Ponadto udział całkowitej subpopulacji ILC3 w leukocytach krwi obwodowej był niższy wśród chorych (0,06%), w porównaniu do populacji zdrowych dawców szpiku (0,12%) (p-value = ,0018). Także odsetek komórek ILC3 NKp46 zarówno w leukocytach, całkowitej populacji ILCs, jak również wśród subpopulacji komórek ILC3 uległ obniżeniu w grupie badanej vs. zdrowej i wyniósł odpowiednio 0,029% (wśród leuko), 50,92% (wśród ILCs) oraz 24% (wśród ILC3) u chorych vs. 0,083% (wśród leuko), 68,15% (wśród ILCs) oraz 33,64% (wśród ILC3) w grupie kontrolnej (p-value = ,0006) (p-value = ,0037) (p-value = ,0016).

Analiza konwencjonalnych limfocytów (TBNK) wykazała większy udział komórek NK wśród limfocytów krwi obwodowej w grupie badanej 17,81% w porównaniu do grupy zdrowych dawców szpiku - 11,36% (p-value = ,0322). Jednocześnie w populacji chorych obniżeniu uległ odsetek limfocytów B (CD19+) i wyniósł 8,15% w porównaniu z grupą kontrolną (12,18%) (p-value = ,0002).

Dane analizowano wykorzystując parametryczny test jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA). Analizy przeprowadzono przy użyciu pakietu oprogramowania R w wersji 4.0.1 (R Foundation for Statistical Computing, <http://www.r-project.org>).

Zarówno grupa pacjentów jak i kontrolna będą systematycznie uzupełniane zgodnie z założonym planem. Projekt finansowany jest z Grantu NCN 2017/25/B/NZ6/01484, którego zakończenie planowane jest na styczeń 2022 r.

Otrzymane wyniki posłużą do opracowania artykułów w recenzowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, indeksowanych na Liście Filadelfijskiej. Zostaną też upublicznione w środowisku naukowych w formie doniesień na międzynarodowych i krajowych konferencjach specjalistycznych.

Zadanie 6.9.1 jest tożsame z zadaniem 3.3. Naturalna komórka limfoidalna (ILC) - nowy uczestnik odpowiedzi immunologicznej w przebiegu chorób limfoproliferacyjnych.

6.9.2. Ocena skuteczności i profilu bezpieczeństwa schematu BGD (bendamustyna, gemcytabina, deksametazon) w leczeniu chorych z opornymi i nawrotowymi postaciami chłoniaków z obwodowych limfocytów T.

Wykonawcy: T. Czerw, R. Swoboda, J. Najda, K. Dulik, M. Twardosz, A. Kwiatkowska-Pamula, A. Janikowska, K. Michalak, A. Janeczek, S. Giebel

Celem projektu była realizacja wielośrodkowego, prospektywnego badania klinicznego II-giej fazy oceniającego skuteczność i bezpieczeństwo schematu BGD u pacjentów z rozpoznaniem chłoniaka z obwodowych limfocytów T (PTCL), u których stwierdzono oporność bądź nawrót choroby po pierwszej linii leczenia. W ramach badania pilotowego dokonano retrospektywnej analizy 22 chorych na nawrotowe/oporne postacie PTCL, których leczono schematem BGD w trybie ratunkowym

w ośrodkach zrzeszonych w Polskiej Grupie Badawczej Chłoniaków (PLRG). Odnotowano odpowiedź na terapię u 50% chorych (całkowita remisja u 25% z nich, natomiast częściowa remisja u 25%). Do badania prospektywnego planowano włączyć 36 pacjentów z 16 polskich ośrodków hematologicznych zrzeszonych w ramach PLRG w okresie 01.01.2021-31.12.2023.

Celem uzyskania możliwości realizacji badania złożono wnioski do Agencji Badań Medycznych w ramach naboru nr ABM/2019/1 o dofinansowanie niekomercyjnych badań klinicznych. Wniosek ten (nr 2019/ABM/01/00045) przeszedł pozytywnie etap oceny merytorycznej, uzyskując średnią punktów 124,5. Uzyskana punktacja okazała się jednak niewystarczająca aby projekt uzyskał dofinansowanie.

W dniu 18.11.2020 r. przedstawiono projekt na sesji PLRG celem rozważenia finansowania ze środków własnych stowarzyszenia. Ostateczna decyzja w tej sprawie będzie podjęta w trakcie najbliższego posiedzenia zarządu PLRG.

6.10 Opracowanie i doskonalenie strategii leczenia wykorzystującego transplantację komórek krwiotwórczych.

Kierownik: S. Giebel

6.10.1. Ocena tolerancji i skuteczności napromieniania całego ciała w dawkach mieloablacyjnych w skojarzeniu z fludarabiną przed allotransplantacją komórek krwiotwórczych u chorych na ostrą białaczkę szpikową.

Wykonawcy: M. Sobczyk-Kruszelnicka, T. Czerw, W. Mendrek, M. Saduś-Wojciechowska, M. Ociepa, A. Frankiewicz, K. Michalak, J. Najda, M. Krawczyk-Kuliś, J. Hołowiecki, S. Giebel, M. Kraszkiewicz, B. Jochymek, Ł. Kleszyk, M. Radwan, Ł. Dolla

Analizą objęto łącznie 68 pacjentów, u których zastosowano leczenie kondycjonujące oparte na fludarabinie w skojarzeniu z TBI w dawkach mieloablacyjnych. Wszyscy pacjenci byli leczeni w NIO-PIB Oddział Gliwice. Liczba pacjentów leczonych dawką TBI 8Gy była znacznie mniejsza.

W grupie porównawczej oceniono 81 pacjentów leczonych w ośrodkach PALG schematem z użyciem fludarabiny i busulfanu. Także w tej grupie pula pacjentów leczonych zredukowaną dawką busulfanu stanowiła zaledwie 19 pacjentów.

Na podstawie już posiadanej bazy pacjentów powstała praca doktorska. Jedną z istotnych uwag recenzentów była mała liczebność grupy leczonej z użyciem dawki TBI 8Gy jak i zredukowaną dawką busulfanu.

Z tego powodu zdecydowano o poszerzeniu bazy pacjentów leczonych TBI w kolejnych latach w NIO-PIB jak i o pozyskaniu danych z grupy PALG dotyczących leczenia opartego na chemioterapii. Część danych pozyskano z ośrodka transplantacyjnego w Poznaniu.

Na kolejny rok planuje się finalizację bazy i rozpoczęcie pisania manuskryptu.

6.10.2. Porównawcza ocena kliniczno-dermoskopowa zmian skórnych w przebiegu ostrej i przewlekłej choroby przeszczep-przeciw-gospodarzowi (GVHD) u pacjentów po allogenicznej transplantacji krwiotwórczych komórek macierzystych (alloHSCT) w trakcie leczenia pozaustrojową fotoferezą (ECP).

Wykonawcy: G. Kamińska-Winciorek, T. Czerw, M. Jaworska, A. Szlauer-Stefańska, S. Giebel

W latach 2018-2020 do prospektywnej oceny kliniczno-dermoskopowej zmian skórnych w przebiegu choroby przeszczep-przeciw-gospodarzowi (GVHD) u pacjentów leczonych za pomocą pozaustrojowej fotoferezy (ECP) zakwalifikowano i włączono łącznie 15 pacjentów po allogenicznej transplantacji krwiotwórczych komórek macierzystych (alloHSCT). Ze względu na zrekrutowanie niepełnej liczby badanych (z powodu pandemii COVID-19, zmiany harmonogramu przyjęć na Oddział oraz wysokospecjalistyczny charakter procedury terapeutycznej jaką jest ECP z koniecznością jej wielokrotnego powtarzania), nie było możliwe przeprowadzenie ostatecznej analizy i opracowanie uzyskanych wyników obserwacji w grupie badanych chorych dotyczących cech dermoskopowych oraz ewolucji tych zmian w aspekcie kliniczno-dermoskopowym.

Poczynione dotychczas obserwacje kliniczno-dermoskopowe wraz ze zgromadzoną unikatową dokumentacją fotograficzną (ikonografia własnych przypadków) zmian występujących zarówno w obrębie skóry gładkiej, jak i również błon śluzowych i przydatków w przebiegu skórnej GvHD, dały podstawę opublikowania pracy, w której przedstawiono cechy dermoskopowe obserwowane w obrębie czerwieni wargowej w przebiegu ostrej skórno-śluzówkowej GvHD:

1. Kamińska-Winciorek G, Szlauer-Stefańska A. Mucoscopy in acute graft-versus-host disease. *Oral Dis.* 2020 Sep 15. doi: 10.1111/odi.13642. Epub ahead of print. PMID: 32931619.

Ponadto przygotowano do publikacji (aktualnie w recenzji) wyniki dotyczące ewolucji cech dermoskopowych zmian skórno-śluzówkowych w przebiegu przewlekłej GvHD z uwzględnieniem terapii ECP (poprawa lub nasilenie kliniczno-dermoskopowe obserwowanych ognisk):

2. Szlauer-Stefańska A., Kamińska-Winciorek G: What do the lips say in chronic graft-versus-host disease? *Oral Dis.* praca złożona do druku [ODI-12-20-LE-9245]

6.10.3. Retrospektywna ocena wyników allotransplantacji komórek macierzystych u chorych z nawrotową oraz oporną postacią chłoniaka Hodgkina.

Wykonawcy: A. Frankiewicz, J. Hołowiecki, M. Krawczyk-Kuliś, M. Saduś-Wojciechowska, J. Najda, W. Mendrek, T. Czerw, M. Sobczyk-Kruszelnicka, M. Ociepa, K. Michalak, M. Dzierżak-Mietła, G. Kamińska-Winciorek, S. Giebel

Chłoniak Hodgkina to nowotwór układu chłonnego wywodzący się z komórek linii B, potencjalnie chemo- i radio-wrażliwy. W około 80% przypadków możliwe jest całkowite wyleczenie z zastosowaniem klasycznej chemioterapii z naświetlaniem lub bez naświetlania zajętych pól.

W części przypadków choroba ma charakter nawrotowy (około 10%) i/lub oporny (około 10%) na stosowaną terapię, w tym wysokodawkową chemioterapię wspomaganą transplantacją autologiczną

komórek krwiotwórczych. W tej grupie pacjentów rokowanie nieco poprawiło się dzięki zastosowaniu nowych leków (bendamustyna w skojarzeniu z gemcytabiną oraz przeciwciała monoklonalne; brentuksimab vedotin, nivolumab).

Zastosowanie alogenicznej transplantacji komórek krwiotwórczych pozwala potencjalnie, dzięki występowaniu reakcji przeszczep-przeciw-chłoniakowi, uzyskać wyleczenie nawet w grupie chorych, gdzie powyższe środki terapeutyczne okazały się nieskuteczne. Wysoka śmiertelność związana z samą procedurą w tej grupie chorych, związana głównie z reakcją przeszczep przeciw gospodarzowi oraz z ciężkimi infekcjami, raportowana historycznie, stanowiła jak dotąd istotną przeszkodę w oferowaniu tej metody leczniczej pacjentom z chłoniakiem Hodgkina. W ciągu ostatniej dekady obserwuje się znaczącą poprawę wyników oraz wzrost ilości procedur allotransplantacji wykonywanych u chorych na chłoniaki, głównie za sprawą wprowadzenia do praktyki klinicznej kondycjonowania o zredukowanej intensywności.

Celem bieżącego opracowania jest retrospektywna, jednośrodkowa analiza wyników terapii chorych na chłoniaka Hodgkina z użyciem alogenicznej transplantacji komórek krwiotwórczych, z próbą wyłonienia grupy chorych, których szanse na odniesienie korzyści są relatywnie duże. Należy zaznaczyć, że w Klinice Transplantacji Szpiku i Onkohematologii Centrum Onkologii – Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział Gliwice wykonana liczba allo-HSCT u w/w chorych (dotychczas 36 procedur) jest znacząca w porównaniu z danymi z literatury fachowej.

Projekt jest realizowany w ramach badania retrospektywnego. 36 chorych (23 kobiety oraz 13 mężczyzn) spełniających kryteria włączenia zostało włączonych do analizy. Mediana wieku przy diagnozie oraz przy allo-HSCT wynosiła odpowiednio 28 lat (zakres 20-53.5 lat) oraz 33 (24-57) lata. Mediana ilości linii leczenia przed zastosowaniem allo-HSCT wynosiła 4 (2-8). 27 chorych (75%) było wcześniej poddanych auto-HSCT. 14 chorych (38%) osiągnęło całkowitą remisję przed AlloHSCT.

Leczenie kondycjonujące obejmowało kondycjonowanie mieloablacyjne (n=15, 42%), o zredukowanej intensywności (n=15, 42%) oraz niemieloablacyjne (n=6, 16%). We wszystkich przypadkach źródłem komórek macierzystych była krew obwodowa. Chorzy otrzymali przeszczep od w pełni zgodnego w HLA dawcy rodzinnego (n=16, 44%), w pełni zgodnego dawcy niespokrwionego (n=11; 30%), nie w pełni zgodnego dawcy niespokrwionego (n=3, 8%) lub dawcy haploidentycznego (n=6, 17%).

Wszczep był udokumentowany u 35/36 (97%) (jeden chory zmarł z powodu sepsy w +10 dobie). Mediana czasu do regeneracji neutrofilii $> 0.5 \times 10^9 / L$ wyniosła 14 (10-20) dni, podczas gdy mediana czasu do regeneracji płytek krwi $> 20 \times 10^9 / L$ wyniosła 13 (0-47) dni. Prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia wynosiło 52% (błąd standardowy +/-2%) zaś przeżycia wolnego od progresji 57% (+/-9%). Skumulowane ryzyko progresji w czasie 2 lat wynosiło 27,6% (SE 8,1, 95% CI 13,4-43,8) zaś śmiertelności związanej z przeszczepieniem 14,3% (SE 6,0, 95% CI 5,1-28,1)

Z spośród 35 chorych u których stwierdzono wszczep, czworo (11%) doświadczyło ostrej GVHD w stopniu 2-4 (jeden chory w stopniu 2, jeden w stopniu 3, dwóch w stopniu 4). Wśród 30 chorych

którzy przeżyli bez progresji choroby co najmniej 100 dni, przewlekłą GVHD stwierdzono u 12 (40%).

W analizie jednowariantowej prawdopodobieństwo całkowitego przeżycia było znacząco wyższe u kobiet względem mężczyzn (70% +/-17% vs. 37% +/-14%, p=0,008), u chorych młodszych względem mediany (69% +/-15% vs. 25% +/-19%, p=0,04) oraz tych którzy osiągnęli całkowitą remisję przed AlloHSCT względem tych z remisją częściową oraz brakiem remisji (92% +/-7% vs. 22% +/-19% vs. 40% +/-15%; p=0,04). Te same czynniki miały wpływ na prawdopodobieństwo przeżycia wolnego od progresji.

W analizie wielowariantowej z użyciem regresji wstecznej jedynie status choroby przed allo-HSCT pozostawał niezależnym czynnikiem ryzyka śmiertelności [odpowiedź częściowa lub brak remisji vs. całkowita odpowiedź: hazard ratio = 10,9 (95% CI, 1,4-84,1), p=0,02].

Aktualnie praca przygotowywana jest do druku w literaturze fachowej.

6.10.4. Pod presją immunosupresji. Mechanizmy zaniku oraz regeneracji rzadkich subpopulacji limfocytów T w modelu alogenicznej transplantacji komórek krwiotwórczych przy pełnej oraz połowicznej zgodności w układzie HLA.

Wykonawcy: M. Głowala-Kosińska, A. Chwieduk, W. Fidyk, A. Smagur, P. Borzdziłowska, J. Korfanty, I. Mitrus, A. Ciomber, M. Wilkiewicz, M. Sobczyk-Kruszelnicka, T. Czerw, W. Mendrek, J. Najda, M. Saduś-Wojciechowska, A. Frankiewicz, M. Ociepa, K. Michalak, M. Krawczyk-Kuliś, J. Hołowicki, S. Giebel

Allogeniczny przeszczep hematopoetycznych komórek macierzystych (alloHSCT) jest skuteczną i często jedyną opcją terapeutyczną w leczeniu nowotworów układu krwiotwórczego. Procedura alloHSCT poprzedzona jest wysokodawkową radio- lub chemioterapią, która ostatecznie uszkadza wadliwą hematopoezę pacjenta. Komórki CD34 + z materiału dawcy zapewniają przywrócenie hematopoezy i bardzo powolną regenerację odporności pacjenta. W pierwszych miesiącach po alloHSCT odbudowa odporności polega na obwodowej ekspansji limfocytów T dawcy obecnych w przeszczepionym materiale komórkowym. Są to głównie limfocyty T pamięci i dziewicze limfocyty T, które stają się alloreaktywne w kontakcie z komórkami gospodarza. Najtrudniej odnawialne po alloHSCT są limfocyty T CD4 +. Wśród nich szczególnie cenne, ale też bardzo słabo odnawiane są limfocyty tzw. „recent thymic emigrants” (RTE), które są produkowane w grasicy i są najwcześniejszymi limfocytami T wykrywanyymi we krwi. Podczas gdy szczegółowa rekonstrukcja komórek T została dość dobrze opisana dla alloHSCT od dawców w pełni zgodnych pod względem HLA (human leucocyte antigens), aspekt ten jest nadal słabo poznany w przypadku alloHSCT od dawcy zgodnego tylko w połowie HLA (tak zwane haploidentyczne lub haploHSCT). Chociaż rzadko wykonywane, przeszczepy haploHSCT stają się coraz ważniejsze dla pacjentów, którzy nie posiadają dawcy zgodnego w HLA. Mając na uwadze powyższe przesłanki, podjęliśmy się kompleksowej oceny rekonstrukcji rzadkich limfocytów T po HSCT od dawcy haploidentycznego (haploHSCT) vs w pełni zgodnego dawcy niespokrewnionego (MUD-HSCT). Nasze wstępne wyniki wskazują na bardziej skuteczną wczesną rekonstrukcję lim-

focytów T po alloHSCT, w tym limfocytów RTE i dziewiczych limfocytów T regulatorowych (Treg) u pacjentów po haploHSCT w porównaniu z pacjentami po MUD-HSCT. Przeciwnie, podwójnie negatywne limfocyty T (DN) były odtwarzane mniej skutecznie u pacjentów po haploHSCT. Nie zaobserwowano istotnych różnic między badanymi grupami w odbudowie populacji komórek T, takich jak całkowita liczba komórek T CD3 + lub komórek T CD8 +. Oznacza to, że dziewicze limfocyty T i komórki RTE są odtwarzane po haploHSCT niezależnie od innych populacji limfocytów, co rzuca nowe światło na proces regeneracji limfocytów T w zależności od typu przeszczepu.

Otrzymane wyniki zostaną upublicznione w formie doniesień na międzynarodowych i krajowych konferencjach oraz staną się przedmiotem publikacji w recenzowanych czasopismach. Uzyskane dotychczas wyniki zaprezentowano na międzynarodowej konferencji Gliwice Scientific Meeting 2020.

6.10.5. Ocena tolerancji i skuteczności napromienienia całego ciała w dawkach mieloablacyjnych w skojarzeniu z kładrybiną przed allogeniczną transplantacją komórek krwiotwórczych u chorych na ostrą białaczkę szpikową.

Wykonawcy: M. Sobczyk-Kruszelnicka, T. Czerw, W. Mendrek, M. Saduś-Wojciechowska, A. Frankiewicz, M. Ociepa-Wasilkowska, A. Szlauer-Stefańska, J. Najda, M. Dzierżak-Mietła, M. Krawczyk-Kuliś, J. Hołowiecki, S. Giebel

Przeszczepienie allogenicznych krwiotwórczych komórek macierzystych (alloHSCT) jest standardem postępowania u chorych na ostrą białaczkę szpikową (OBSz) z grup dużego i pośredniego ryzyka cytogenetycznego, a także u pacjentów z zespołem mielodysplastycznym (MDS) dużego ryzyka. Większość chorych młodszych (do 60 rż) kwalifikuje się do transplantacji z przygotowaniem mieloablacyjnym, które tradycyjnie obejmuje stosowanie dużych dawek leków alkilujących samodzielnie lub w skojarzeniu z napromienianiem całego ciała (TBI). Nie wykazano przewagi jednego sposobu nad drugim. Grupa niemiecka wykazała, że TBI można kojarzyć z analogiem puryn – fludarabiną w miejsce stosowanego uprzednio cyklofosfamidu. Przyczynia się to do zmniejszenia toksyczności przy zachowanej dużej skuteczności. W obecnym projekcie zakłada się, że jeszcze korzystniejsze może być stosowanie TBI w skojarzeniu z innym analogiem puryn – kładrybiną. Założenie to jest oparte na wynikach badań grupy PALG, w których wykazaliśmy, że dołączenie kładrybiny do daunorubicyny i cytarabiny w toku leczenia indukcyjnego zwiększa szansę uzyskania całkowitej remisji (CR) i prawdopodobieństwo przeżycia u chorych na OBSz, w tym na OBSz poprzedzoną MDS. Efektu takiego nie zaobserwowaliśmy dla fludarabiny. Oba leki zwiększają stężenie Ara-CTP w blastach białaczkowych. Jednak tylko w przypadku kładrybiny wykazano bezpośrednie działanie cytotoksyczne, a także hypometylujące, co uzasadnia stwierdzone różnice skuteczności. Wstępne pilotowe doświadczenia własne wskazują na dobrą tolerancję skojarzenia TBI z kładrybiną w ramach protokołu przygotowania do alloHSCT.

W 06.2020 roku otwarto pierwsze niekomercyjne badanie kliniczne (ClatBI/2019) mające na celu ocenę efektywności i bezpieczeństwa tego leczenia. Do tej pory w screeningu było 4 pacjentów. Ostatecznie 2 pacjentów z 16 planowanych do tej pory zostało włączonych.

Już w trakcie trwania tego projektu pojawiła się możliwość pełnego finansowania niekomercyjnych badań klinicznych z budżetu Agencji Badań Medycznych. Złożony w konkursie projekt badania zakładał podobny schemat leczenia jednak w szerszej grupie pacjentów. Uwzględniono w nim wszystkie typy allo-HCT jak i pacjentów przeszczepianych z powodu MDS. Na początku 2020 r. przyznano finansowanie na to badanie, a w 05.2020 r. podpisano umowy z Agencją Badań Medycznych na jej finansowanie. W 11.2020 r. złożono do URPL jak i do komisji bioetycznej pełną dokumentację potrzebną do rejestracji badania klinicznego o kryptonimie CLARA. Badanie to zostanie najpewniej otworzone w I kwartale 2021 roku.

6.10.6. Ocena częstości występowania oraz podtypów klinicznych zmian skórnych w przebiegu przewlekłej choroby przeszczep-przeciw-gospodarzowi (GVHD) u pacjentów po allogenicznnej transplantacji krwiotwórczych komórek macierzystych (alloHSCT) w zależności od rodzaju dawcy i leczenia przygotowującego do przeszczepienia.

Wykonawcy: G. Kamińska-Winciorek, T. Czerw, M. Krawczyk-Kuliś, A. Szlauer-Stefańska, W. Mendrek, A. Frankiewicz, M. Ociepa, M. Saduś-Wojciechowska, K. Michalak, M. Sobczyk-Kruszelnicka, J. Najda, M. Pawełczak-Szostak, J. Hołowiecki, S. Giebel

Celem pracy jest analiza porównawcza stopnia nasilenia i podtypów klinicznych zmian skórnych w przebiegu przewlekłej choroby przeszczep przeciwko gospodarzowi (GvHD) w zależności od rodzaju dawcy i sposobu leczenia przygotowującego przed procedurą allogenicznego przeszczepiania komórek macierzystych.. W roku 2019 rozpoczęto pierwszy etap projektu obejmujący aktualną ocenę dotychczas opisywanych zmian skórnych w przeprowadzonym całościowym badaniu dermatologicznym; według kryteriów oceny w modyfikacji własnej u pacjentów poddanych procedurze alloHSCT, w szczególności z potwierdzoną w wywiadzie przewlekłą skórą GVHD . Ponadto rozpoczęto prospektywną ocenę kliniczno-dermoskopową w przypadku nowych rozpoznań skórnych objawów przewlekłej GvHD u pacjentów pozostających w obserwacji Przyklinicznej Poradni Transplantacji Szpiku w Gliwicach.

Ze względu na fakt późnego występowania przewlekłej skórnej postaci GVHD (około 80 dnia nawet do 200 dnia według danych literaturowych) w aspekcie prospektywnego charakteru prowadzonej obserwacji, powyższy projekt wymaga przedłużenia w czasie ze względu na zmianę harmonogramu i sposobu przyjęć (m.in. teleporady, ograniczenie przyjazdów, kontrole w miejscu zamieszkania) pacjentów do Kliniki Transplantacji Szpiku i Onkohematologii oraz Poradni Transplantacji Szpiku ze względu na pandemię COVID-19.

W prowadzonym projekcie uwzględniającym całościowe badanie skóry - z opisywaniem objawów skórno-śluzówkowych w przebiegu GVHD, ale również zmian skórnych w przebiegu chorób limfoproliferacyjnych, potencjalnych nowotworów skóry oraz innych rzadkich powikłań ze strony narządów wewnętrznych, uzyskano wartościowy zbiór unikatowej dokumentacji fotograficznej. Wstępne wyniki obserwacji przedstawiono w formie poniższych publikacji naukowych w recenzowanych czasopismach medycznych:

1. Szlauer-Stefańska A, Kamińska-Winciorek G, Giebel S, Bagłaj M. Secondary skin neo-plasms in patients after autologous and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation procedures. *Adv Clin Exp Med*. 2020 Oct;29(10):1221-1230. doi: 10.17219/acem/126739. PMID: 33064381.
2. Kaminska-Winciorek G, Zalaudek I, Mendrek W, Jaworska M, Gajda M, Hołowiecki J, Szymshal J, Giebel S. Dermoscopy of Cutaneous Graft-Versus-Host-Disease in Patients After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Dermatol Ther (Heidelb)*. 2020 Oct;10(5):1043-1061. doi: 10.1007/s13555-020-00423-6. Epub 2020 Jul 16. PMID: 32676797; PMCID: PMC7477036.
3. Szlauer-Stefańska A, Krawczyk-Kuliś M, Kamińska-Winciorek G, Bobek-Billewicz B, Giebel S. Pulmonary Complications After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Multiple Myeloma: A Case Report. *Transplant Proc*. 2020 Oct;52(8):2551-2553. doi: 10.1016/j.transproceed.2020.01.123. Epub 2020 May 19. PMID: 32444124.
4. Hernández-Boluda JC, Pereira A, Kröger N, Beelen D, Robin M, Bornhäuser M, Ange-lucci E, Vittek A, Blau IW, Niittyvuopio R, Finke J, Cornelissen JJ, Passweg J, Dreger P, Petersen E, Kanz L, Sanz J, Zuckerman T, Zinger N, Iacobelli S, Hayden P, Czerw T, McLornan D, Yakoub-Agha I. Determinants of survival in myelofibrosis patients undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Leukemia*. 2020 Apr 14. doi: 10.1038/s41375-020-0815-z. Epub ahead of print.

6.11. Zastosowanie metabolomiki opartej na spektroskopii HR NMR do oceny toksyczności radiochemioterapii u chorych na raka regionu głowy i szyi

Kierownik: M. Sokół

Wykonawcy: Ł. Boguszewicz, A. Skorupa, M. Cizek, M. Sokół, M. Kijonka

W raportowanym programie badawczym analizowane są próbki surowicy krwi pobrane w trakcie leczenia radio- i chemioradioterapią chorych z nowotworami regionu głowy i szyi. Badaną grupę stanowi 230 pacjentów. Z tej grupy wyodrębniono 53 pacjentów leczonych chemioterapią indukcyjną (iCHT). Pacjenci otrzymali od 1 do 3 cykli iCHT w schemacie TPF lub PF. Odpowiedź na leczenie indukcyjne była oceniana na podstawie porównania wykonanych przed i po iCHT badań lekarskich, endoskopowych i radiologicznych (MRI, TK, PET).

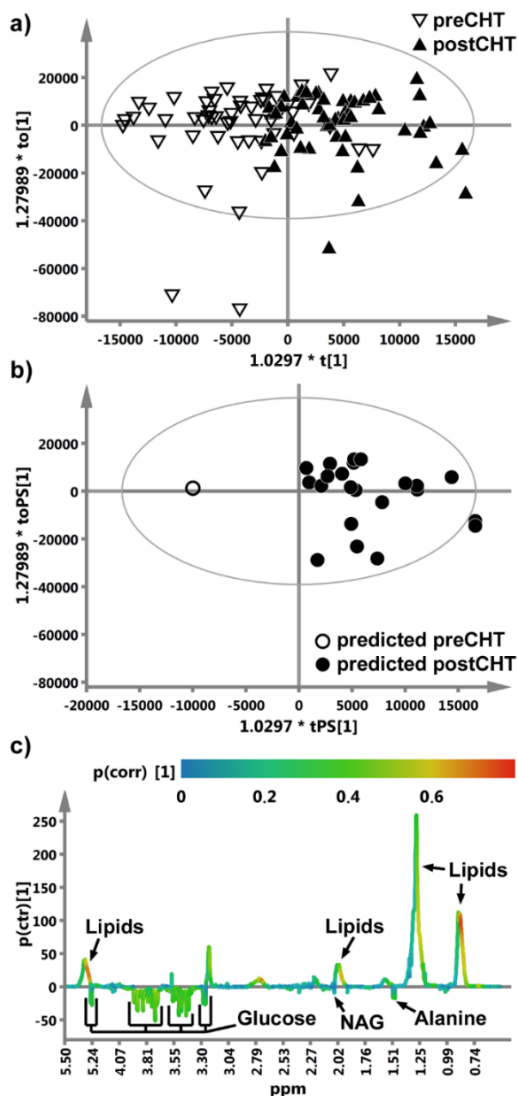
Wpływ iCHT na profil metaboliczny surowicy krwi oceniono na podstawie porównania próbek pobranych przed pierwszym cyklem i po zakończeniu leczenia z wykorzystaniem spektroskopii NMR wysokiej rozdzielczości (HR NMR). Dla każdej próbki surowicy krwi zostały zmierzone widma NMR, które następnie zostały poddane analizom wielowymiarowym.

Uzyskano następujące wyniki:

Rysunek 1. Wynik analizy OPLS-DA.

1. Do rozróżnienia próbek krwi pobranych przed i po iCHT wykorzystano nadzorowaną

metodę OPLS-DA (orthogonal partial least squares discriminant analysis).



Model OPLS-DA został zwalidowany przy pomocy zewnętrznego zestawu testowego (24 próbki krwi) oraz metody permutacyjnej i ANOVA z walidacją krzyżową.

Na podstawie Rysunku 1 a i c zidentyfikowano charakterystyczne dla iCHT zaburzenia w profilu metabolicznym surowicy krwi: wzrost sygnałów lipidowych oraz obniżenie poziomu glukozy, alaniny i N-acetylo glikoprotein (NAG – marker stanu zapalnego).

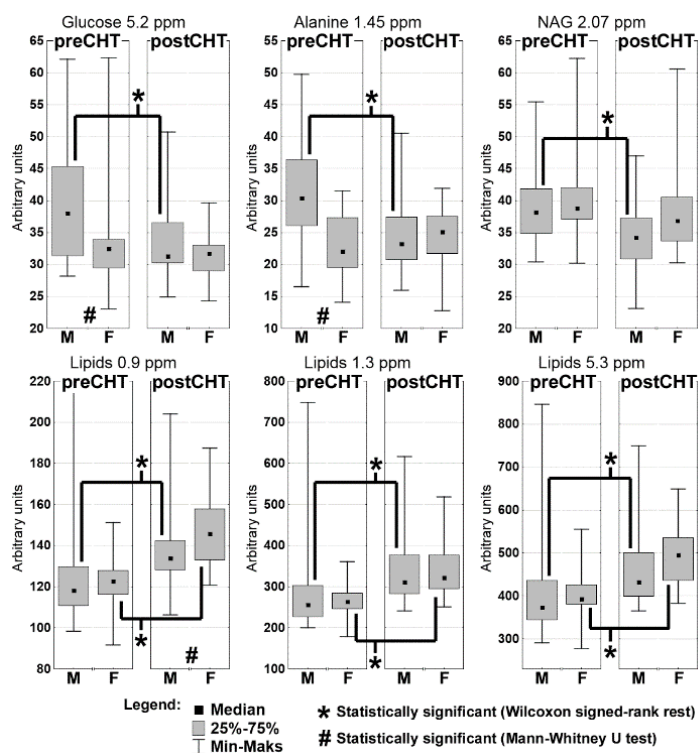
2. Metaboliczna odpowiedź na iCHT wykazuje różnice związane z płcią.

Metabolity zidentyfikowane w punkcie 1 przeanalizowano z wykorzystaniem klasycznych metod statystycznych: test U Manna-Whitneya oraz test kolejności par Wilcozona. Uzyskane wyniki prezentuje Rysunek 2. U mężczyzn, w próbkach pobranych przed iCHT, zaobser-

wowano istotnie podwyższone poziomy glukozy i alaniny (w porównaniu do kobiet), które pod wpływem iCHT uległy obniżeniu. Ponadto u mężczyzn po zakończonej iCHT istotnie zmalał sygnał pochodzący od NAG. W przypadku kobiet sygnały pochodzące od glukozy, alaniny i NAG nie wykazały różnic przed i po leczeniu.

3. Odpowiedź metaboliczna na iCHT wykazuje istotne korelacje z kliniczną odpowiedzią na leczenie (korelacja Spearmana).

W przypadku mężczyzn, spowodowany iCHT wzrost sygnałów lipidowych oraz obniżenie NAG istotnie korelują z regresją guza pierwotnego ocenianą na podstawie badań obrazowych oraz klinicznych (zmniejszenie stopnia zaawansowania T). U kobiet, zmiany w profilu metabolicznym surowicy krwi nie wykazały żadnej korelacji z odpowiedzią na leczenie. Nie wykazano też żadnej korelacji (u kobiet i mężczyzn) pomiędzy zmianami w profilu metabolicznym, a zmniejszeniem zaawansowania węzłowego (N).



Rysunek 2. Różnice w poziomach istotnych metabolitów z uwzględnieniem płci.

Formy prezentacji wyników:

1. Przygotowano i przesłano do recenzji w czasopiśmie BMC Cancer (IF = 3.150) publikację pt. *Molecular response to induction chemotherapy and its correlation with treatment outcome in head and neck cancer patients by means of NMR-based metabolomics.*
2. Wystąpienie na konferencji XXIV Gliwickie Spotkania Naukowe, 20-21.11.2020, Gliwice, Abstract book.

Finansowanie: Grant NCN OPUS 9; 2015/17/B/NZ5/01387

6.12. Indywidualizacja i optymalizacja metod skojarzonego leczenia chorych na raka płuca, odbytnicy i gruczołu krokowego przy wykorzystaniu molekularnych, proteomicznych i biochemicznych markerów prognostycznych i predykcyjnych.

Kierownik: R. Suwiński

6.12.1. Walidacja i wdrożenie sygnatur prognostyczno-predykcyjnych dla indywidualizacji i optymalizacji konformalnej radioterapii skojarzonej z chemioterapią u chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca w stopniu zaawansowania IIIA2 i IIIB.

Wykonawcy: R. Suwiński, K. Galwas-Kliber, M. Gigłok, D. Butkiewicz, G. Plewicki, M. Kalinowska-Herok, M. Krześniak, I. Matuszczyk, A. Fiszer-Kierzkowska, A. Mazurek, A. Gdowicz-Kłosok, U. Bojko, E. Matusecka, I. Domińczyk, M. Rusin, A. Idasiak, B. Jochymek, D. Sygula, B. Klusek, R. Deja, J. Gliwińska, J. Mrochem-Kwarciak

W 2020 roku złożono do publikacji pracę, zrealizowaną we współpracy z Politechniką Śląską w Gliwicach, zatytułowaną "Mathematical model predicts response to chemotherapy in advanced non-resectable

non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based doublet” Kozłowska E, Suwiński R, Giglok M, Świerniak A, Kimmel M. PLoS Comput Biol. 2020 Oct 5;16(10):e1008234.

W pracy tej opisano zmienne kliniczne pozwalające prognozować odpowiedź na chemioterapię u chorych na zaawansowanego miejscowo drobnokomórkowego raka płuca. Zaproponowano optymalizację schematów chemioterapii w oparciu o przedstawione symulacje modelowe.

Elementem realizacji tej części zadania badawczego były też dwie publikacje pełnotekstowe o charakterze poglądowym opublikowane na łamach recenzowanych czasopism naukowych o zasięgu światowym: (1) Rafal Suwinski. Prophylactic cranial irradiation in SCLC. Translational Lung Cancer Research (praca przyjęta do publikacji) oraz (2) Combination of immunotherapy and radiotherapy in the treatment of brain metastases from non-small cell lung cancer Journal of Thoracic Disease. (praca przyjęta do publikacji).

W zaawansowanej fazie przygotowań jest publikacja dotycząca porównania konwencjonalnie frakcjonowanej i przyspieszonej radioterapii (w skojarzeniu z chemioterapią) u chorych na miejscowo zaawansowanego niedrobnokomórkowego raka płuca.

W 2019 roku, we współpracy z Wydziałem Automatyki, Elektroniki i Informatyki Politechniki Śląskiej w Gliwicach, uzyskano grant NCN „Uczenie maszynowe, modelowanie biologiczne i przetwarzanie obrazów medycznych w prognozowaniu przerzutów raka płuca”. Pozwoli on na dalszą realizację zadania badawczego ze szczególnym uwzględnieniem wykorzystania zaawansowanych narzędzi statystycznych.

6.12.2. Porównanie tolerancji i skuteczności miejscowej samodzielnej hiperfrakcjonowanej radioterapii przedoperacyjnej i hiperfrakcjonowanej radioterapii przedoperacyjnej w skojarzeniu z chemioterapią u chorych na raka odbytnicy wraz z oceną możliwości optymalizacji i indywidualizacji leczenia skojarzonego w oparciu o badania markerów biochemicznych.

Wykonawcy: A. Idasiak, I. Dębosz-Suwińska, A. Chmielarz, E. Chmielik, E. Stobiecka, S. Pakuło, D. Butkiewicz, J. Pamuła-Pilat, K. Tęcza, J. Łanuszewska, R. Deja, M. Prokop, J. Wydmański, J. Mrochem-Kwarciak, R. Suwiński

W latach 2016 - 2020 zgodnie z w/w protokołem prowadzonego badania III fazy zrandomizowanych zostało łącznie 189 chorych leczonych w II Klinice Radioterapii i Chemioterapii NIO Gliwice. Pierwotne punkty badania obejmowały ocenę wczesnej toksyczności wg RTOG/EORTC, odsetka zachowanych zwieraczy, odsetka powikłań okołoperacyjnych oraz ocenę odpowiedzi na leczenie w materiale pooperacyjnym (TRG). Ocena odsetka wyleczeń miejscowych (LRC), przeżycia wolnego od przerzutów (MFS) oraz przeżyć całkowitych (OS) stanowiła drugoplanowy cel badania.

W roku 2020 dokonano oceny wyników leczenia w grupie 136 chorych na miejscowo zaawansowanego raka odbytnicy po przeprowadzonym zabiegu operacyjnym poddanych przedoperacyjnej radio-(HART)/radiochemioterapii hiperfrakcjonowanej (HART-CT) w ramach badania III fazy z randomizacją (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01814969). U wszystkich chorych przeprowadzono radioterapię przedoperacyjną frakcjonowaną 2 razy dziennie do dawki całkowitej 42 Gy w dawkach frakcyjnych 1.5 Gy. W analizowanej grupie chorych zrandomizowanych do ramienia radiochemioterapii (HART-CT) jedno-

czasowo prowadzono leczenie systemowe w oparciu o fluoropirymidyny podając 1-2 trydniowe cykle chemioterapii 5-Fu (325mg/m²). Operację przeprowadzono 6-7 tygodni po zakończonej HART / HART-CT.

Odsetek chorych, u których odnotowano zdarzenia niepożądane podczas prowadzonego leczenia wyniósł 12% w porównaniu z 17% odpowiednio dla HART i HART-CT. Operację oszczędzającą zwieracze przeprowadzono w 52% vs. 62% odpowiednio dla HART i HART-CT ($p = 0,06$). Spośród 136 chorych poddanych ocenie pod względem odpowiedzi na leczenie (TRG) odnotowano: 3 (4%) vs. 9 (13%), 16 (23%) vs. 24 (36%), 40 (58%) vs. 30 (45%); 10 (15%) vs. 4 (6%) chorych z potwierdzonym TRG 0, 1, 2 i 3, odpowiednio dla HART vs. HART-CT, różnica pomiędzy grupami była statystycznie istotna ($p = 0,002$). Aktualizowane 2-letnie przeżycia wolne od nawrotu w obrębie miednicy (LRC) wyniosły 86% vs. 91%, przeżycia wolne od nawrotu choroby (DFS) wyniosły 70% vs. 76% odpowiednio dla HART vs. HART-CT. Oceniając TRG jako dwie podgrupy (TRG 0-1 lub TRG 2-3), wykazano znaczącą różnicę w zakresie: 2-letniego DFS: TRG 0-1: 94% w porównaniu z TRG 2-3: 60%, ($p = 0,0006$); 2-letniego przeżycia wolnego od przerzutów odległych (MFS) TRG 0-1: 94% w porównaniu z TRG 2-3: 70%, ($p = 0,0027$) oraz przeżyć wolnych od nawrotu w obrębie miednicy (LRC): TRG 0-1: 96% w porównaniu z TRG 2-3: 82%, ($p = 0,014$).

Wstępna analiza wyników badania III fazy (z randomizacją) wykazała akceptowalny profil toksyczności zaproponowanych schematów leczenia u chorych na miejscowo zaawansowanego raka odbytnicy. Analiza wyników leczenia dla podgrup wykazała istotne różnice w ocenie odpowiedzi na leczenie (TRG) w zależności od ramienia badania. Zarówno LRC, MFS jak i DFS u chorych na raka odbytnicy leczonych za pomocą HART vs. HART-CT miały korzystne wyniki w tych przydzielonych do HART-CT. Również współczynnik zachowania zwieraczy zwykle sprzyjał HART-CT. Wysoki odsetek zachowanych zwieraczy w analizowanych grupach chorych oraz znaczny odsetek odpowiedzi całkowitych oraz dużego stopnia stwierdzony w badaniu histopatologicznym umożliwiającym w wielu przypadkach odstępianie od adjuwantowej pooperacyjnej chemioterapii uzasadnia kontynuację rekrutacji do badania III fazy z randomizacją. Realizacja badania będzie kontynuowana w 2021 roku.

6.12.3. Optymalizacja schematów frakcjonowania radioterapii chorych na raka gruczołu krokowego z wykorzystaniem metod obrazowania funkcjonalnego NMR i markerów biochemicznych.

Wykonawcy: B. Smolska-Ciszewska, R. Deja, M. Giglok, G. Plewicki, K. Behrendt, K. Galwas-Kliber, A. Idasiak, E. Małusecka, M. Latos, J. Mrochem-Kwarciak, R. Suwiński

Głównym celem tej części zadania badawczego jest prospektywne porównanie teleradioterapii z hipofrakcjonowaną dawką uzupełniającą (tzw. boost) z konwencjonalnie frakcjonowaną teleradioterapią przy użyciu przyspieszacza liniowego. W 2020 roku kontynuowano rekrutację chorych do badania: dotychczas zrekrutowano 60 chorych. Projekt realizowany jest we współpracy z Oddziałem Urologii Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego w Opolu (lek Sebastian Ciszewski). W 2020 roku obok konty-

nuacji dotychczasowej części projektu wyznaczono nowe cele badawcze, spośród których należy wyróżnić:

1. Ocenę wyników leczenia chorych na raka stercza z udziałem boost'ów z radioterapii stereotaktycznej, w szczególności porównanie toksyczności i skuteczności leczenia chorych w dwóch grupach: z udziałem dwóch boost'ów z radioterapii stereotaktycznej (2xSBRT) oraz trzech boost'ów z SRT (3xSBRT).
2. Kontynuację rekrutacji do randomizowanego projektu medycznego 3-iej fazy, którego celem jest prospektywne porównanie teleradioterapii z dawką uzupełniającą wg schematu hipofrakcjonowanego SRT, realizowanego przy użyciu przyspieszacza liniowego lub RT-FK.
3. Retrospektywną analizę wyników leczenia chorych na raka stercza z udziałem brachyterapii śródmiąższowej HDR oraz z zastosowaniem hipofrakcjonowanej teleradioterapii – na podstawie obrazów dyfuzji NMR wykonanych przed radioterapią w odniesieniu do rozpoznania histopatologicznego, a w następnej kolejności - do skuteczności miejscowej leczenia.
4. Porównanie jakości życia chorych na raka gruczołu krokowego poddanych leczeniu radykalnemu: prostatektomii i radioterapii w odniesieniu do skuteczności zastosowanych metod terapeutycznych.

W ramach realizacji tej części projektu został wszczęty w 2020 roku przewód doktorski (lek. Sebastian Ciszewski), opiekunem projektu jest prof. Rafał Suwiński.

W 2021 roku planowane jest podsumowanie analiz retrospektywnych w formie maszynopisu i kontynuacja rekrutacji do prospektywnej części projektu.

6.12.4. Wpływ rozkładu dawek biologicznych w podobszarach GTV guza pierwotnego i sumarycznego GTV regionalnych węzłów chłonnych (śródpierście) z dawką NTD << D100 na szacowaną szansę miejscowego wyjałowienia (TCP) w radykalnej radioterapii niedrobnokomórkowego raka płuca.

Wykonawcy: A. Maciejewski, I. Dębosz-Suwińska, R. Suwiński, A. Napieralska, D. Gabryś, A. Namysł-Kaletka, D. Bodusz, G. Woźniak, M. Kraszkiewicz, M. Miszczyk

W ramach realizacji zadania badawczego, dokonano pomiarów objętości guza pierwotnego i przerzutowo zmienionych węzłów chłonnych śródpierścia, w oparciu o obrazowanie PET/CT w grupie 147 chorych na miejscowo zaawansowanego nie drobnokomórkowego raka płuca w stopniu zaawansowania IIIAN2 i IIIB leczonych z zastosowaniem radiochemioterapii. W tej grupie raka płaskonabłonkowego rozpoznano u 101 chorych, raka gruczołowego u 13 chorych, natomiast u 33 nie udało się sprecyzować podtypu histopatologicznego (NOS). Wyniki analizy wykazały istotną statystycznie przewagę klasyfikacji wolumetrycznej raka płuca (tj. klasyfikacji opartej na pomiarach objętości guza pierwotnego i przerzutowo zmienionych węzłów chłonnych) w stosunku do klasyfikacji TNM. Generalnie, objętość węzłów chłonnych (VN) była średnio około 10-krotnie mniejsza niż objętość guza pierwotnego (VT) i to właśnie VT stanowiła najsilniejszy czynnik prognostyczny, zarówno dla wyleczeń miejscowych jak i przeżyć całkowitych. W 2020 roku wykorzystano wyniki realizacji tej części projektu do przygotowania, we współpracy z Wydziałem Automatyki, Elektroniki i Informatyki Politechniki Śląskiej w Gliwii

cach wniosku grantowego NCN „Uczenie maszynowe, modelowanie biologiczne i przetwarzanie obrazów medycznych w prognozowaniu przerzutów raka płuca”. Wniosek uzyskał finansowanie, co pozwoli na kontynuację realizacji tego projektu w 2021 roku. W zaawansowanej fazie przygotowań jest maszynopis pracy “PET/CT Based Volumetric Staging Surpasses TNM as Prognosticator of Survival in Curative Radio-chemotherapy for Locally Advanced Non-small Cell Lung Cancer”, jego ukończenie jest planowane w 2021 roku.

Publikacje w 2020 roku związane z realizacją programu badawczego 6.12 Publikacje pełnotekstowe opublikowane w recenzowanych czasopismach:

1. Rafal Suwinski. Prophylactic cranial irradiation in SCLC. Translational Lung Cancer Research 10.21037/tlcr-2020-rtm-05 (praca przyjęta do publikacji)
2. Rafal Suwinski Combination of immunotherapy and radiotherapy in the treatment of brain metastases from non-small cell lung cancer Journal of Thoracic Disease. 0.21037/jtd-2019-rbmlc-08 (praca przyjęta do publikacji)
3. Kozłowska E, Suwiński R, Gigłok M, Świerniak A, Kimmel M. Mathematical model predicts response to chemotherapy in advanced non-resectable non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based doublet. PLoS Comput Biol. 2020 Oct 5;16(10):e1008234.
4. Zeman M, Czarnecki M, Grajek M, Idasiak A, Tukiendorf A, Czarniecka A. Assessment of the risk of permanent stoma after low anterior resection in rectal cancer patients” World Journal of Surgical Oncology (2020) 18:207
5. Zeman M , Czarnecki M, Chmielarz A, Idasiak A, Grajek M, Czarniecka A „Evaluation of risk factors for postoperative complications in rectal cancer patients” w Polski Przegląd Chirurgiczny 2020: 92 (5):

6.13. Optymalizacja i indywidualizacja technik planowania leczenia w radioterapii.

Kierownik: K. Ślosarek

6.13.1. EPID – jako element QA w realizacji radioterapii.

Wykonawcy: J. Wendykier, A. Grządziel, D. Plaza, B. Bekman, Ł. Dolla, W. Osewski, K. Ślosarek

Celem pracy jest wykorzystanie dozymetrii portalowej (EPID) w ocenie precyzji realizacji radioterapii.

Materiał i metoda

Podczas prowadzonej radioterapii, w czasie seansu terapeutycznego prowadzona była detekcja wiązek promieniowania po osłabieniu w ciele pacjenta. Do akwizycji sygnału wykorzystano EPID (Electronic Portal Imaging Device), będący matrycą detektorów półprzewodnikowych, umieszczoną prostopadle do osi wiązki. Pomiary wykonano dla statycznej i dynamicznej (IMRT/VMAT) techniki napromieniania. Porównano zmierzone rozkłady dawek pomiędzy poszczególnymi seansami terapeutycznymi, korzystając ze współczynnika gamma. Rozkłady dawek uznano za zgodne, jeżeli współczynnik gamma był

mniejszy od jedności w 98% analizowanego pola w zakresie 2% i 2mm. Pomiary wykonano dla 74 pacjentów, których zgrupowano używając kryterium lokalizacji i zastosowanej techniki napromieniania. Wyróżniono cztery grupy: napromienianie piersi ze wstrzymanym oddechem, ściana klatki piersiowej (pacjentki po mastektomii), radiochirurgia oraz przypadki różne. Przeanalizowano 6 798 rozkładów dawek. Przyjęto, że rozkłady są zgodne, jeżeli spełniały warunek gamma, a co za tym idzie, proces podania dawki jest uznany za powtarzalny. Do analizy zastosowano test statystyczny nieparametryczny dla grup niezależnych. W każdej z czterech grup wykonano analizę liczby rozkładów spełniających kryterium zgodności.

Wyniki

Wykonana analiza wskazuje, że procent zgodności zmierzonych rozkładów dawek, które spełniają kryterium zgodności, wynosi: dla lokalizacji piersi-58% (swobodny oddech), 21% (wstrzymany oddech), techniki SRS-91%, a w przypadku pozostałych lokalizacji -75%.

Wnioski

Wykonana analiza zmierzonych rozkładów dawek przez EPID podczas seansu terapeutycznego wykazuje, że najmniejsza zgodność pomiędzy frakcjami dotyczy napromieniania piersi na wstrzymanym oddechu, a największą uzyskuje się w technikach radiochirurgicznych. Oznacza to, że w napromienianiu piersi powinno się uwzględnić 2mm margines.

Publikacja w załączniku.

6.13.2. Ocena przydatności aplikatorów indywidualnych, w brachyterapii nowotworów skóry, zlokalizowanych w rejonie głowy i szyi, na podstawie wybranych parametrów dozymetrycznych i wolumetrycznych rozkładów dawek.

Wykonawcy: M. Szlag, A. Cholewka, A. Pfeifer, M. Stąpór-Fudzińska, K. Ślosarek, S. Kellas-Ślęczka, P. Wojcieszek

Głównym celem badania było wskazanie parametrów dozymetrycznych i wolumetrycznych do oceny, raportowania i porównywania rozkładów dawki w brachyterapii raka skóry rejonu głowy i szyi za pomocą aplikatorów indywidualnych. Wieloletnie doświadczenie w obliczaniu rozkładów z wykorzystaniem aplikatorów indywidualnych, wykonywanych autorską metodą w Zakładzie Brachyterapii w Gliwicach, pozwala na wnikliwą analizę parametrów dozymetrycznych oraz wolumetrycznych planów leczenia w brachyterapii powierzchniowej. W obliczu pojawiających się doniesień i pierwszych rekomendacji związanych z pojawieniem się komercyjnie dostępnych nowoczesnych algorytmów obliczania rozkładów dawek za zasadne uznaliśmy odniesienie się do publikowanych badań. W tym celu dokonaliśmy porównania rozkładów dawek otrzymanych dla pacjentów leczonych brachyterapią kontaktową obliczonych klasycznym algorytmem TG43 oraz nowym algorytmem modelowania dawki zaprezentowanym w raporcie grupy badawczej TG 186.

Ocenie podlegały najważniejsze parametry dozymetryczne i wolumetryczne służące do raportowania i ewaluacji rozkładu dawki dla tego rodzaju aplikacji. Otrzymane rezultaty wskazały na statystycznie istotne różnice w wartościach parametrów dozymetrycznych otrzymanych na podstawie planów leczenia obliczonych z użyciem dwóch różnych formalizmów.

Badania wskazały również na konieczność dalszej pogłębionej retrospektywnej analizy wyników obliczeń z wykorzystaniem nowoczesnych algorytmów w celu oceny wpływu tych obliczeń na efekty kliniczne.

Badania zostały przedstawione w formie ustnej prezentacji w trakcie sesji poświęconej brachyterapii skóry podczas VII Konferencji Polskiego Towarzystwa Brachyterapii i będą przedmiotem publikacji.

6.14. Stereotaktyczna radiochirurgia i radioablacja nowotworów i chorób czynnościowych.

Kierownik: L. Miszczyk

6.14.1. Optymalizacja i indywidualizacja radioterapii stereotaktycznej guzów i zmian nienowotworowych ośrodkowego układu nerwowego, kręgosłupa i narządów miękkich.

Wykonawcy: S. Blamek, M. Stankiewicz, D. Larysz, A. Roch-Zniszczoł, D. Gabryś, I. Dębosz-Suwińska, K. Ficek, A. Kruczek, D. Syguła, A. Łuczak, K., A. Napieralska, B. Bekman, M. Stąpór-Fudzińska, A. Grządziel, M. Miszczyk, T. Latusek, K. Ślosarek, L. Miszczyk

Najistotniejszym wynikiem realizacji zadania badawczego w roku 2020 jest rozprawa doktorska dr Magdaleny Stankiewicz pod tytułem „Ocena wartości prognostycznej wybranych parametrów klinicznych i fizycznych u chorych poddanych radiochirurgii lub hipofrakcjonowanej radioterapii stereotaktycznej CyberKnife® z powodu przerzutów do mózgu”. Obrona odbyła się w dniu 07.09.2020 r. i na wniosek Recenzenta rozprawa została zgłoszona do wyróżnienia. Praca ta stanowi podsumowanie badań nad zastosowaniem systemu CyberKnife do leczenia chorych z pojedynczymi i mnogimi przerzutami do mózgu, zarówno metodą radiochirurgii stereotaktycznej (pojedyncza dawka promieniowania), jak i z wykorzystaniem schematów hipofrakcjonowanych.

Ukazała się również drukiem praca oparta na materiale przedstawionym w rozprawie doktorskiej dr Stankiewicz i stanowiąca rozwinięcie badań nad czynnikami związanymi z prawdopodobieństwem uzyskania kontroli miejscowej po zastosowaniu technik radiochirurgicznych u chorych z przerzutami do mózgu. Pracę opublikowano w czasopiśmie *Radiology and Oncology* (IF = 1,746). Wykazano m. in., że większa ilość przerzutów wiąże się z większym ryzykiem wznowy miejscowej po leczeniu, podobnie jak obecność aktywnych ognisk nowotworu poza mózgowiem, oraz że istnieje znormalizowana dawka progowa (BED), powyżej której ryzyko wznowy miejscowej jest mniejsze, niezależnie od zastosowanego schematu frakcjonowania.¹ Kolejny manuskrypt, poświęcony autorsko opracowanemu, nowemu wskaźnikowi prognostycznemu przeznaczonemu do szacowania czasu przeżycia u chorych z przerzutami do mózgu został skierowany do recenzji.

Opublikowano ponadto rozdział w zagranicznej monografii poświęconej zastosowaniu CyberKnife w neuroonkologii. Książka została wydana przez wydawnictwo Springer, a przygotowany przez dr hab.

Sławomira Blamka rozdział porusza problematykę powtarzania zabiegów radioterapii stereotaktycznej u chorych z guzami podstawy czaszki oraz w przypadku rozpoznania złośliwych nowotworów w tym obszarze.² Przygotowano także monografię przedstawiającą zasady obrazowania w procesie planowania radiochirurgii z powodu nerwobólu nerwu trójdzielnego.³ Dr hab. Dorota Gabryś przedstawiła miejsce pozaczaszkowej radiochirurgii stereotaktycznej u chorych na rozsialego raka piersi na podstawie doświadczeń własnych i przeglądu piśmiennictwa w trakcie EBCC 12 (European Breast Cancer Conference) w Barcelonie w marcu br.

Doświadczenia w zakresie pozaczaszkowej radiochirurgii stereotaktycznej zebrane w czasie dotychczasowej praktyki klinicznej pozwoliły ponadto na przygotowanie projektów prospektywnych badań klinicznych mających na celu ocenę bezpieczeństwa, a w dalszej perspektywie również skuteczności ablacji radiochirurgicznej tachykardii komorowych.

Rozpoczęto badanie o akronimie SMART-VT (Stereotactic Management of Arrhythmia - Radiosurgery in Treatment of Ventricular Tachycardia), które zostało zarejestrowane na stronie clinicaltrials.gov i otrzymało nr NCT04642963. Do momentu przygotowania raportu zrekrutowano dwóch chorych, którzy zostaną napromienieni w grudniu 2020 r. Badanie ma na celu ocenę bezpieczeństwa metody.

We współpracy z 30 ośrodkami kardiologicznymi i zakładami radioterapii z całej Europy powołano do życia konsorcjum STOPSTORM i przygotowano wniosek o finansowanie zakrojonego na szeroką skalę badania klinicznego mającego na celu ocenę bezpieczeństwa i skuteczności zastosowania radiochirurgii stereotaktycznej u chorych z rozpoznaniem tachykardii komorowych. Wniosek został przyjęty i badanie zyskało finansowanie w ramach programu HORIZON 2020. Dr hab. Sławomir Blamek został kierownikiem grupy roboczej odpowiedzialnej za przeprowadzenie prospektywnego badania klinicznego w Europie, a członkowie naszego zespołu uczestniczą również w pracach grup roboczych odpowiedzialnych za analizę danych retrospektywnych i prowadzenie procedur kontroli jakości radioterapii.

Piśmiennictwo – wyniki realizacji zadania badawczego w roku 2020:

1. Blamek S, Stankiewicz M, Maciejewski B. Clinical and volumetric predictors of local control after robotic stereotactic radiosurgery for cerebral metastases: Active systemic disease may affect local control in the brain. *Radiol Oncol.* 2020. doi:10.2478/raon-2020-0065
2. Blamek S. Reirradiation of Skull Base Tumors. In: Conti A, Romanelli P, Pantelis E, Soltys SG, Cho YH, Lim M, eds. *CyberKnife NeuroRadiosurgery*. Springer International Publishing; 2020:355-369. doi:10.1007/978-3-030-50668-1_30
3. Grządziel A ; Blamek S; Bekman B; Garbaciok S, Wendykier J, Ślosarek K. MR Imaging in Radiosurgery for Trigeminal Neuralgia. *MReadings: MR in RT, 6th Edition ESTRO 2020*; 2020; 14-17
4. Gabryś D. Is there is a place for SBRT in multiple metastases breast cancer? EBCC12 Barcelona, 18-20 March 2020

6.14.2. Zbadanie wpływu zastosowania nowoczesnych technik radioterapii na funkcjonowanie wszczepialnych urządzeń elektronicznych.

Wykonawcy: S. Blamek, D. Gabryś, B. Niewiadomska, A. Bekman, Ł. Dolla, A. Kruczek, A. Woźnica, M. Stąpór-Fudzińska, D. Larysz, M. Sokół, A. Orlef, T. Latusek, K. Śłosarek

W 2020 roku w ramach realizacji zadania badawczego opublikowano pracę podsumowującą wyniki badań nad aktywacją różnych typów urządzeń wszczepialnych przez wtórne neutrony emitowane przez aparaty terapeutyczne. Wykryto znaczące różnice w zakresie rodzaju i ilości izotopów poszczególnych pierwiastków w zależności od producenta urządzenia, jednak sumaryczne aktywności urządzeń nie różniły się w sposób istotny dla codziennej praktyki klinicznej.¹ Wyniki badań mogą jednakże posłużyć do optymalizacji doboru podzespołów i materiałów do konstrukcji urządzeń, co może przełożyć się na mniejsze ryzyko uszkodzeń wywołanych przez interakcje z neutronami. Opublikowano także pracę poświęconą aspektom organizacyjnym opieki kardioonkologicznej w Narodowym Instytucie Onkologii ze szczególnym uwzględnieniem opieki nad chorymi z urządzeniami wszczepialnymi w czasie radioterapii oraz badań MR.² Szczegółową analizę bezpieczeństwa radioterapii u chorych z CIED opublikowano w kolejnej pracy wykazując, że przestrzeganie przyjętych procedur postępowania pozwala na bezpieczną realizację leczenia promieniami.³ Wszystkie artykuły opublikowano w czasopiśmie posiadającym Impact Factor (odpowiednio 1,27 i dwa 1,874). Kontynuowano prace nad dokumentem opisującym standardy planowania i realizacji radioterapii u chorych z CIEDs. Opracowanie było aktualizowane stosownie do aktualnego stanu wiedzy oraz ukazujących się zaleceń, w tym raportu grupy roboczej (TG-203) Amerykańskiego Towarzystwa Fizyki Medycznej (AAPM) przez ekspertów PTRO, Polskiego Towarzystwa Fizyki Medycznej i Polskiego Towarzystwa Elektroradiologów. Przygotowane w ramach realizacji projektu zalecenia będą oficjalnym stanowiskiem towarzystw naukowych obowiązującym w całym kraju.

Piśmiennictwo – efekt realizacji badania w roku 2020:

1. Konefał A, Blamek S, Wrońska A, et al. Radioactivity induced in new-generation cardiac implantable electronic devices during high-energy X-ray irradiation. *Appl Radiat Isot.* 2020;163. doi:10.1016/j.apradiso.2020.109206
2. Tajstra M, Blamek S, Skoczylas I, et al. Two professions against two killer-diseases: the rationale, organization, and initial experience of cardio-oncology service. *Kardiol Pol.* November 2020. doi:10.33963/KP.15674
3. Niedziela JT, Blamek S, Gadula-Gacek E, et al. Radiation therapy in patients with cardiac implantable electronic devices. *Kardiol Pol.* December 2020. doi:10.33963/KP.15705

6.14.3. Radioabłacja chorych na raka stercza.

Wykonawcy: L. Miszczyk, A. Napieralska, A. Namysł-Kaletka, M. Kraszkiewicz, G. Woźniak, A. Tukien-dorf, M. Stąpór-Fudzińska, G. Głowacki, M. Miszczyk, J. Huszno

Wstęp: Z uwagi na niskie α/β , bardzo krótki czas leczenia oraz bardzo niski odsetek odczynów po le-czeniu wzrasta zainteresowanie radioabłacją jako podstawową metodą leczenia chorych na raka stercza z grupy niskiego i pośredniego ryzyka. Mając na uwadze obecną sytuację epidemiczną i wzrastającą zapadalność na ten nowotwór w naszym kraju, uzasadnia upowszechnienie tej metody leczenia w Pol-sce.

Materiał, metody: Materiał obejmuje 500 chorych na raka stercza (269 LR, 331 IR) napromienianych z użyciem CK df 7,25 Gy co drugi dzień do DC 36,25 Gy (OTT 10 dni). Oceniano toksyczność leczenia, stosowanie ADT i stężenie PSA. W stosunku do sprawozdania z roku 2019 materiał zwiększono o 100 kolejnych leczonych chorych i zaktualizowano do X 2020.

Wyniki: Mediana FU wynosiła 40,6 miesiąca. Poza dniem zakończenia leczenia (86%) ponad 90% cho-rych nie raportowało toksyczności GI. 4 krotnie odnotowano 1 chorego z odczynem G3 (1, 4, 20 i 56 mcy po SRT) i jednego z odczynem G4 (przetoka odbytniczo–cewkowa 26 mcy po SRT). Odczynów GU po zakończeniu SRT i po pierwszym miesiącu nie podawało odpowiednio 73% i 75% chorych; odsetek ten wzrósł do ponad 90% w kolejnych miesiącach.

Odczyn GU w stopniu 3 odnotowano tylko u 2 chorych w dniu zakończenia leczenia. Przed radioabłacją średnia stężenia PSA wynosiła 8,8 ng/ml (mediana 7,8), a 319 chorych stosowało ADT. Stężenie PSA zmniejszało się do 20 miesiąca po leczeniu i następnie osiągnęło plateau. Zmniejszanie się było wol-niejsze, a stężenie utrzymywało się wyższe w podgrupie IR bez ADT. Odnotowano 26 niepowodzeń (4,3%). Wyższe stężenia PSA nawet w pierwszych miesiącach po radioabłacji były związane z wyż-szym ryzykiem niepowodzenia.

Wnioski: Uzyskane wyniki pozwalają na sformułowanie wniosku, że radioabłacja chorych na raka ster-cza z grupy LR I IR jest skuteczną i bezpieczną metodą leczenia. Stężenie PSA przed leczeniem i w jego trakcie jest najistotniejszym czynnikiem prognostycznym i predykcyjnym nasilenia toksyczności leczenia i jego wyników. Skojarzenie radioabłacji chorych na PC z grupy IR z ADT pozwoliłoby praw-dopodobnie na poprawę wyników leczenia.

Ocena kinetyki PSA i nadiru po leczeniu została przeprowadzona włączając analizowaną grupę chorych do większej, między ośrodkowej bazy – publikacje poniżej.

Uzyskane w 2020 r. wyniki były podstawą do opublikowania/przedstawienia następujących prac nau-kowych:

Publikacje pełnotekstowe:

Radiother Oncol . 2020 Oct;151:26-32. doi: 10.1016/j.radonc.2020.07.014. Epub 2020 Jul 11.

Prostate-specific antigen kinetics and biochemical control following stereotactic body radiation therapy, high dose rate brachytherapy, and low dose rate brachytherapy: A multi-institutional analysis of 3502 patients

Rebecca Levin-Epstein, Ryan R Cook, J Karen Wong, Richard G Stock, D Jeffrey Demanes, Sean P Collins, Nima Aghdam, Simeng Suy, Constantine Mantz, Alan J Katz, Nicholas G Nickols, Leszek Miszczyk, Aleksandra Napieralska, Agnieszka Namysl-Kaletka, Nicholas D Prionas, Hilary Bagshaw, Mark K Buyyounouski, Minsong Cao, Brandon A Mahal, David Shabsovich, Audrey Dang, Ye Yuan, Matthew B Rettig, Albert J Chang, William C Jackson, Daniel E Spratt, Eric J Lehrer, Nicholas G Zaorsky, Patrick A Kupelian, Michael L Steinberg, Eric M Horwitz, Naomi Y Jiang, Amar U Kishan

IF 4,856

Radiother Oncol . 2020 Oct 7;154:207-213. doi: 10.1016/j.radonc.2020.09.053. Online ahead of print.

Dose-response with stereotactic body radiotherapy for prostate cancer: A multi-institutional analysis of prostate-specific antigen kinetics and biochemical control

Rebecca G Levin-Epstein, Naomi Y Jiang, Xiaoyan Wang, Shrinivasa K Upadhyaya, Sean P Collins, Simeng Suy, Nima Aghdam, Constantine Mantz, Alan J Katz, **Leszek Miszczyk**, Aleksandra Napieralska, Agnieszka Namysl-Kaletka, Nicholas Prionas, Hilary Bagshaw, Mark K Buyyounouski, Minsong Cao, Nzhde Agazaryan, Audrey Dang, Ye Yuan, Patrick A Kupelian, Nicholas G Zaorsky, Daniel E Spratt, Osama Mohamad, Felix Y Feng, Brandon A Mahal, Paul C Boutros, Arun U Kishan, Jesus Juarez, David Shabsovich, Tommy Jiang, Sartajdeep Kahlon, Ankur Patel, Jay Patel, Nicholas G Nickols, Michael L Steinberg, Donald B Fuller, Amar U Kishan

IF 4,856

Wykłady:

„Rola radioterapii w raku gruczołu krokowego LR i IR” – L. Miszczyk – VIII Ogólnopolska Konferencja – Nowotwory układu moczowego – wielospecjalistyczna współpraca drogą do sukcesu Białystok 20-22 II 2020

6.14.4. Ocena precyzji i skuteczności Stereotaktycznej Hipofrakcjonowanej Radiochirurgii (SHRS) Cyber Knife pojedynczych i mnogich przerzutów do kręgosłupa raka o różnych lokalizacjach

Wykonawcy: K. Szczepanik, B. Maciejewski, S. Blamek, A. Łuczak

Cel pracy: Celem pracy jest wstępna ocena wyników weryfikacji dozymetrycznej stereotaktycznej radiochirurgii w systemie Cyber Knife u chorych leczonych z powodu pojedynczych i mnogich przerzutów do kręgosłupa.

Materiał i metody: Grupa badana składała się ze 141 pacjentów (63 kobiety, 78 mężczyzn) z 89 pojedynczymi i 52 mnogimi przerzutami nowotworów złośliwych do kręgosłupa. Wiek pacjentów zawierał się w przedziale od 23 do 85 lat (średni wiek to 60,8 lat). Stosowano dawki całkowite od 8 do 40 Gy podane w 1 do 5 frakcjach. Dokonano oceny zgodności z planowaną dawką w punkcie referencyjnym w zależności od objętości obszaru tarczowego, lokalizacji zmian oraz przypisanej dawki frakcyjnej. Za wyniki prawidłowe uznawano wyniki w przedziale +5% do -5%. Do analizy wykorzystano współczynnik korelacji rang Spearmana oraz nieparametryczny test ANOVA rang Kruskala-Wallis.

Pomiarów dokonano w fantomie stałym wykonanym z metapleksu z 10 zatopionymi wolframowymi znacznikami oraz komory cylindrycznej PTW Semiflex 31010.

Wyniki:

1. Uzyskane wyniki pomiarów dozymetrycznych zawierały się w przedziale od -7% do +5,8%. Dwa pomiary weryfikacyjne powtarzano z powodu wyniku wykraczającego poza normę - wykonano kolejny plan weryfikacyjny z przesunięciem punktu referencyjnego.
2. Wynik korelacji rang Spearmana różnic procentowych weryfikowanej dawki w punkcie oraz objętości leczonej (PTV) wykazał statystycznie istotną umiarkowaną korelację (+0,4) z wynikami w okolicach -7,0% dla najmniejszych (ok. 0,5 cm³) objętości PTV.
3. Porównanie wyników weryfikacji dawki w punkcie w różnych lokalizacjach ognisk przerzutowych do kręgosłupa (C, Th, LS) nie wykazało różnic na poziomie statystycznie istotnym ($p=0,8280$).
4. Analiza korelacji rang Spearmana różnic procentowych dawki w punkcie oraz dawki frakcyjnej wykazała statystycznie istotną ($p<0,05$), umiarkowaną ($R= -0,38$) korelację ujemną.

Wnioski:

Otrzymane wyniki potwierdzają stosunkowo dużą niepewność weryfikacji dawki dla najmniejszych objętości tarczowych. Korelacja dawki frakcyjnej z wynikami weryfikacji dawki wynikać może z innych zależności (objętość PTV - dawka frakcyjna), co wymaga dalszych badań.

W założeniu otrzymane wyniki mają być podstawą do utworzenia manuskryptu i opublikowanie ich w czasopiśmie naukowym z listy filadelfijskiej.

6.15. Skojarzone leczenie chorych na raki przewodu pokarmowego i układu moczowo-płciowego.

Kierownik: L. Miszczyk

6.15.1. Ocena skuteczności i tolerancji radioterapii u chorych na raka żołądka. Ocena możliwości indywidualizacji leczenia w oparciu o markery molekularne i immunologiczne.

Wykonawcy: J. Wydmański, M. Gajek, A. Namysł-Kaletka, R. Suwiński, S. Półtorak, D. Lange, A. Chmielarz, M. Strączyński, M. Samborska-Plewicka, W. Leszczyński, K. Krysiak, Ż. Kaniszewska-Dorsz, E. Zembala-Nożyńska, P. Polanowski, J. Nieckula, W. Bal, M. Kraszkiewicz, W. Majewski, A. Chwieduk, A. Gdowicz-Kłosok, A. Chmura, Ł. Kleszyk, A. Matzullo, K. Dębiec

Cel pracy: Ocena tolerancji i skuteczności przedoperacyjnej radiochemioterapii w porównaniu do standardowej pooperacyjnej radiochemioterapii u chorych na raka żołądka oraz ocena wczesnych i późnych powikłań w narządach jamy brzusznej. Jednym z celów projektu jest identyfikacja czynników prognostycznych i predykcyjnych: genetycznych, proteomicznych, immunologicznych, histopatologicznych oraz metabolicznych. Ważnym aspektem prowadzonych badań jest standaryzacja radioterapii dla chorych na raka żołądka.

Materiał i metody badawcze: Przedmiotem analizy jest grupa 204 chorych na raka żołądka, 63 kobiety i 141 mężczyzn, w wieku od 25 do 74 lat (mediana 59). Kryteria kwalifikacji do badania klinicznego były następujące: potwierdzony w badaniu histopatologicznym gruczolakorak żołądka, stopień zaawansowania miejscowego umożliwiający radykalne leczenie operacyjne, wykluczenie przerzutów odległych, wiek chorego 20 – 75 lat, stopień sprawności chorego oceniany w skali ZUBROD 0-2, prawidłowe próby wątrobowe i nerkowe oraz pisemna zgoda chorego na udział w badaniu klinicznym.

Chorzy byli losowo dobierani do ramienia badawczego (A) i kontrolnego (B). W ramieniu A zastosowano neoadiuwantową radiochemioterapię z następową operacją i kontynuacją chemioterapii. W ramieniu B chorzy byli operowani, a następnie w zależności od oceny stopnia zaawansowania raka żołądka byli kwalifikowani do pooperacyjnej radiochemioterapii (IB-IV) lub obserwacji (IA). Schemat radiochemioterapii w obu ramionach był identyczny. Napromieniano żołądek (lub łóżę po żołądku) wraz z regionalnymi węzłami chłonnymi dawką frakcyjną 1,8 Gy do dawki całkowitej 45 Gy w czasie 5 tygodni. W trakcie radioterapii chory otrzymuje 2 cykle monochemioterapii 5-Fu w dawce 325 mg/m² d1-5 i d29-33 (na 1 h przed frakcją radioterapii). Chemioterapię kontynuowano wg schematu: 5-Fu 425 mg/m² d1-5 LV 20 mg/m² d1-5 (4 cykle w rytmie 28 dni).

Wyniki: Najczęstszymi powikłaniami były nudności i wymioty I i II stopnia, które stwierdzono u 50% chorych w grupie A i 31% w grupie B. Biegunka (I i II stopnia) wystąpiła u 24% i 33% chorych, odpowiednio w grupie A i B. Leukopenię I i II stopnia stwierdzono u ok. 60% chorych w ramieniu A i u 62% chorych w ramieniu B. U 2 chorych przerwano leczenie: u jednego chorego z powodu złej tolerancji, u drugiego chorego z powodu niedrożności przewodu pokarmowego. U 70% chorych przeprowadzono

radykałne leczenie chirurgiczne, w tym u 79,5% chorych w ramieniu A i u 63% chorych w ramieniu B. Ze względu na zaawansowanie miejscowe i/lub rozsiew guz był nieresekcyjny u 19% chorych w ramieniu A oraz u 30% chorych w ramieniu B. W okresie okołoperacyjnym w grupie A i B stwierdzono odpowiednio 4% i 4,5% zgonów. Nie stwierdzono istotnych różnic w powikłaniach chirurgicznych i niechirurgicznych w obu grupach chorych.

W grupie A 2- i 5-letnią miejscową kontrolę uzyskano odpowiednio u 67% i 57% chorych w porównaniu do 50% chorych w grupie B ($p=0,087$). Aktualizowane 2- i 5-letnie przeżycie całkowite wyniosło 48% i 35% oraz 48% i 40% odpowiednio w grupie A i w grupie B ($p=NS$).

Szczególnej ocenie poddano późne odczyny popromienne trzustki (1). Podczas obserwacji po leczeniu stwierdzono spadek stężeń α -amylazy u 19,7% pacjentów, natomiast stężenie lipazy spadło u 48,2% pacjentów. Spośród różnych klinicznych czynników wpływających na popromienne uszkodzenie funkcji zewnątrzwydzielniczej trzustki, wiek oraz stężenie enzymów trzustkowych przed leczeniem były istotne statystycznie. U pacjentów poniżej 65 lat odnotowano mniejsze ryzyko wystąpienia hipoamylazemii w porównaniu z pacjentami starszymi. Ryzyko wystąpienia uszkodzenia funkcji zewnątrzwydzielniczej silnie zależy od stężeń enzymów trzustkowych. Stwierdzono, że prawdopodobieństwo wystąpienia niewydolności zewnątrzwydzielniczej trzustki było mniejsze niż 0,2 u pacjentów, u których stężenie α -amylazy i lipazy przed leczeniem wynosiło odpowiednio 50U/L i 55U/L. Odnotowano również regenerację zewnątrzwydzielniczej funkcji trzustki, którą najwyraźniej obserwowano w ciągu 500 dni od leczenia. Stężenia lipazy i α -amylazy powróciły do normy odpowiednio u 39% oraz 31% chorych, przy czym powrót do normy jednego z enzymów trzustkowych, korelował z normalizacją stężenia drugiego enzymu trzustkowego.

Ponadto w analizie stosowanych technik radioterapii stwierdzono znamienne poprawę homogenności dawki w technice modulacji intensywności dawki w porównaniu do technik konformalnych, 1.08 vs 1.12 (2). W kolejnej publikacji wyznaczono optymalne marginesy CTV-PTV (3). W innej publikacji oceniono wartość planowania radioterapii w oparciu o badanie PET (4). W ostatnim artykule pogłębio no analizę popromiennego uszkodzenia trzustki i podjęto próbę określenia zależności dawka-skutek biologiczny w zakresie niewydolności zewnątrzwydzielniczej trzustki. Stwierdzono, że 80% całej objętości trzustki pochłonęło co najmniej 44,5 Gy. W zakresie badanych dawek od 32 do 48 Gy nie zaobserwowano wpływu dawki na efekt biologiczny. Całkowita dawka 45 Gy może prowadzić do subklinicznej niewydolności trzustki (hipolipazemia i hipoamylazemia), ale nie jest w stanie spowodować objawowego uszkodzenia trzustki.

Wnioski: Tolerancja leczenia w obu grupach chorych jest dobra. Wykazano zwiększone ryzyko wystąpienia niewydolności zewnątrzwydzielniczej trzustki po radiochemioterapii. W grupie chorych po neoadiuwantowej radiochemioterapii stwierdzono niższy odsetek nieresekcyjnych guzów żołądka oraz lepszą miejscową kontrolę nowotworu w porównaniu do grupy kontrolnej. Całkowita dawka 45 Gy może prowadzić do subklinicznej niewydolności trzustki (hipolipazemia i hipoamylazemia), ale nie jest w stanie spowodować objawowego uszkodzenia trzustki.

Formy prezentacji wyników:

Publikacje:

1. Wydmanski J, Polanowski P, Tukiendorf A, Maslyk B. Radiation-induced injury of the exocrine pancreas after chemoradiotherapy for gastric cancer. *Radiother Oncol*. 2016 Mar;118(3):535-9. doi: 10.1016/j.radonc.2015.11.033. Epub 2015 Dec 18.
2. Hawrylewicz L, Leszczyński W, Namysł-Kaletka A, Bronclik I, Wydmański J. Protection of organs at risk during neoadjuvant chemoradiotherapy for gastric cancer based on a comparison between conformal and intensity-modulated radiation therapy. *Oncol Lett*. 2016 Jul;12(1):692-698. Epub 2016 May 26.
3. Leszczyńska P, Leszczyński W, Wydmański J, Kinga, Namysł Kaletka A, Tukiendorf A, Hawrylewicz L. Delineation of Margins for the Planning Target Volume (PTV) for Image-Guided Radiotherapy (IGRT) of Gastric Cancer Based on Intrafraction Motion. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2017 Jan 1;18(1):37-41.
4. Dębiec K, Wydmański J, Gorczewska I, Leszczyńska P, Gorczewski K, Leszczyński W, d'Amico A, Kalemba M. 18-Fluorodeoxy-Glucose Positron Emission Tomography- Computed Tomography (18-FDG-PET/CT) for Gross Tumor Volume (GTV) Delineation in Gastric Cancer Radiotherapy *Asian Pac J Cancer Prev*. 2017 Nov 26;18(11):2989-2998.
5. Polanowski P, Wydmański J, Tukiendorf A, Składowski K. The analysis of absorbed dose by pancreas during gastric cancer radiotherapy. *Radiother Oncol*. 2020 Oct;151:20-23. doi: 10.1016/j.radonc.2020.07.009. Epub 2020 Jul 15. PMID: 32679311.

6.15.2. Ocena skuteczności radykalnej radioterapii i radiochemioterapii w leczeniu miejscowo zaawansowanego, pierwotnie nieresekcyjnego raka odbytnicy.

Wykonawcy: M. Kraszkiewicz, W. Majewski, J. Wydmański, A. Napieralska, R. Kulik, B. Maciejewski

Zadania badawcze były i będą w planie przedmiotem publikacji w streszczeniach doniesień zjazdowych w czasopiśmie z IF ASTRO 18 i 19.

Publikacja pełnotekstowa w przygotowaniu.

Obrona przewodu doktorskiego 29.06.20 r. (lek. M Kraszkiewicz): Ocena skuteczności radykalnej radioterapii i radiochemioterapii w leczeniu miejscowo zaawansowanego, pierwotnie nieresekcyjnego raka odbytnicy.

Prezentacja plakatowa ESTRO 2020: Does CEA decrease after radical treatment of unresectable rectal cancer predicts the outcome?: publikacja w doniesieniach zjazdowych w czasopiśmie z IF ESTRO 2020.

6.16. Techniki wielopolowe w radioterapii oraz leczenie promieniami chorych na raka piersi i płuc.

Kierownik: L. Miszczyk

6.16.1. Napromienianie połowy ciała u chorych z mnogimi przerzutami do kości z wykorzystaniem tomoterapii. Ocena wczesnych powikłań i efektu leczenia. Porównanie tomoterapii z metodą konwencjonalną.

Wykonawcy: B. Jochymek, E. Telka, L. Miszczyk, S. Blamek

Napromieniano 83 chorych (61 mężczyzn i 22 kobiety) z mnogimi przerzutami do kości. 21 osób było napromienianych na górną i dolną połowę ciała. W sumie przeprowadzono 104 procedury napromieniania.

W czasie około 2-3 tygodni od rozpoczęcia leczenia zaobserwowano zmniejszenie pobierania niesterydowych leków przeciwzapalnych i silnych leków przeciwbólowych. Średnie zużycie leków przeciwbólowych zmniejszyło się z 3.1 do 2.5 punktów. Średni poziom bólu uległ zmniejszeniu z poziomu 5.4 punktów w dniu leczenia do poziomu 4.2 punktów 2 tygodnie później. Uzyskano zwiększenie jakości życia z poziomu 3.6 do poziomu 4.06. Ogólny stan zdrowia wzrósł z poziomu 3.8 do poziomu 4.1 punktów. U żadnego z chorych nie zaobserwowano nudności. Nieliczni chorzy cierpieli na pierwszego stopnia (nie wymagające leczenia) biegunki. Nie zaobserwowano toksyczności skórnej i powikłań płucnych. Nie obserwowano poważnych toksyczności hematologicznych.

Napromienianie połowy ciała przy pomocy tomoterapii jest skuteczną metodą leczenia chorych z mnogimi przerzutami do kości, zmniejszającą dolegliwości bólowe i zużycie leków antyanalgetycznych. Leczenie to przyczynia się do zwiększenia jakości i komfortu życia. Pojedyncza dawka podana przy pomocy tomoterapii jest prawie całkowicie pozbawiona efektów ubocznych leczenia.

Leczenie to jest czasochłonne. Co jest istotną wadą tej metody. Konturowanie objętości targetowych i narządów krytycznych zajmuje średnio około 3 godziny. Na podstawie wstępnych wyników można wyciągnąć wniosek, że zmniejsza ona skutecznie dolegliwości bólowe podobnie jak metoda 2D, ale pozbawiona jest prawie całkowicie objawów ubocznych.

Biorąc pod uwagę stosunkowo małą liczbę leczonych chorych i czasochłonność procedur przygotowawczych, zadeklarowany czas wykonania programu badawczego jest zbyt krótki.

Dlatego zasadnym jest przesunięcie terminu realizacji programu na rok 2021, celem zwiększenia liczby napromienianych chorych do 100 przypadków, co pozwoliłoby na przeprowadzenie dokładniejszej analizy statystycznej.

Uzyskane wyniki zostaną wykorzystane do publikacji w renomowanym czasopiśmie angielskojęzycznym (z listy filadelfijskiej).

6.17. Podwyższenie biologicznej dawki promieniowania w objętości tarczowej za pomocą radiochirurgii (Radiosurgery BOOST, RSB) u chorych na raka głowy i szyi poddanych definitywnej radio(chemio)terapii.

Kierownik: P. Polanowski

Wykonawcy:

zespół badawczy: dr hab. n. med. Tomasz Rutkowski, dr hab. n. med. Andrzej Wygoda, dr n. med. Bolesław Pilecki, lek. Urszula Dworzecka, lek. Dorota Książniak-Baran, lek. Marek Kentnowski, lek. Adam Brewczyński, dr n. med. Agata Bieleń, lek. Kinga Dębiec, lek. Dominika Leś, lek. Anna Zarudzka

konsultant prof. dr hab. n. med. Krzysztof Składowski

fizycy: dr n. med. Małgorzata Stąpór-Fudzińska, dr n. fiz. Aleksandra Grządziel

biostatystyka Łukasz Boguszewicz

Koordynatorzy: Dalia Wąsik, Agata Tatar

Zgłaszając w/w temat do Planu Naukowego 2020 zakładaliśmy rekrutację ok. 50% chorych (40 pacjentów) z docelowej ilości – 80 chorych. Obecna sytuacja epidemiologiczna znacznie ograniczyła nasze zamierzenia do łącznej liczby 11 chorych, co znacznie utrudnia wnioskowanie dotyczące zaproponowanego przez nas schematu postępowania. Wstępne obserwacje oparte na okresowych wizytach w poradni oraz na badaniach obrazowych dowodzą skuteczności podwyższenia dawki promieniowania w objętości tarczowej. Równie ważnym aspektem jest tolerancja wyższych dawek biologicznych realizowanych za pomocą boostu stereotaktycznego co wymaga jednak znacznie dłuższego raportowania.

6.18. Ocena przydatności badania krążącego DNA wirusa Epstein-Barr (EBV) w populacji polskiej jako czynnika predykcyjnego i prognostycznego u chorych na raka gardła górnego poddanych skojarzonej chemio- i radioterapii.

Kierownik: K. Składowski

Wykonawcy: A. Wygoda, J. Mrochem-Kwarciak, A. Mazurek, K. Składowski, T. Rutkowski, P. Polanowski, A. Heyda, M. Kentnowski, B. Pilecki, U. Dworzecka, A. Bieleń, D. Leś, D. Książniak-Baran, K. Dębiec

W okresie 2017-2020 w I Klinice Radioterapii i Chemioterapii poddano leczeniu radykalnemu 30 chorych na raka gardła górnego w stopniach zaawansowania T1N1M0-T4N3M0.

Zaawansowanie nowotworu wg skali TNM (VIII edycja), określone na podstawie badań obrazowych (MRI, PET-CT), przedstawiono w poniższej tabeli:

	SUMA = 30				EBV(+) = 22				EBV(-) = 8			
	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4
N0	-	1	-	1	-	-	-	-	-	1	-	1
N1	5	2	2	1	3	2	1	1	2	-	1	-
N2	2	5	4	-	2	4	4	-	-	1	-	-
N3	2	1	2	2	2	-	2	1	-	1	-	1

U wszystkich chorych przed rozpoczęciem leczenia określono etiologię raka w oparciu o ocenę obecności krążącego DNA wirusa Epstein Barr (EBV) w surowicy krwi, a w razie jego potwierdzenia, ilościowo

wą ocenę kopii DNA tego wirusa w mililitrze surowicy krwi (rozwój raka na podłożu przebytej infekcji wirusowej EBV - rak EBV(+) vs brak związku z przebytą infekcją - rak EBV(-)).

Ze względu na pośredni lub wysoki stopień zaawansowania raka u wszystkich chorych zastosowano leczenie skojarzone, radykalne: radio- i chemioterapię w różnych sekwencjach, w zależności od stopnia odpowiedzi i tolerancji terapii.

Na podstawie przeprowadzonych badań u 22 chorych (73%) stwierdzono etiologię wirusową raka (EBV(+)). U wszystkich powyższych chorych badanie histopatologiczne określiło zróżnicowanie raka jako niskie lub brak zróżnicowania. Wszyscy ci chorzy (w dniu pierwszego zgłoszenia się do Instytutu Onkologii w Gliwicach) mieli rozpoznaną obecność przerzutowych węzłów chłonnych na szyi (brak cechy N0). Wyjściowa liczebność kopii DNA wirusa EBV mieściła się w zakresie 98 - 66960.

U pozostałych 8 chorych (27%) rozpoznano raka płaskonabłonkowego o wysokim (rak dojrzały) i pośrednim stopniu zróżnicowania oraz nisko zróżnicowanego - u żadnego nie stwierdzono obecności krążącego DNA wirusa EBV przed leczeniem (EBV(-)).

Nie zaobserwowano zależności pomiędzy zaawansowaniem guza pierwotnego wg klasyfikacji TNM a liczebnością kopii wirusa, natomiast u chorych z cechą N3 liczba kopii była istotnie większa niż dla N2 (27163 vs 6091).

W przebiegu dotychczasowej obserwacji u dwóch spośród 22 chorych na raka EBV(+) doszło do niepowodzenia leczenia - u jednego pod postacią wznowy miejscowej i u jednego do rozsiewu uogólnionego. Pozostałych 20 chorych pozostaje w obserwacji po leczeniu, bez cech nawrotu (brak obecności DNA wirusa, radiologicznie potwierdzona całkowita regresja).

Spośród 8 chorych na raka EBV(-), u 2 doszło do niepowodzenia węzłowego (1 niewyleczenie, 1 nawrót), u 2 do rozsiewu uogólnionego, u jednego do niewyleczenia miejscowego.

Dotychczasowe obserwacje wskazują na wysoką skuteczność leczenia ogniska pierwotnego nacieku raka gardła górnego (LC), niezależnie od statusu EBV, natomiast zauważalna jest obniżona skuteczność wyleczalności węzłowej (NC) oraz tendencja do rozsiewu uogólnionego u chorych na raka EBV(-). Badanie ma charakter prospektywny i wymaga dalszego naboru chorych w kolejnych latach, co upoważni do postawienia obiektywnych wniosków i przygotowania publikacji. Obecnie Narodowy Instytut Onkologii w Gliwicach jest jedynym ośrodkiem w Polsce oceniającym status i monitorującym skuteczność leczenia chorych na EBV zależnego raka gardła górnego.

6.19. Ocena wyników leczenia chorych poddanych pooperacyjnej radioterapii z powodu raka stercza.

Kierownik: L. Miszczyk

Wykonawcy: M. Miszczyk, W. Majewski, I. Jabłońska, Ł. Magrowski, O. Masri, K. Rasławski

Projekt doprowadził do zebrania obszernej bazy danych (n=236) dot. chorych leczonych radioterapią ratującą lub adjuwantową po radykalnej prostatektomii. Pełnotekstowy artykuł oceniający czynniki prognostyczne dla czasu do wznowy biochemicznej (BC) oraz czasu wolnego od choroby (DFS), w tym modele regresji, analizę przeżycia i prezentujący propozycję nomogramu, jest obecnie w recenzji w

czasopiśmie ‘Radiology and Oncology’. Ponadto projekt jest kontynuowany pod względem oceny bezpieczeństwa i powikłań leczenia w zależności od parametrów klinicznych oraz danych z systemu planowania radioterapii, czym aktualnie zajmuje się lek. Bartłomiej Goc.

Streszczenie artykułu podsumowującego projekt badawczy:

Wstęp – Biorąc pod uwagę wyniki badań RAVES, RADICALS i GETUG-17, zalecenia dotyczące napromieniania pooperacyjnego u chorych na raka prostaty po leczeniu operacyjnym radykalnie zmieniły się z podejścia leczenia adjuwantowego, na obserwację i leczenie ratunkowe. W związku z obecną krytyką dotyczącą wątpliwej możliwości utrzymania rygoru badania klinicznego w codziennej praktyce, a co za tym idzie uzyskania podobnych wyników, postanowiliśmy przeanalizować własny materiał kliniczny.

Materiał i metodyka – Baza danych zawiera obserwację dotyczące 236 pacjentów leczonych radioterapią adjuwantową (n=113) lub ratunkową (n=123). Mediana wieku w grupie wynosi 63.6 lat, a mediana follow-up 62.3 miesiące.

Wyniki – Analiza regresji COX’a wykazała, że w modelu wielowariantowym statystycznie związane z większym ryzykiem niepowodzenia (DFS) są poziom PSA przed radioterapią, cecha pT3 oraz wznowa miejscowa jako powód leczenia ratunkowego. Ponadto, wartość minimalna PSA w trakcie obserwacji (PSA nadir) jest znamiennej związane z ryzykiem wystąpienia wznowy biochemicznej.

Krzywe przeżycia dotyczące przeżycia wolnego od wznowy biochemicznej (BPFS) oraz wolnego od choroby (DFS) są znamiennej różne w zależności od wskazania do leczenia adjuwantowego lub ratunkowego.

Analiza ‘recursive partitioning’ wskazała na znaczenie wartości PSA przed leczeniem, Gleason Grade Group, nadiru PSA oraz wznowy miejscowej jako wskazania do leczenia.

Ponadto, opracowaliśmy nomogram na podstawie przeprowadzonych analiz, który można również znaleźć pod postacią aplikacji komputerowej (<https://apps.konsta.com.pl/app/prostate-salvage-dfs/>).

6.20. Powtórna radioterapia z powodu wznowy glejaków mózgu z wykorzystaniem technik modulacji intensywności wiązki w aspekcie bezpieczeństwa, tolerancji wczesnej i późnej oraz skuteczności (grant wewnętrzny) .

Kierownik: R. Tarnawski / E. Nowicka

Wykonawcy: E. Nowicka, M. Gawkowska, H. Grzbiela, M. Jarzqb, K. Drosik-Rutowicz, K. Widera, K. Krysiak, S. Jezierska, A. Grządziel, J. Wendykier, B. Bekman, K. Ślosarek, B. Bobek-Billewicz, G. Stasiak-Pres, Ł. Zarudzki, R. Tarnawski

Nawrót miejscowy jest najczęstszym i nieuchronnym niepowodzeniem leczenia z powodu glejaków mózgu. Wyniki leczenia nawrotów są złe. Mimo że około 10 % chorych leczonych z powodu glejaka wielopostaciowego (HGG) przeżywa 5 lat po zastosowaniu skojarzonej radioterapii i chemioterapii z użyciem temozolomidu, to wznowy miejscowe odpowiedzialne są za główną przyczynę zgonów pacjentów. Dotychczas nie opracowano standardów postępowania przy nawrotach. Możliwości leczenia operacyjnego, jako podstawowej metody leczenia miejscowego, są niejednokrotnie ograniczone lokalizacją,

rozległością guza, jak również stanem klinicznym pacjentów. A jak pokazują analizy ostatnich lat, to zysk w przeżyciu całkowitym odnoszą jedynie ci chorzy, u których możliwe było doszczętne usunięcie guza. Samodzielne leczenie systemowe z zastosowaniem temozolomidu czy schematów wielolekowych np. PCV, pozwala na uzyskanie krótkotrwałych odpowiedzi. Nihilizm terapeutyczny powoduje że poszukujemy nowych strategii postępowania. Badania kliniczne z zastosowaniem terapii celowanych wprawdzie wykazały wpływ na przedłużenie czasu wolnego od progresji, ale nie wpływały na czas przeżycia całkowitego i nie są stosowane w codziennej praktyce klinicznej.

Postęp technologiczny radioterapii z możliwością stosowania technik radioterapii stereotaktycznej stworzył szanse na wykorzystanie tej metody w leczeniu nawrotów. Charakterystyka radiobiologiczna tkanki nerwowej oraz sposób odpowiedzi na promieniowanie oraz ryzyko wystąpienia poważnych powikłań ze strony struktur ośrodkowego układu nerwowego w tym martwicy tkanki nerwowej, nerwów czaszkowych zwłaszcza drogi wzrokowej oraz innych narządów zlokalizowanych w obrębie czaszki była przyczyną dużej ostrożności przy podejmowaniu decyzji o powtórny napromienianiu. O ile protokoły radioterapii określają dawki tolerancji dla tkanki nerwowej oraz innych struktur krytycznych dla pierwotnego napromieniania guzów mózgu zarówno we frakcjonowaniu konwencjonalnym i hypofrakcjonowanej radioterapii stereotaktycznej, to niestety nie są znane zakresy dawek tolerancji dla narządów krytycznych w powtórnej radioterapii.

Jest coraz więcej doniesień literaturowych o klinicznym zastosowaniu powtórnej radioterapii w obszarze mózgowia u chorych z nawrotowymi glejakami, w aspekcie skuteczności i przede wszystkim bezpieczeństwa, co daje podstawy zarówno teoretyczne i praktyczne jej wdrażania. Badania te pokazały korzyść w zakresie PFS i OS w zakresie odpowiednio 5-7 miesięcy i 8-10 miesięcy, przy akceptowalnej toksyczności leczenia. Wydaje się, że zastosowanie powtórnej radioterapii samodzielnej, czy to w skojarzeniu z chemioterapią, pozostaje atrakcyjną opcją terapeutyczną, zwłaszcza dla chorych, którzy nie kwalifikują się do leczenia chirurgicznego, są w dobrym stanie klinicznym i z długim czasem przeżycia po pierwotnym leczeniu promieniami, z pierwotną histologią LGG. Wobec wzrastającej liczby pacjentów, u których rozpoznajemy nawrót glejaków, którzy leczeni byli w Instytucie Onkologii w Gliwicach lub kierowani są z innych ośrodków onkologicznych, zasadnym jest przeprowadzenie analizy dotychczasowych doświadczeń własnych oraz dalsze prospektywne badania. Dlatego podjęliśmy własne badania nad oceną możliwości zastosowania powtórnej radioterapii mózgowia z wykorzystaniem nowoczesnych technik planowania i napromieniania, oceny tolerancji wczesnej oraz wystąpienia odczynów późnych u wybranych chorych na nawrotowe glejaki. Zaplanowaliśmy ocenę wpływu parametrów klinicznych oraz patologicznych na efekt leczenia wznów guzów mózgu z zastosowaniem powtórnej konwencjonalnie frakcjonowanej radioterapii z wykorzystaniem technik modulacji intensywności dawki. Monitorowanie efektu i tolerancji powtórnej radioterapii prowadzone w oparciu o parametry kliniczne i wieloparametryczne obrazowanie MRI (ocena stopnia odpowiedzi i częstości wystąpienia martwicy popromiennej), pozwoli zobiektywizować sposób odpowiedzi guzów, częstość wystąpienia martwicy tkanki mózgowej oraz tolerancję zarówno wczesną jak i późną leczenia. Ważnym elementem projektu

jest wypracowanie optymalnych technik planowania powtórnej radioterapii z monitorowaniem bezpieczeństwa dawek na struktury krytyczne. Wykorzystanie nowoczesnych technik wspomagających planowanie radioterapii z oprogramowaniem Velocity (Varian Medical Systems, Palo Alto, CA) umożliwia korelację dawki fizycznej o wartości dawek wcześniej podanych. Velocity jest platformą umożliwiającą deformacyjną fuzję obrazów TK oraz rozkładu dawki z pierwszej i powtórnych radioterapii. Dzięki temu można uzyskać sumaryczny rozkład dawki na najnowszym badaniu obrazowym, z uwzględnieniem zmian anatomicznych. Jest to niezbędny element w prawidłowej interpretacji planów powtórnego leczenia w kontekście ich oceny klinicznej oraz bezpieczeństwa dla narządów zdrowych, ponieważ nie są znane zakresy akceptowanych i dopuszczalnych dawek dla narządów krytycznych w powtórnej radioterapii.

Mamy nadzieję na poszerzenie naszej wiedzy w temacie radiobiologii powtórnego napromieniania tkanki mózgu. Być może pozwoli to na określenie dawek tolerancji dla powtórnego napromieniania oraz przyczyni się do wypracowania wskazań do powtórnego napromieniania guzów mózgu.

Materiał i metody:

Przedmiotem retrospektywnej analizy jest grupa 66 chorych (37 mężczyzn -56% i 29 kobiet- 44%) na glejaki mózgu, którzy zakwalifikowani zostali w III Klinice Radioterapii i Chemioterapii do powtórnej radioterapii z powodu wznowy glejaków mózgu. Byli to pacjenci, których pierwotne leczenie i obserwacje po leczeniu prowadzone były w NIO Gliwice oraz ci kierowani z innych ośrodków onkologicznych w momencie rozpoznania wznowy choroby. Średnia wieku w chwili leczenia pierwotnego wynosiła 38,4 lat (zakres, 17,6-70,0). W tabeli nr 1 przedstawiono charakterystykę kliniczną chorych.

Pierwotne leczenie :

Wszyscy chorzy poddani byli pierwotnemu zabiegowi operacyjnemu. W zależności od rozpoznania histologicznego zakwalifikowani byli do uzupełniającej radioterapii lub leczenia skojarzonego radioterapii i chemioterapii. U 31 (47%) chorych przeprowadzono radioterapię 3D-CRT a u 35 (53%) techniką modulacji intensywności wiązki. Średnia dawka pierwotnej radioterapii wyniosła 57,6 Gy/g (zakres, 50-60 Gy/g). U 17 chorych w leczeniu stosowano chemioterapię: u 16 chorych w oparciu o Temozolomid, u 1 chorego schemat PCV)

Diagnostyka nawrotu:

Nawrót choroby stwierdzono w badaniach MR wykonanych w obrazach T1, T2 zależnych oraz FLAIR, DWI, SWI, PWI, przed i po podaniu kontrastu. Za wznowę miejscową uznano lokalizacje zmian w obszarze uprzednio leczonym lub do 2 cm od pierwotnej lokalizacji guza, a za odległą pojawienie się zmian w innym obszarze. U wszystkich chorych nawrót choroby wystąpił w obszarze poprzednio napromienianym. Leczenie operacyjne nawrotu choroby przeprowadzono u 36 chorych. U 3 chorych wykonano biopsję stereotaktyczną guza.

Rozpoznanie mikroskopowe:

Pierwotne rozpoznania histologiczne pogrupowano jako LGG – glejaki o niskim stopniu złośliwości (I i II stopień) i HGG glejaki złośliwe (III i IV stopień wg WHO). Histologiczne potwierdzenie podtypu

guza przy wznowie możliwe było u 39 chorych (36 operowanych i 3 po biopsji stereotaktycznej). W tabeli 2 przedstawiono szczegółowy podział na podtypy mikroskopowe H-p pierwotne i u chorych z potwierdzonym rozpoznaniem w badaniu H-p przy nawrocie.

6.21. Badanie wpływu implantów metalowych na rodzaj i prawdopodobieństwo indukowanej śmierci komórkowej (grant wewnętrzny).

Kierownik: K. Ślosarek

Wykonawcy: K. Ślosarek, R. Smolarczyk, T. Cichoń, M. Jarosz-Biej, J. Rogoliński

Celem projektu jest zbadanie wpływu metalowej osłony umieszczonej w wiązce promieniowania jonizującego na rodzaj i częstotliwość indukowanej śmierci komórkowej oraz zmianę wielkości dawki w miejscach leżących poza osłoną (za i przed).

Badania prowadzone są w następujących zagadnieniach:

- A. na materiale biologicznym (linie komórkowe);
- B. pomiary dawek „fizycznych” w fantomach (wodnych, stałych);
- C. obliczenia metodą Monte Carlo efektów „biologicznych” i „fizycznych”.

Ad A.: Badania biologiczne

Dotychczas wykonano napromienianie linii komórek w raku płuca A549, glejaku A172, raku gardła FaDu, raku ślinianki A253, oraz ludzkich komórkach prawidłowych: fibroblastach z płuc BEAS-2B. Pomiary wykonano kilkakrotnie (10 pomiarów) poszukując odpowiedzi na pytania:

- jaki rodzaj śmierci komórkowej jest indukowany promieniowaniem jonizującym: czy w komórkach indukowana jest apoptoza, nekroza, autofagia czy starzenie się komórek?;
- jaki jest wpływ zastosowania osłony na skuteczność zabijania badanych komórek?;
- oraz jaki rodzaj śmierci jest indukowany po zastosowaniu osłon?

Ad. B.: Pomiary dawek „fizycznych” w fantomach stałych

Dotychczas zostały wykonane pomiary filmami dozymetrycznymi oraz dawkomierzami termoluminescencyjnymi.

Otrzymane wyniki pomiarów dawkomierzami termoluminescencyjnymi, wskazują również na wzrost dawki pochodzący od promieniowania wstecznie rozproszonego (nad osłoną). Dodatkowo, z tych pomiarów wynika, że jest to promieniowanie o bardzo małej energii. Pomiary wykonane filmami dozymetrycznymi, również wskazują na wzrost dawki przed osłoną i znikomy - pod osłoną.

Ad. C.: Obliczenia metodą Monte Carlo efektów „fizycznych”

Wykonano wstępne obliczenia rozkładu dawki w osi wiązki z uwzględnieniem osłony i konstrukcji głowicy akceleratora TrueBeam VMS dla wiązki X6MV (rysunek). Wskazują one również, że dawka przed osłoną jest większa od dawki w tym samym miejscu bez osłony. Ten efekt jest mniejszy pod osłoną.

Podsumowanie: Wyniki pomiarów efektów biologicznych i fizycznych oraz symulacji wydają się być zgodne. Dawka pochodząca od rozproszenia wstecznego jest znacznie większa niż pod osłoną.

Wymaga, to jednak dalszych pomiarów, które ze względu na sytuację epidemiologiczną zostały bardzo silnie wyhamowane.

Dotychczasowe wyniki były przedstawione w formie plakatowej na kilku konferencjach.

Badanie będzie kontynuowane w 2021 roku.

7.1. Analiza parametrów gospodarki hormonalnej chorych leczonych z powodu raka piersi w kontekście stanu menopauzalnego.

Kierownik: M. Jarzqb

Wykonawcy: M. Mianowska-Malec, M. Kubeczko, A. Łuczak, A. Michalik, A. Pasierbek, J. Mrochem-Kwarciak

Raport w programie 4.10.

7.2. Rekonstrukcja tchawicy szczura z wykorzystaniem acellularnej allogenicznej tchawicy oraz mezenchymalnych komórek zrębu pochodzenia tłuszczowego – badania wstępne.

Kierownik: A. Maciejewski

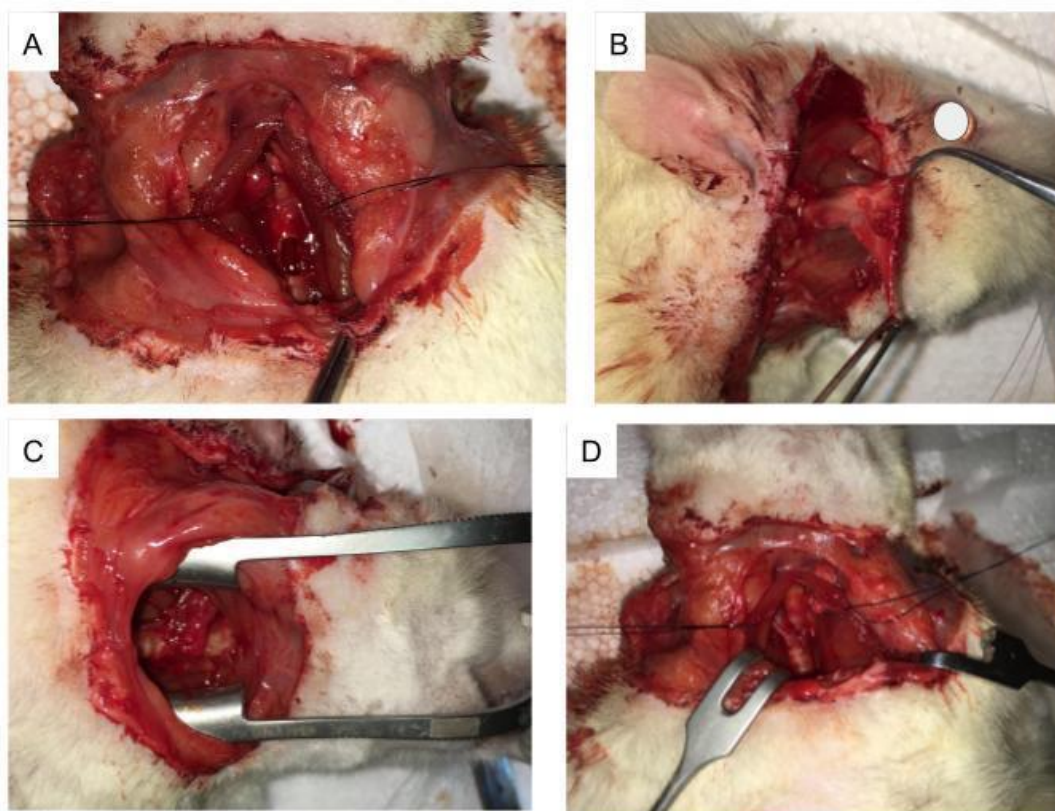
Wykonawcy:

- *lek. Dominik Walczak, lek Daniel Bula, dr hab. n. med. prof. NIO Łukasz Krakowczyk (Klinika Chirurgii Onkologicznej i Rekonstrukcyjnej, NIO oddział w Gliwicach)*
- *lek. Ewa Migacz (wolontariusz, Klinika Otorinolaryngologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny)*
- *prof. dr hab. Stanisław Szala, dr n. med. Tomasz Cichoń, dr n. med. Ryszard Smolarczyk, dr n. med. Magdalena Jarosz-Biej (Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów, NOI oddział w Gliwicach)*
- *dr n. med. Ewa Stobiecka (Zakład Patologii Nowotworów, COI oddział w Gliwicach)*

Do tej pory udało się zrealizować następujące cele projektu:

- Pozyskanie ze zwłok szczurzych tchawic.
- Opracowanie i sprawdzenia na szczurzych zwłokach modelu rekonstrukcyjnego
- Przygotowanie acelularnych tchawic przez RCKiK w Katowicach
- Pozyskanie tkanki tłuszczowej
- Izolacja i namnożenie mezenchymalnych komórek zrębu
- Pokrycie ludzkimi komórkami ADCS acellularnej tchawicy

Pierwszy etap projektu polegał na uzyskaniu tchawic ze zwłok szczurzych. Po znieczuleniu, a następnie uśmierceniu 10 zwierząt usunęliśmy tchawice na długości od krtani do podziału na oskrzela główne. Dodatkowo wykonaliśmy symulacje planowanego zabiegu rekonstrukcyjnego (Rycina 1).



Rycina 1. Symulacja planowanego zabiegu rekonstrukcyjnego. A) wykonane okno w tchawicy B) wy-preparowany płat skroniowy. C, D) Płat przeniesiony i wszyty w ubytek

Pobrane tchawice zostały zamrożone, a następnie przetransportowane do Banku Tkanek RCKiK w Katowicach, gdzie przy użyciu technik radiacyjnych zostały pozbawione elementu komórkowego.

Ponadto od 10 chorych z Kliniki Chirurgii Onkologicznej i Rekonstrukcyjnej podczas planowych zabiegów operacyjnych pozyskaliśmy od 10-20 gram tkanki tłuszczowej. Następnie zostały wyizolowane i namnożone mezenchymalne komórki pochodzenia tłuszczowego (ADSC). W dalszym etapie pokryliśmy komórkami ADSC acelularne fragmenty tchawicy pozyskane z Banku Tkanek RCKiK.

Obecnie projekt wciąż znajduje się w trakcie realizacji

W związku z epidemią wirusa SARS-CoV-2 a także zaplanowanym remontem zwierzętarni nie byliśmy w stanie zrealizować ostatniego etapu projektu, a więc implantacji allogenicznych tchawicy na modelu szczura.

Przeprowadzone badanie ma charakter pilotażowy i jego wyniki będą podstawą ubiegania się o grant. Dodatkowo uzyskane wyniki planujemy opublikować.