

AUTOREFERAT

dr n. med. Adam Maciejczyk
Kierownik Zakładu Teleradioterapii
Dolnośląskiego Centrum Onkologii
we Wrocławiu

ŻYCIORYS I PRZEBIEG PRACY ZAWODOWEJ

Urodziłem się 1 sierpnia 1970 roku w Wodzisławiu Śląskim. W latach 1989-1995 studiowałem na Wydziale Lekarskim w Zabrze Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach. W trakcie studiów aktywnie uczestniczyłem w działalności Studenckiego Koła Naukowego przy Pediatrycznej Klinice Diennej Diagnostyki i Terapii Śląskiej Akademii Medycznej w Katowicach. W ramach działalności Koła zajmowaliśmy się problemami opieki ambulatoryjnej dzieci przewlekle chorych. W 1994 roku, na studenckiej konferencji naukowej w Łodzi, wygłosiłem pracę na temat częstości występowania infekcji bakterią *Helicobacter pylori* u dzieci z przewlekłym zapaleniem przewodu pokarmowego. W latach 1995-1996 odbyłem staż podyplomowy w Państwowym Szpitalu Klinicznym nr 1 w Zabrze.

Od 1.09.1996 roku jestem pracownikiem Dolnośląskiego Centrum Onkologii we Wrocławiu. W dniu 05.05.1999 roku uzyskałem I stopień specjalizacji z zakresu radioterapii onkologicznej, a w dniu 25.11.2003 roku II stopień specjalizacji z zakresu radioterapii onkologicznej.

W marcu 2002 roku obroniłem na Wydziale Lekarskim Kształcenia Podyplomowego tytuł doktora nauk medycznych na podstawie rozprawy doktorskiej pod tytułem „Badanie porównawcze enzymów antyoksydacyjnych w komórkach płuca zdrowego, nowotworowych oraz uzyskanych z nich hodowlach komórkowych”, której promotorem był Prof. dr hab. Jerzy Kołodziej.

W trakcie realizowania staży specjalizacyjnych, jak również po uzyskaniu tytułu specjalisty uczestniczyłem w kilkudziesięciu krajowych i międzynarodowych szkoleniach z zakresu onkologii i radioterapii onkologicznej, zorganizowanych przez PTRO (Polskie Towarzystwo Radioterapii Onkologicznej) i ESTRO (European Society for Radiotherapy and Oncology). Najważniejsze z nich to:

- „Evidence-based radiation oncology” w Izmirze w Turcji,
- „Physics for clinical radiotherapy” w Leuven w Belgii,
- „IMRT and other conformal techniques in practice” w Amsterdamie,
- „Multidisciplinary management of head and neck” w Wiedniu,
- „Pediatric radiation oncology” w Brukseli.

Od 2004 roku regularnie uczestniczę w międzynarodowych i krajowych konferencjach i kongresach (ESTRO, ASTRO, ASCO, PTRO, PTO, PTOK).

Ponadto, odbyłem pięć szkoleń indywidualnych w czołowych klinikach onkologicznych w kraju i za granicą:

- W 2002 roku uczestniczyłem w indywidualnym szkoleniu z zakresu terapii skojarzonej raka płuca w kierowanej przez prof. Macieja Krzakowskiego Klinice Nowotworów Płuca i Klatki Piersiowej, w Centrum Onkologii-Instytucie im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie
- W 2003 roku odbyłem indywidualne szkolenie z zakresu radioterapii onkologicznej nowotworów głowy i szyi w kierowanej przez prof. Krzysztofa Składowskiego I Klinice Radioterapii Centrum Onkologii – Instytutu w Gliwicach.
- W 2003 roku odbyłem staż indywidualny z zakresu radioterapii onkologicznej w kierowanej przez prof. Jeana Bourhis, powszechnie znanej Klinice Radioterapii Institute Gustave-Roussy (IGR) w Paryżu (Villejuif). W trakcie pobytu w Instytucie szczególną uwagę poświęciłem zagadnieniom leczenia skojarzonego raka płuca oraz nowoczesnym technikom napromieniania dzieci. Zapoznałem się również z technikami radioterapii protonowej w Instytucie Curie w Paryżu.
- W 2006 roku odbyłem staż indywidualny z zakresu radioterapii onkologicznej w wysoko cenionej Klinice Radioterapii w MD Anderson Cancer Centre w Stanach Zjednoczonych w Houston kierowanej przez prof. Kiana Anga. Prof. Ang jest jednym z najwybitniejszych naukowców i onkologów na świecie w zakresie terapii nowotworów regionu głowy i szyi. Podczas stażu zapoznałem się z nowoczesną organizacją wzorcowej jednostki onkologicznej oraz z najbardziej skutecznymi technikami leczenia nowotworów. Miałem okazję zetknąć się i nawiązać kontakt z czołowymi specjalistami z zakresu onkologii (Prof. James Cox, Prof Adam Garden, Prof. David Rosenthal) i nauk podstawowy (Prof. Waldemar Priebe).
- W 2011 roku brałem udział w indywidualnym szkoleniu z zakresu nowoczesnych technik radioterapii w Klinice Radioterapii w VU University w Amsterdamie, kierowanej przez prof. Bena Slotmana.

W 2004 roku zostałem mianowany zastępcą kierownika, a **od 2009 roku pełnię funkcję kierownika Zakładu Teleradioterapii Dolnośląskiego Centrum Onkologii we Wrocławiu.**

Od 2011 roku jestem członkiem zarządu Dolnośląskiego Koła Polskiego Towarzystwa Onkologicznego, a od października 2012 roku również członkiem Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Radioterapii Onkologicznej. Ponadto jestem członkiem ESTRO (European Society for Radiotherapy and Oncology) oraz ASTRO (American Society for Radiation Oncology). Od czasu uzyskania specjalizacji konsultuję oddziały szpitalne we Wrocławiu, w których leczeni są pacjenci z nowotworami płuc, regionu głowy i szyi oraz dzieci ze schorzeniami onkologicznymi (Dolnośląskie Centrum Chorób Płuc, Wrocławski Ośrodek Torakochirurgii, Katedrę i Klinikę Chirurgii Klatki Piersiowej, Katedrę i Klinikę Pulmonologii i Nowotworów Płuc, Katedrę i Klinikę Otolaryngologii, Chirurgii Głowy i Szyi, Katedrę i Klinikę Transplantacji Szpiku, Onkologii i Hematologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu).

DZIAŁALNOŚĆ DYDAKTYCZNA I ORGANIZACYJNA

Jako kierownik odpowiadam za właściwą organizację pracy Zakładu Teleradioterapii we Wrocławiu wyposażonego w 6 akceleratorów oraz uczestniczę w pracach przygotowujących otwarcie w tym roku filii Zakładu Radioterapii DCO w Legnicy. Organizuję i prowadzę, wraz z zespołem, leczenie ambulatoryjne i stacjonarne napromienianiem około 2000 pacjentów rocznie. Wymaga to wiedzy i doświadczenia z zakresu całej onkologii oraz dodatkowo znajomości najnowszych technik napromieniania. Jest to szczególnie ważne w ostatnich latach, w których odnotowano znaczny postęp technologiczny w zakresie radioterapii.

Za najważniejsze osiągnięcie w zakresie działalności klinicznej zespołu, którym kieruję uważam:

- Wdrożenie po raz pierwszy na Dolnym Śląsku procedury leczenia TBI (Total Body Irradiation), czyli napromieniania całego ciała przed przeszczepem szpiku u dzieci – 2008 rok (współpraca z Katedrą i Kliniką Onkologii i Hematologii Dziecięcej UM we Wrocławiu)

- Wdrożenie po raz pierwszy na Dolnym Śląsku procedury leczenia TBI czyli napromieniania całego ciała przed przeszczepem szpiku u dorosłych – 2009 rok (współpraca z Katedrą i Kliniką Onkologii i Hematologii UM we Wrocławiu)
- Wdrożenie po raz pierwszy na Dolnym Śląsku procedury radioterapii stereotaktycznej i radiochirurgii zmian w obrębie OUN – 2009 rok (współpraca z Katedrą i Kliniką Neurochirurgii UM we Wrocławiu)
- Wdrożenie po raz pierwszy na Dolnym Śląsku procedury radioterapii stereotaktycznej zmian w okolicy tułowia – 2010 rok
- Wdrożenie po raz pierwszy na Dolnym Śląsku procedury radioterapii sterowanej obrazem (IGRT) – 2010 rok
- Wdrożenie po raz pierwszy na Dolnym Śląsku procedury radioterapii techniką VMAT (Volumetric Modulated Arc Therapy), czyli połączenia techniki IMRT i radioterapii łukowej – 2011 rok
- Wdrożenie po raz pierwszy w Polsce procedury radioterapii stereotaktycznej techniką VMAT zmian w obrębie płuc, terapii która w najwyższej rozwiniętych krajach Europy Zachodniej i w USA przyczyniła się do znacznej poprawy wyników leczenia tej grupy chorych – 2011 rok (współpraca z Kliniką Radioterapii VU University w Amsterdamie)
- Wdrożenie po raz pierwszy na Dolnym Śląsku procedury radioterapii bramkowanej u pacjentów z rakiem płuca i piersi – 2012 rok
- Wdrożenie po raz pierwszy na Dolnym Śląsku procedury leczenia TBI, czyli napromieniania całego ciała przed przeszczepem szpiku u dzieci, które wymagają znieczulenia (z reguły dzieci poniżej 5 roku życia) – 2013 rok (współpraca z Katedrą i Kliniki Onkologii i Hematologii Dziecięcej UM we Wrocławiu)

Od wielu lat szeroko propaguję (liczne wykłady, prelekcje, wywiady) zastosowania nowych technik napromieniania w terapii nowotworów. Dotąd techniki te, mimo bardzo dobrej skuteczności, nie były dostępne na Dolnym Śląsku a jedynie w niektórych ośrodkach onkologicznych w Polsce.

Od 2002 roku współpracuję z Katedrą i Kliniką Hematologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu jako konsultant z zakresu radioterapii. Od 2004 roku pełnię funkcję referencyjnego radioterapeuty w Polsce w zakresie leczenia mięsaków tkanek miękkich u dzieci w ramach obowiązujących protokołów międzynarodowych CWS. Udział w

takiej grupie w sposób bardzo istotny poprawia jakość leczenia tej grupy chorych. Współpraca ta umożliwia dzieciom bezpośredni dostęp do konsultacji i terapii stosowanej przez europejskich specjalistów z zakresu leczenia mięsaków tkanek miękkich (Prof. Ewa Kościelniak, Prof. Thomas Klingebiel, Prof. Ivo Leuschner, Prof. Bernhard Schmidt, Prof. Andreas Schuck, Prof. Bernarda Kazanowska, Prof. Jan Godziński – czołowe postacie międzynarodowej grupy CWS - Cooperative Weichteilsarkom Studie).

Od 2009 roku jestem konsultantem z zakresu radioterapii w Dolnośląskim Centrum Chorób Płuc we Wrocławiu. Dzięki tej działalności rozwijamy wspólnie z zespołem DCChP współpracę w zakresie wdrażania leczenia skojarzonego nowotworów płuc.

Od 2002 roku uczestniczę jako wykładowca w szkoleniach specjalistów z zakresu onkologii i hematologii dziecięcej, laryngologii, chirurgii szczękowej, pulmonologii, torakochirurgii, radioterapii onkologicznej, onkologii klinicznej i chirurgii onkologicznej (współpraca z Katedrą i Kliniką Onkologii i Hematologii Dziecięcej UM we Wrocławiu, Katedrą i Kliniką Chirurgii Klatki Piersiowej UM we Wrocławiu, Katedrą i Kliniką Laryngologii UM we Wrocławiu, Katedrą i Kliniką Chirurgii Szczękowej UM we Wrocławiu, Katedrą i Kliniką Pulmonologii UM we Wrocławiu).

W 2010 roku zorganizowałem, po raz pierwszy w Polsce, kurs ogólnopolski na temat Radioterapii nowotworów okresu dziecięcego, którego jestem kierownikiem naukowym. Ta inicjatywa jest nadal kontynuowana. Jest on wpisany na listę kursów CMKP dedykowanych dla lekarzy specjalizujących się w radioterapii onkologicznej, odbywa się 2 razy w roku i cieszy się dużym zainteresowaniem lekarzy z innych ośrodków onkologicznych w Polsce.

Od 2010 jestem stałym wykładowcą ogólnopolskiej konferencji „Po ASTRO”, na której referuję aktualne postępy z zakresu leczenia raka płuca.

Byłem zaproszonym wykładowcą m.in. na posiedzeniach Oddziałów Regionalnych Polskiego Towarzystwa Onkologii Klinicznej, Polskiego Towarzystwa Radioterapii Onkologicznej, Polskiego Towarzystwa Chorób Płuc, Towarzystwa Chirurgów Polskich, Polskiego Towarzystwa Medycyny Nuklearnej, Polskiego Towarzystwa Urologicznego oraz Polskiego Towarzystwa Otolaryngologii, Studenckiego Towarzystwa Onkologicznego.

W latach 2003-2009 byłem sekretarzem Rady Naukowej Dolnośląskiego Centrum Onkologii we Wrocławiu, która miała za celu stymulowanie działalności naukowej DCO. W 2012 roku brałem udział w przygotowaniu od strony organizacyjnej i naukowej programu Kongresu Onkologicznego we Wrocławiu. Uczestniczyłem m. in. w akcji Urzędu Marszałkowskiego „Prostata na lata”.

W 2010 roku ukazała się książka pod red. Prof. Jerzego Kołodzieja i Dr Marka Marciniaka, tytuł publikacji „Rak płuca”, wydawnictwo Termedia, do której napisałem dwa rozdziały opisujące współczesne metody leczenia radioterapią nowotworów płuca.

Za zasługi na rzecz rozwoju onkologii zostałem wyróżniony przez Prezydenta RP odznaczeniami:

- Brązowy Krzyż Zasługi – data nadania 28.09.2006 (nr leg. 125-2006-72)
- Srebrny Krzyż Zasługi – data nadania 23.08.2012 (nr leg. 403-2012-25)

OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE

Jednotematyczny cykl publikacji pt.

NOWE CZYNNIKI PROGNOSTYCZNE I PREDYKCYJNE W RAKACH GRUCZOŁU PIERSIOWEGO

Publikacje wchodzące w skład cyklu:

1. Adam Maciejczyk, Jolanta Szelachowska, Bartłomiej Szynglarewicz, Rafał Szulc, Agata Szulc, Teresa Wysocka, Ewa Jagoda, Hermann Lage, Paweł Surowiak.: CD46 expression is an unfavorable prognostic factor in breast cancer cases

Appl.Immunohistochem.Mol.Morphol. 2011 Vol.19 no.6; s.540-546

IF: 1.630

Pkt. MNiSW/KBN: 27.000

Maciejczyk A.: Udział procentowy: 50%; projektowanie koncepcji badania, zbieranie danych klinicznych, analiza wyników, przygotowanie manuskryptu, przygotowanie i analiza piśmiennictwa.

2. Adam Maciejczyk, Jolanta Szelachowska, Marcin Ekiert, Rafał Matkowski, Agnieszka Hałoń, Hermann Lage, Paweł Surowiak.: Elevated nuclear YB1 expression is associated with poor survival of patients with early breast cancer

Anticancer Res. 2012 Vol.32 no.8; s.3177-3184

IF 2011: 1.725

Pkt. MNiSW/KBN: 20.000

Maciejczyk A.: Udział procentowy: 50%; projektowanie koncepcji badania, analiza statystyczna wyników, przygotowanie manuskryptu, przygotowanie i analiza piśmiennictwa.

3. Adam Maciejczyk, Jolanta Szelachowska, Marcin Ekiert, Rafał Matkowski, Agnieszka Hałoń, Paweł Surowiak.: Analiza ekspresji BCRP u pacjentek z rakiem piersi

Ginekol.Pol. 2012 Vol.83 nr 9; s.681-687

IF 2011: 0.411

Pkt. MNiSW/KBN: 15.000

Maciejczyk A.: Udział procentowy: 60%; projektowanie koncepcji badania, zbieranie danych klinicznych, analiza statystyczna wyników, przygotowanie manuskryptu, przygotowanie i analiza piśmiennictwa.

4. Adam Maciejczyk, Ewa Jagoda, Teresa Wysocka, Rafał Matkowski, Balazs Gyorffy, Hermann Lage, Paweł Surowiak.: ABCC2 (MRP2, cMOAT) localized in the nuclear envelope of breast carcinoma cells correlates with poor clinical outcome

Pathol.Oncol.Res. 2012 Vol.18 no.2; s.331-342

IF 2011: 1.366

Pkt. MNiSW/KBN: 20.000

Maciejczyk A.: Udział procentowy: 40%; projektowanie koncepcji badania, zbieranie danych klinicznych, analiza wyników, przygotowanie manuskryptu, przygotowanie i analiza piśmiennictwa.

5. Adam Maciejczyk, Aleksandra Łacko, Marcin Ekiert, Ewa Jagoda, Teresa Wysocka, Rafał Matkowski, Agnieszka Hałoń, Balazs Györffy, Hermann Lage, Paweł Surowiak.: Elevated nuclear S100P expression is associated with poor survival in early breast cancer patients
Histol.Histopathol. 2013 Vol.28 no.4; s.513-524

IF 2011: 2.480

Pkt. MNiSW/KBN: 25.000

Maciejczyk A.: Udział procentowy: 40%; projektowanie koncepcji badania, zbieranie danych klinicznych, analiza wyników, przygotowanie manuskryptu, przygotowanie i analiza piśmiennictwa.

6. Adam Maciejczyk, Jolanta Szelachowska, Bogdan Czapiga, Rafał Matkowski, Agnieszka Hałoń, Balazs Györffy, Paweł Surowiak.: Elevated BUBR1 expression is associated with poor survival in early breast cancer patients: 15-year follow-up analysis
J.Histochem.Cytochem. 2013 Vol.61 no.5; s.330-339

IF 2011: 2.725

IF 2011: 2.725

Pkt. MNiSW/KBN: 20.000

Maciejczyk A.: Udział procentowy: 60%; projektowanie koncepcji badania, zbieranie danych klinicznych, analiza wyników, przygotowanie manuskryptu, przygotowanie i analiza piśmiennictwa.

7. Adam Maciejczyk.: New prognostic factors in breast cancer

Adv.Clin.Exp.Med. 2013 Vol.22 no.1; s.5-15

IF 2011: 0.176

Pkt. MNiSW/KBN: 15.000

Maciejczyk A.: Udział procentowy: 100%; projektowanie koncepcji publikacji, przygotowanie manuskryptu, przygotowanie i analiza piśmiennictwa.

Suma punktów cyklu publikacji stanowiącego osiągnięcie naukowe: 142,0

Impact factor cyklu publikacji stanowiącego osiągnięcie naukowe: 10,513

Omówienie celu naukowego cyklu publikacji i osiągniętych wyników.

WSTĘP

W Polsce od wielu lat wzrasta zachorowalność na raka piersi. Obecnie jest on najczęściej występującym nowotworem złośliwym u kobiet. Nie obserwuje się natomiast wzrostu śmiertelności spowodowanej tą chorobą. Osiągnięty postęp w wynikach jego leczenia wynika głównie z rozpowszechnienia badań mammograficznych, a co się z tym wiąże, ze wzrastającej liczby chorych leczonych we wczesnym stopniu zaawansowania choroby oraz z zastosowania dobrze zaprojektowanej i coraz skuteczniejszej terapii. Znacznie gorsze wyniki leczenia osiągane są wciąż u pacjentek w wyższych stopniach zaawansowania choroby. Opiswane są również grupy chorych, u których pomimo wczesnego rozpoczęcia leczenia, efekty terapii są niezadowalające. Obserwacje te uzasadniają wciąż aktualną potrzebę

poszukiwania nowych parametrów, lepiej opisujących typ biologiczny i stan kliniczny pacjentek, a w efekcie prowadzących do bardziej skutecznej terapii.

Od wielu lat wiek pacjentek, stan pachowych węzłów chłonnych, wielkość i cechy histologiczne (zwłaszcza histologiczny stopień złośliwości, inwazja naczyń limfatycznych, indeks proliferacyjny Ki67) guza, stan receptorów hormonalnych oraz HER2 są głównymi czynnikami prognostycznymi stosowanymi w praktyce codziennej do stratyfikacji pacjentek z rakiem piersi. Dane te są przydatne do oceny rokowniczej poszczególnych grup pacjentek, jednak ich rola w określaniu indywidualnego poziomu ryzyka niepowodzenia leczenia u chorego oraz w doborze dedykowanego sposobu leczenia uzupełniającego jest niestety ograniczona. Ocena wszystkich wymienionych czynników jednocześnie ma większe znaczenie kliniczne niż analizowanie każdego z nich osobno. Stały się one podstawą schematów podziału pacjentów na różne kategorie ryzyka, takich jak kryteria z Saint Gallen, konsensus NIH, indeks prognostyczny z Nottingham czy też bazę decyzyjną w zakresie leczenia uzupełniającego – Adjuvant Online (www.adjuvantonline.com).

Postęp w poszukiwaniach nowych czynników prognostycznych umożliwiło zastosowanie mikromacierzy DNA. Analiza profilu ekspresji genów na platformach macierzowych doprowadziła do wyodrębnienia pięciu molekularnych podtypów raka piersi. Ocena podtypu raka piersi niesie za sobą nie tylko wartość prognostyczną, ale również stanowi wskazówkę w zakresie doboru leków systemowych, które w danej grupie pacjentów przyniosą najlepszy efekt kliniczny. W 2011 roku grupa ekspertów z St. Gallen wskazała, że obecnie do właściwego zaszeregowania pacjentek do poszczególnej grupy, wystarczy określić parametry dostępne w klasycznym badaniu histopatologicznym wzbogaconym o dodatkowe badania immunohistochemiczne, tj.: określenie typu histologicznego raka piersi, stanu receptorów steroidowych i receptora HER2 oraz indeksu proliferacyjnego Ki67 (MiB1). W zależności od wyników wspomnianych badań morfologicznych podzielono wszystkie naciekające raki piersi na 5 zasadniczych grup, tj. na raki: luminalne A, luminalne B (HER2-ujemne), luminalne B (HER2-dodatnie), HER2-dodatnie (nieluminalne) oraz trójujemne (nieluminalne) czyli raki typu podstawnego.

Wysokie koszty badań mikromacierzowych oraz trudności w interpretacji dużej ilości uzyskiwanych informacji, uniemożliwiły dotąd szersze zastosowanie mikromacierzy w praktyce. Próbą rozwiązania tego problemu jest analiza odpowiednio dobranego panelu genów. Najczęściej opisywane są dwa wielogenowe testy rokownicze: Oncotype DX oraz MammaPrint. Do chwili obecnej jedynie Oncotype DX został uznany przez większość (84%) ekspertów (panelu orzekającego na konferencji w St. Gallen w 2011 roku) za test, który w

sposób wiarygodny może pomóc w kwalifikacji chorych do leczenia systemowego, określając prawdopodobieństwo wystąpienia wznowy raka piersi u pacjentek bez przerzutów z dodatnim stanem receptora ER. W teście Oncotype DX oceniany jest panel 21 genów komórek rakowych. Następnie określane jest prawdopodobieństwo wystąpienia w ciągu 10 lat od pierwotnego rozpoznania wznowy (recurrence score). Użyteczność testu podkreśla fakt, że oceny dokonuje się w tkance pobranej dla rutynowej oceny histopatologicznej, utrwalonej i zatopionej w parafinie. Kolejny test - MammaPrint jest również testem wielogenowym, ale jego zadaniem jest ocena ryzyka wystąpienia przerzutów. W 2007 r. amerykańska agencja *Food and Drug Administration* (FDA) zaaprobowała ten test do stosowania, ale jedynie u pacjentek poniżej 61 roku życia z rakiem piersi do 5 cm średnicy, bez przerzutów do węzłów chłonnych. Znacznym utrudnieniem w powszechnym stosowaniu tego testu jest fakt, że do oceny potrzebna jest świeża (nieutrwalona) tkanka. Materiał ten jest pobierany w trakcie zabiegu operacyjnego, za pomocą odpowiednio przygotowanego zestawu i przesyłany do oceny w laboratoriach macierzystych producenta, co znacznie obniża jego użyteczność. Eksperti konferencji St. Gallen, Amerykańskiego Towarzystwa Onkologii Klinicznej (ASCO, *American Society of Clinical Oncology*) oraz amerykańskiej sieci onkologicznej (NCCN, *National Comprehensive Cancer Network*) dopuszczają możliwość stosowania profili molekularnych w określeniu ryzyka nawrotu u chorych z niejednoznacznymi wskazaniami do uzupełniającej chemioterapii. Zaleca się jednak wciąż, aby wyniki tych testów interpretować ostrożnie i z uwzględnieniem tradycyjnych czynników kliniczno-patomorfologicznych. Mimo, iż omawiane testy wnoszą istotnie większą wiedzę na temat pacjentów z rakiem piersi, ciągle jednak mają one ograniczone zastosowanie.

Dobór odpowiedniej pod względem prognostycznym i predykcyjnym grupy genów jest jednym z większych wyzwań. Jednym z ciekawszych rozwiązań, które pomaga w doborze panelu badanych markerów jest narzędzie online - „*The Kaplan–Meier plotter*” (*KM plotter*), które jest stale poszerzaną bazą danych o ekspresji ponad 22000 (aktualnie 22277) genów opisanych w grupie 1809 pacjentów. W oprogramowaniu wykorzystano informacje uzyskane z bazy danych Gene Expression Omnibus (GEO- www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/), w której poziom ekspresji poszczególnych genów oznaczono za pomocą mikromacierzy Affymetrix HGU133A i HG-U133 Plus 2.0. W celu analizy wartości prognostycznej poszczególnych genów dane uzupełniono o informacje kliniczne w zakresie długości czasu przeżycia wolnego od nawrotu choroby, całkowity czas przeżycia i czasu przeżycia bez nawrotu. Korzystając z bazy, można wyniki zobrazować za pomocą krzywych przeżycia. Baza danych jest powszechnie dostępna pod adresem internetowym www.kmplot.com.

Narzędzie to jest bardzo cenne dla wstępnej analizy planowanych do użycia biomarkerów. Najważniejszą cechą tego oprogramowania jest fakt, że informacje gromadzone w bazie są na bieżąco uzupełniane, dając szansę większej dokładności w przewidywaniu wartości prognostycznej różnych markerów, jak i w zindywidualizowanej ocenie pacjentów.

Oprócz badań pangenomicznych, obecnie prowadzone są również intensywne badania mające na celu dokładne scharakteryzowanie różnych aspektów biologii komórek raka piersi. Szczególnie dużą uwagę zwraca się na następujące aspekty:

- oporność nowotworów na cytostatyki, przede wszystkim na znaczenie i regulację ekspresji genów związanych ze zjawiskiem wielolekowej oporności na cytostatyki (MDR – Multidrug Resistance),
- oporność komórek nowotworowych na inne formy leczenia – terapię hormonalną i radioterapię,
- interakcje pomiędzy komórkami nowotworowymi a otoczeniem. Pod tym kątem badane są głównie zależności pomiędzy komórkami nowotworowymi a układem odpornościowym oraz wpływ tkanki łącznotkankowej (głównie miofibroblastów) na biologię guza,
- dokładniejsza charakterystyka białek związanych z regulacją cyklu komórkowego i apoptozy,
- zdolność komórek nowotworowych do inwazji otoczenia oraz do tworzenia odległych przerzutów. Jest to bardzo szerokie zagadnienie obejmujące aspekty polarności komórek, adhezji, zdolności migracji, syntezy enzymów degradujących białka macierzy zewnątrzkomórkowej oraz angiogenezy i limfangiogenezy.

Nowe markery mogą stać się potencjalnym celem również w badaniach nad innowacyjnymi preparatami terapeutycznymi oraz nad opracowywaniem nowych testów diagnostycznych, umożliwiających indywidualizację terapii pacjentów.

CEL PRACY

Celem prac stanowiących przedstawiony cykl publikacji jest ocena wartości grupy wybranych nowych potencjalnych markerów prognostycznych raka piersi.

ANALIZA WYNIKÓW

W pierwszej części pracy zbadano grupę białek związanych ze zjawiskiem wielolekowej oporności na cytostatyki. Pierwszym białkiem opisanym jako odpowiedzialne za powstawanie oporności wielolekowej komórek nowotworowych na cytostatyki jest P-glikoproteina (P-gp, MDR1). W tkankach nowotworów dochodzi do wzrostu ekspresji P-glikoproteiny, co powoduje usuwanie cytostatyków takich jak: dokсорubicyna, daunorubicyna, vinkrystyna, vinblastyna, aktynomycyna-D, paklitaksel czy etopozyd z wnętrza komórek nowotworowych. Mechanizm ten uniemożliwia osiągnięcie stężeń terapeutycznych leków w komórce nowotworowej. Obecnie wiadomo, że P-gp jest przedstawicielem dużej grupy białek transportujących, zwanych ABC-transporterami (*adenosine triphosphate binding cassette (ABC)-transporters*), w skład której wchodzi również białka z rodziny MRP (*MDR-related proteins*) oraz BCRP (*breast cancer resistance protein*).

MRP2

Białko MRP2 (multidrug resistance protein 2), inna nazwa ABCC2, jest jednym z najważniejszych białek rodziny MRP, należącej do ABC transporterów. W warunkach fizjologicznych jego funkcja polega na transportowaniu jonów organicznych do wielu typów tkanek. Wykazano, że ekspresja MRP2 w komórkach nowotworowych związana jest z nasileniem oporności na oddziaływanie metotreksatu, etopozydu, winkrystyny, winblastyny, cisplatyny, dokсорubicyny i epirubicyny. Udowodniono, że w przypadku raków jajnika MRP2 może występować zarówno w błonie komórkowej, jak i w otoczce jądrowej komórek nowotworowych. Wykazano, że ekspresja jądrowa tego białka wiąże się z większą opornością na cytostatyki. Dalsze badania wykazały również, że ekspresja jądrowa MRP2 jest charakterystyczna dla komórek macierzystych różnych tkanek i prawdopodobnie również komórek macierzystych nowotworów. Dotychczas nie badano znaczenia subkomórkowej lokalizacji MRP2 w rakach piersi.

W pracy dotyczącej znaczenia białka MRP2 (Pathol.Oncol.Res. 2012) zostały ocenione zależności pomiędzy nasileniem ekspresji omawianego białka, a danymi klinicznymi i patologicznymi pacjentek. W pracy tej zbadano za pomocą badań immunocytochemicznych występowanie MRP2 w materiale pochodzącym od 70 pacjentek leczonych w Dolnośląskim Centrum Onkologii w latach 1999-2002. Zbadano także prognostyczną wartość ekspresji mRNA MRP2 przy użyciu plotera KM – internetowej bazy danych zawierającej ocenę wpływu 22.277 genów na przeżycie 1809 pacjentek z rakiem piersi. W badaniach uczestniczył twórca plotera KM – dr Balazs Györffy z Uniwersytetu

Semmelweisa w Budapeszcie oraz odkrywca jądrowej ekspresji MRP2 – dr hab. Paweł Surowiak, prof. nadzw. z Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu.

Przeprowadzone badania immunohistochemiczne wykazały, że ekspresja MRP2 w otoczce jądrowej jest charakterystyczna dla przypadków o krótszym całkowitym czasie przeżycia. Analiza za pomocą plotera KM potwierdziła niekorzystną wartość prognostyczną oceny mRNA MRP2. Podwyższona ekspresja białka była specyficzna dla pacjentek o krótszym czasie przeżycia wolnego od nawrotu, ale tylko w grupie chorych z ujemnymi receptorami estrogenowymi. Rozbieżności pomiędzy wynikami badań na poziomie białka i na poziomie mRNA, wynikają najprawdopodobniej z faktu, że ocena ekspresji mRNA nie uwzględnia późniejszej subkomórkowej lokalizacji białka, co w przypadku MRP2 może dawać istotne różnice. Przeprowadzone przez nas badanie udowodniło, że analiza immunohistochemiczna jest bardzo dobrą metodą oceny ekspresji MRP2, która dodatkowo pozwala wykazać zależności od subkomórkowej lokalizacji białka (jądrowej lub cytoplazmatycznej). Ekspresja MRP2 w komórkowej otoczce jądra jest typowa dla niskozróżnicowanych komórek, natomiast obecność ekspresji w błonie cytoplazmatycznej jest charakterystyczna dla komórek wyżej zróżnicowanych. Zlokalizowane w otoczce jądra MRP2 zmniejsza wrażliwość na chemioterapię komórek macierzystych, które stanowią główny cel leczenia uzupełniającego, co w efekcie prowadzi do progresji zarówno miejscowej, jak i uogólnionej choroby. W naszej pracy stwierdziliśmy, że przypadki wykazujące jądrową ekspresję MRP2 cechowały się bardziej agresywnym przebiegiem klinicznym, prawdopodobnie wynikającym nie tylko z niższego zróżnicowania komórek, ale również ze zwiększonej oporności na niektóre leki cytostatyczne. Taka obserwacja potwierdza hipotezę o zależności lokalizacji MRP2 od stopnia zróżnicowania i polarności komórek nowotworowych. W przypadkach wykazujących ekspresję MRP2 w błonie komórkowej, będzie ono odgrywało rolę głównie w zjawisku oporności na terapię. Analiza immunohistochemiczna aktywności MRP2, szczególnie zlokalizowanego w obrębie otoczki jądrowej, wydaje się obiecującym testem umożliwiającym, nie tylko ocenę prognostyczną choroby nowotworowej, ale również wskazującym na konieczność wdrożenia u pacjentów z nadekspresją białka, bardziej intensywnej terapii przeciwnowotworowej. Omawiana praca po raz pierwszy wykazała jądrową lokalizację MRP2 w rakach piersi oraz jego niekorzystne znaczenie prognostyczne.

BCRP

W kolejnej pracy opisaliśmy wartość prognostyczną kolejnego białka związanego z regulacją odpowiedzi na chemioterapię - BCRP, inna nazwa ABCG2. W warunkach fizjologicznych, białko to jest zlokalizowane głównie w błonie nabłonka naturalnych barier narządowych takich jak: krew-mózg, krew-jądro oraz w obrębie łożyska. BCRP odgrywa rolę ochronną, aktywnie transportuje z komórek na zewnątrz ksenobiotyki, toksyny i inne substancje chemiczne. Podobnie jak P-glikoproteina, BCRP jest też obecne na powierzchni komórek macierzystych krwi. Obserwowano występowanie nadekspresji BCRP w komórkach macierzystych w warunkach niedotlenienia, związanych z działaniem ścieżki sygnalizacyjnej HIF-1. Taki mechanizm działania białka sugeruje także istotną rolę nadekspresji BCRP w powstawaniu radiooporności. W obrębie nowotworu podstawowy mechanizm działania BCRP polega na aktywnym transporcie ksenobiotyków, w tym również leków cytostatycznych, poza komórkę. Nadekspresja BCRP w ludzkich komórkach nowotworowych wiąże się z opornością tych komórek na wiele cytostatyków. Dotychczas istnieją duże rozbieżności w ocenie wartości prognostycznej ekspresji BCRP w rakach piersi.

W naszej publikacji zajęto się analizą materiału uzyskanego od 101 pacjentek z rakiem piersi o niskim stopniu zaawansowania choroby (IIA i IIB), leczonych w Dolnośląskim Centrum Onkologii w latach 1993-1994 (Ginekol.Pol. 2012). W doborze materiału do badania szczególnie ważna była jednolita grupa pacjentów oraz długi czas obserwacji wyników leczenia (14 lat). Taki dobór badanej grupy miał na celu uzyskanie jak najbardziej jednoznacznej oceny znaczenia BCRP w rakach piersi. W badanej grupie pacjentek, zaobserwowano dodatnią korelację pomiędzy nasileniem ekspresji BCRP w komórkach nowotworowych, a stopniem złośliwości guza (G) oraz ujemną korelację pomiędzy markerem ekspresją BCRP, a ekspresją receptorów estrogenowych i progesteronowych. Analiza wieloczynnikowa Coxa wykazała, że najsilniejszymi niezależnymi czynnikami rokowniczymi dla przeżycia wolnego od nawrotu choroby (DFS), przeżycia specyficznego dla choroby (DSS) i przeżycia całkowitego (OS) okazały się być: wysoka ekspresja BCRP i obecność przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych. Wykazano, że w opisanej grupie pacjentek (niski stopień zaawansowania choroby), w długim okresie obserwacji wyników leczenia, BCRP jest użytecznym czynnikiem prognostycznym. Należy podkreślić, że jedynym, równie istotnym prognostycznie markerem był powszechnie używany, jako najważniejszy kliniczny parametr prognostyczny, stan zajęcia regionalnych węzłów chłonnych. Ocena aktywności BCRP może być w przyszłości pomocna przy stratyfikacji pacjentek z rakiem piersi, które mają być poddane chemioterapii. Dotychczas nie opisano znaczenia ekspresji BCRP w tak

jednorodnej pod względem stopnia zaawansowania grupie pacjentek z rakiem piersi i w tak długim okresie obserwacji klinicznej.

YB-1

Białko YB-1 jest również powiązane ze zjawiskiem oporności na cytostatyki. Jest ono białkiem wielofunkcyjnym uczestniczącym w kontroli szlaków utleniania i redukcji, wzrostu komórki i przede wszystkim odgrywającym rolę w kontroli odpowiedzi na czynniki toksyczne. Zwiększona ekspresja białka YB-1 występuje w różnych nowotworach (rak piersi, rak jajnika, osteosarcoma, rak jelita grubego). Najciekawszy, z punktu widzenia oceny właściwości prognostycznych tego białka, jest jego wpływ na modyfikację odpowiedzi na chemioterapię. Szczególnie interesująca jest ocena ekspresji YB-1 w lokalizacji jądrowej, gdzie opisywana jest jego funkcja jako czynnika transkrypcyjnego dla wielu genów związanych z replikacją DNA, procesem proliferacji lub oporności na leki cytostatyczne. YB-1 w stanie fizjologicznym jest zlokalizowane zwykle w cytoplazmie, ale może ulec translokacji do jądra komórkowego. Przeniesienie białka YB-1 z cytoplazmy do jądra komórki może rozwijać się w komórkach nowotworowych pod wpływem promieniowania UV, ale także po zastosowaniu leków przeciwnowotworowych, takich jak: cisplatyna, etopozyd lub mitomycyny C. Infekcja wirusowa również może prowadzić do translokacji białka YB-1 z cytoplazmy do jądra. Wykazano, że powstała w wyniku zakażenia onkolitycznym adenowirusem (np. Xvir03) translokacja YB-1 do jądra, sprzyja dalszej replikacji wirusa. Jednocześnie następuje zahamowanie ekspresji genów MDR1 i MRP1 i w ten sposób powoduje ponowne uwrażliwienie komórek nowotworowych na działanie leków cytostatycznych. Takie połączenie tradycyjnej chemioterapii z leczeniem wirusowym może w przyszłości umożliwić opracowanie nowych schematów terapeutycznych. YB-1 indukuje ekspresję ważnych dla procesu leczenia raka piersi receptorów estrogenowych i HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2). Jądrowa postać YB-1 bierze również udział w tworzeniu szlaków sygnalizacyjnych związanych z procesami ochrony stabilności DNA i komórki przed genotoksycznym działaniem cisplatyny, mitomycyny oraz promieniowania jonizującego.

W publikacji analizowano grupę 101 pacjentek z rakiem piersi o niskim stopniu zaawansowania choroby (IIA i IIB), leczonych w Dolnośląskim Centrum Onkologii w latach 1993-1994 – średni czas obserwacji pacjentek wynosił 14 lat (Anticancer Res. 2012)W wyniku przeprowadzonych badań zaobserwowano istnienie dodatniej korelacji pomiędzy jądrową ekspresją YB-1 a obecnością przerzutów do węzłów chłonnych. Taka zależność,

stwierdzona w grupie chorych o dobrym rokowaniu (II stopień zaawansowania choroby) wydaje się szczególnie interesująca. Ocena jądrowej ekspresji YB-1 może mieć potencjalnie dużą wartość kliniczną dla wyboru grupy pacjentek, które wymagają bardziej intensywnego leczenia uzupełniającego. Niekorzystną wartość rokowniczą jądrowej postaci YB-1 potwierdziła analiza wieloczynnikowa metodą regresji proporcjonalnego hazardu Coxa, z której wynika, że pacjentki wykazujące wyższą ekspresję YB-1 w jądrach komórek nowotworowych cechuje istotnie krótszy całkowity czas przeżycia. Poza YB-1 jedynie obecność zajętych węzłów chłonnych wykazała w analizie wieloczynnikowej niekorzystną wartość prognostyczną. W pracy wykazano, że najgorsze wyniki leczenia (najkrótsze przeżycia) występują w grupie pacjentek o zwiększonej aktywności jądrowej postaci YB-1. Podsumowując naszą pracę należy zaznaczyć, że jądrowa ekspresja YB-1 w raku piersi stanowi silny, niekorzystny czynnik prognostyczny. Pozwala to przewidzieć rokowanie niezależnie od długości okresu obserwacji. Biorąc pod uwagę złożony mechanizm oddziaływania, białko YB-1 można traktować jako potencjalny i obiecujący cel dalszych badań prowadzonych pod kątem wykrycia nowych metod terapeutycznych, opartych na wykorzystaniu wirusów, czy też nowych metod zwalczania oporności na stosowane leki cytotoksyczne. Dotychczas nie opisano znaczenia ekspresji YB-1 w rakach piersi o tak długich przebiegach klinicznych w jednorodnej pod względem stopnia zaawansowania grupie pacjentek. Biorąc pod uwagę wątpliwości związane z różnymi immunohistochemicznymi metodami wykrywania YB-1 (opisane przez Woolley i wsp. w 2011 roku) oraz fakt, że nasze badania zostały przeprowadzone z użyciem szeroko opisanej i skontrolowanej pod wieloma aspektami metodyki, we współpracy z jedną z ważniejszych grup zajmujących się tym białkiem, grupą profesora Hermanna Lage z Uniwersytetu Humboldta w Berlinie, należy podkreślić dużą wagę uzyskanych wyników.

S100P

Rodzina genów S100 odpowiada za kodowanie niskocząsteczkowych białek związanych z progresją raka. Białka z rodziny S100 wykazują duże powinowactwo do jonów wapnia i działają jak przetworniki sygnału wapniowego. Odpowiedni poziom jonów wapnia działa jak uniwersalny sygnał biorący udział w kontroli wielu procesów, m.in.: ekspresji genów, apoptozy i różnicowania komórek. Coraz częściej opisywane są zmiany w ekspresji białek rodziny S100 w różnych nowotworach, w tym w raku piersi. Geny S100 (S100A1, S100A2, S100A4, S100A6, S100A8, S100A9, S100A10, S100A11 i S100A14) wykazują podwyższoną ekspresję w podstawnym typie raka piersi i mogą one być potencjalnym celem

terapii tego typu raka piersi. Związki między członkami rodziny S100 i nowotworami można wyjaśnić na kilka sposobów, ale istotną informacją jest fakt, że region w chromosomie 1q21 człowieka, miejsce gdzie jest skupiona większość genów S100, jest szczególnie podatny na rearanżacje genomowe.

Jednym z bardziej interesujących przedstawicieli tej grupy białek jest S100P. Jest niskocząsteczkowym białkiem związanym w mechanizmie swojego oddziaływania z procesami proliferacji i angiogenezy. W badaniach *in vitro* i *in vivo* wykazano, że obecność S100P jest związana z większą inwazyjnością i agresywnością procesu nowotworowego w obrębie prostaty, trzustki, jelita grubego, płuc, jajnika oraz piersi. Opisywana jest również hipoteza wskazująca na możliwość zmniejszania agresywności procesu nowotworowego poprzez wyciszenie ekspresji S100P. Istotny z punktu widzenia klinicznego jest fakt, że białko to może wykazywać również związek z występowaniem oporności na chemioterapię. Pierwsze badania mikromacierzowe oraz nasza praca przeprowadzona na rakach jajnika wykazały taką właśnie zależność.

W naszym badaniu przeprowadzono ocenę ekspresji białka S100P u 85 pacjentek chorych na raka piersi, w II stopniu zaawansowania choroby, które w latach 1992-1993 były standardowo leczone w Dolnośląskim Centrum Onkologii (Histol Histopathol. 2013). Zanalizowano także wartość prognostyczną S100P przy użyciu plotera KM (www.kmplot.com), w którym zawarto informację na temat przeżycia 2422 pacjentek. Oceniono również wrażliwość 11 linii komórek nowotworowych na działanie cytostatyków (5-fluorouracyl, cisplatyna, cyklofosfamid, doksorubicyna etopozyd, metotreksat, mitomycyna mitoksantron, paklitaksel, topotekan i winblastyna). Badania przeprowadzono we współpracy z Uniwersytetem Medycznym we Wrocławiu, Uniwersytetem Semmelweisa w Budapeszcie i Uniwersytetem Humboldta w Berlinie.

Badanie linii komórkowych nie wykazało związku pomiędzy ekspresją S100P w komórkach nowotworowych i ich wrażliwością na wybrane leki cytostatyczne. Natomiast w części badań poświęconej ocenie materiału uzyskanego od pacjentek, zarówno w analizie jednoczynnikowej, jak i wielowymiarowej, wykazano niekorzystną rolę prognostyczną podwyższonej ekspresji jądrowej postaci S100P. U pacjentek z podwyższoną jądrową ekspresją S100P zaobserwowaliśmy krótszy czas przeżycia całkowitego i wolnego od choroby. Podobne wyniki uzyskaliśmy wykorzystując do oceny informacje zawarte w bazie danych plotter KM. Biorąc pod uwagę fakt, że badania *in vitro* nie potwierdziły potencjalnego związku pomiędzy ekspresją S100P a wrażliwością na cytostatyki, należy stwierdzić, że w przypadku raków piersi podwyższona ekspresja S100P jest związana z bardziej agresywnym

przebiegiem choroby nowotworowej. Sugestia, że białko to może być celem nowego typu terapii wymaga dalszych badań. Biorąc jednak pod uwagę, udowodnione w naszej pracy, silne znaczenie prognostyczne S100P, można rozważać kontynuację badań nad rolą predykcyjną i poszukiwaniem nowych leków związanych mechanizmem działania z tym białkiem, właśnie u pacjentek z rakiem piersi. S100P może być również interesującym czynnikiem prognostycznym, pozwalającym na wyodrębnianie z grup jednolitych pod względem histologicznym pacjentek o gorszym rokowaniu.

CD46

Układ dopełniacza to zespół kilkudziesięciu białek obecnych w osoczu, a także w innych płynach ustrojowych wraz z powiązаныmi z nimi funkcjonalnie licznymi receptorami i białkami regulatorowymi. Układ dopełniacza spełnia ważną rolę w mechanizmach odpowiedzi immunologicznej - jego działanie polega na aktywacji kaskady enzymatycznej, doprowadzającej do szeregu zjawisk mających istotne znaczenie w przebiegu odpowiedzi immunologicznej i reakcji zapalnej. Dopełniacz pełni wiele ważnych funkcji w organizmie, takich jak: liza komórek bakteryjnych, pasożytniczych czy nowotworowych, opsonizacja komórek ułatwiająca fagocytozę, a także aktywacja komórek żernych oraz usuwanie kompleksów immunologicznych. Układ dopełniacza tworzy około 30 białek, aczkolwiek w ostatnich latach, największa uwaga badaczy skupia się na ocenie właściwości ekspresji błonowych białek regulacyjnych układu dopełniacza mCRPs, których podwyższona ekspresja jest często wykrywana w komórkach nowotworowych. Za najważniejsze uważa się trzy z nich: CD46 (błonowy kofaktor białkowy wiążący składniki C3b i C4b), CD55 (czynnik przyspieszający rozkład konwertaz C3 i C5) oraz CD59 (blokuje kompleks atakujący błonę). Wzrost ekspresji CD46 wydaje się być związany z aktywną ochroną komórek nowotworowych przed działaniem czynników cytotoksycznych. Badania kliniczne i doświadczalne dane potwierdzają także potencjalną rolę układu dopełniacza w pośredniej kontroli proliferacji komórek rakowych poprzez czynnik transkrypcyjny STAT3. Zaobserwowano związek genu CD46 z mechanizmem działania aktywowanego czynnika STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3), który polega na przyspieszeniu wzrostu komórek nowotworowych, promowaniu angiogenezy guza i zwiększaniu dynamiki powstawania przerzutów. Rola białek regulacyjnych układu dopełniacza jest więc bardzo uniwersalna. Zaobserwowano ją w różnych typach nowotworów, szczególnie wyraźnie w nowotworach o większej złośliwości. Rola układu białek hamujących dopełniacz w rakach piersi jest dotychczas bardzo słabo poznana.

Nasze badanie przeprowadziliśmy na materiale uzyskanym od 70 pacjentek z rozpoznaniem pierwotnego inwazyjnego raka piersi, w stopniu zaawansowania choroby I-III, które były w 2000 roku pooperacyjnie napromieniane w Dolnośląskim Centrum Onkologii (Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. 2011). Przeprowadziliśmy ocenę immunohistochemiczną materiału pod kątem oceny aktywności ekspresji białka CD46 oraz analizę danych klinicznych pacjentek, uwzględniając co najmniej 5-letni okres obserwacji. Analiza wieloczynnikowa wykazała, że ekspresja CD46 i obecność zajętych węzłów chłonnych są jedynymi niezależnymi złymi czynnikami rokowniczymi. Po przeprowadzeniu analizy Kaplana-Meiera stwierdziliśmy u pacjentek z podwyższoną ekspresją CD46, znacząco skrócony czas wolny od wznowy (DFS) oraz skrócony całkowity czas przeżycia (OS). Podsumowując należy podkreślić, że CD46 jest szczególnie interesującym białkiem, o złożonym mechanizmie działania, którego podwyższona ekspresja ma wyraźnie zaznaczoną wartość prognostyczną. Dalsze badania nad tym markerem pozwolą, nie tylko dodatkowo opisać jego wartość prognostyczną, ale również mogą mieć sens w zakresie poszukiwania nowych form terapii, np. związanych z hamowaniem oddziaływania czynnika STAT3.

BUBR1

Jednym z najbardziej interesujących obszarów naszych badań jest ocena rokownicza markerów związanych z funkcjonowaniem punktów kontrolnych procesu podziału komórkowego. W mechanizmie działań opisywanej grupy związków można wyróżnić ważny etap kontroli procesu segregacji chromosomów, nazywany również punktem kontrolnym wrzeciona mitotycznego (SAC - spindle assembly checkpoint). Działanie to polega na kontroli prawidłowego przebiegu procesu mitozy w momencie, w którym zostaną rozpoznane nieprawidłowości w zakresie podziału chromosomów. W przypadku stwierdzenia nieprawidłowości następuje zablokowanie przejścia tego procesu do kolejnego etapu podziału – anafazy. Czasem proces podziału jest jedynie okresowo zablokowany, do czasu gdy wszystkie chromosomy są prawidłowo podłączone do wrzeciona. Efektem nieprawidłowości w zakresie działania punktu kontrolnego wrzeciona kariokinetycznego są zaburzenia w budowie komórek potomnych, najczęściej w postaci aneuploidii. W procesie obserwacji tych anomalii szczególnie interesująca wydaje się ocena aktywności BUBR1 (budding uninhibited by benzimidazole-related 1), białka będącego głównym składnikiem kompleksu kontrolnego proces mitozy. W wielu publikacjach opisywano obecność ekspresji BUBR1 w raku piersi, natomiast jak dotąd nie zbadano jego wartości prognostycznej.

Materiał do naszych badań pochodził od 98 pacjentek z niskim stopniem (IIA i IIB) zaawansowania choroby, diagnozowanych i leczonych w Dolnośląskiego Centrum Onkologii we Wrocławiu, w latach 1993-1994 (J Histochem Cytochem. 2013). W materiale ocenialiśmy ekspresję BUBR1 za pomocą testów immunohistochemicznych i analizowaliśmy jego związek z danymi klinicznymi pacjentek. Ponadto zanalizowaliśmy wartość prognostyczną BUBR1 przy użyciu bazy danych KM plotter (www.kmplot.com), w której zawarto informacje na temat przeżycia 2422 pacjentów. Badania przeprowadzono we współpracy z Uniwersytetem Medycznym we Wrocławiu, Uniwersytetem Semmelweisa w Budapeszcie i Uniwersytetem Humboldta w Berlinie.

W analizie jednoczynnikowej wykazano istotny statystycznie wpływ stopnia zaawansowania nowotworu, wieku i stanu menopauzalnego na przeżycie całkowite chorych. Najwyraźniej zależność tę odnotowano jednak u pacjentek, u których występowały przerzuty w węzłach chłonnych oraz wysoka ekspresja BUBR1. Natomiast gorsze przeżycie specyficzne dla choroby (DSS) i wolne od nawrotu nowotworu (DFS) związane było z wiekiem pacjentek, obecnością przerzutów w węzłach chłonnych N+ i ponownie wysoką ekspresją BURB w jądrach komórkowych.

W analizie wieloczynnikowej, wykazano jedynie zależność między czasem przeżycia wolnego od nawrotu (DFS) i specyficznego dla choroby (DSS) oraz wysokim poziomem ekspresji BUBR1. Natomiast w ocenie czasu przeżycia całkowitego (OS), niezależnymi czynnikami rokowniczymi okazały się: wysoki poziom ekspresji BUBR1 oraz nadekspresja HER-2. W analizie za pomocą plottera KM stwierdziliśmy, że zwiększona ekspresja BURB1 posiada niekorzystną wartość rokowniczą niezależnie od obecności u pacjentów przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych.

Należy podkreślić, że w naszej pracy po raz pierwszy została opisana prognostyczna rola ekspresji BUBR1 w grupie pacjentek chorych na raka piersi. Zaobserwowaliśmy bardzo silną korelację wysokiej ekspresji BUBR1 z niekorzystnym przebiegiem procesu choroby. Ciekawym pomysłem wydaje się zbadanie roli BUBR1 jako potencjalnego celu terapeutycznego dla leków należących do grupy inhibitorów mikrotubul. Otwiera się tu nowa droga badawcza, której celem jest potwierdzenie wartości predykcyjnej białka BURB1.

Na podstawie przeglądu piśmiennictwa oraz wyników własnych badań, opublikowałem pracę poglądową zawierającą informacje na temat czynników prognostycznych i predykcyjnych w raku piersi (Adv Clin Exp Med. 2013).

POZOSTAŁE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWO-BADAWCZE

Poza przedstawionym powyżej cyklem publikacji jestem autorem i współautorem 20 prac oryginalnych opublikowanych w recenzowanych czasopismach zagranicznych i krajowych. Jestem także autorem i współautorem 44 komunikatów zjazdowych prezentowanych na zjazdach naukowych w kraju i za granicą. Były one publikowane w recenzowanych materiałach z kongresów.

Łączna punktacja mojego dorobku naukowego, z wyłączeniem publikacji wchodzących do cyklu stanowiącego osiągnięcie naukowe, wynosi wg Impact factor: **32.186**, natomiast wg MNiSW/KBN: **347,0**.

Mój dorobek naukowy można podzielić na trzy grupy tematyczne:

1. Poszukiwanie nowych czynników prognostycznych i predykcyjnych w raku gruczołu sutkowego.
2. Poszukiwanie nowych czynników prognostycznych i predykcyjnych w innych nowotworach (rak jajnika, płuca, chłoniaki nieziarnicze).
3. Rola radioterapii w leczeniu nowotworów.

Ad. 1.

Istotną część mojego dorobku naukowego stanowią badania czynników prognostycznych i predykcyjnych w raku gruczołu sutkowego. We współpracy z Katedrą i Zakładem Histologii i Embriologii oraz Katedrą Onkologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu opublikowałem pracę opisującą zależności pomiędzy receptorem estrogenowym, a innymi czynnikami prognostycznymi (Fol Morphol, 2005). W badaniu została wykazana wartość receptora estrogenowego (ER) jako niezależnego czynnika prognostycznego i predykcyjnego, którego aktywność zależy od stopnia zróżnicowania nowotworu. Okazało się także, że równoczesna ocena ekspresji ER, receptora progesteronowego (PgR) oraz p53 podnosi wartość analizy predykcyjnej i rokowniczej odpowiedzi na zastosowanie tamoksifenu, co wnosi praktyczną wartość dla praktyki klinicznej.

W badaniach prowadzonych przeze mnie i moich współpracowników opisano również znaczenie immunocytochemicznego oznaczania ekspresji dwóch uznanych wykładników proliferacji – Ki-67 i PCNA (Ginekol Pol, 2005). Praca ta wykazała, że w przypadku raków przewodowych gruczołu sutkowego oznaczanie ekspresji Ki-67 jest bardziej wiarygodnym

wykładnikiem proliferacji w porównaniu z PCNA. Obecnie ocena Ki67 jest już standardowym elementem oceny patologicznej zmian nowotworowych.

Współpracując z Katedrą i Zakładem Histologii i Embriologii UM we Wrocławiu uczestniczyłem w pracy poświęconej nowatorskiemu podejściu do badań biologii raka gruczołu sutkowego, co zaowocowało publikacją opisującą wpływ miofibroblastów na dynamikę tego schorzenia. Podczas badań wykazano, że obecne w utkaniu raków gruczołu sutkowego miofibroblasty stymulują na drodze parakrynowej komórki nowotworowe. Z pracy tej wynika też wniosek praktyczny, że w przewidywaniu przebiegu klinicznego choroby nowotworowej oraz w poszukiwaniu nowych leków przeciwnowotworowych należy uwzględniać nie tylko parametry biologiczne komórek nowotworowych, ale również, co ma utylitarne znaczenie, tworzące łącznotkankowy zrąb guza miofibroblasty (Fol Histochem Cytobiol, 2006; Anticancer Res., 2007).

Bardzo interesujący nowy kierunek badań naszego zespołu otworzyła praca opisująca znaczenie prognostyczne ekspresji receptora estrogenowego alfa (ER), białka pS2, metalotioneiny (MT) oraz CD24 w rakach gruczołu sutkowego (Br J Cancer, 2006; Anticancer Res., 2006). W badaniach tych opisano znaczenie ekspresji czynników klasycznych i nowych w różnych podgrupach chorych. Wykazały one, że cytoplazmatyczna ekspresja CD24 jest najsilniejszym niekorzystnym czynnikiem prognostycznym. Najważniejszą częścią analizy było wyodrębnienie z badanej grupy pacjentek podgrup z „dobrymi” (wysoka ekspresja ER i pS2, niska ekspresja MT oraz brak cytoplazmatycznej ekspresji CD24) i „złymi” czynnikami prognostycznymi (niska bądź brak ekspresji ER i pS2, wysoka ekspresja MT oraz cytoplazmatyczna ekspresja CD24). Wykazano, że wszystkie pacjentki z „dobrymi” czynnikami prognostycznymi (10% badanej grupy) przeżyły cały siedmioletni okres obserwacji. Doniesienie to może być praktycznie wykorzystane w stratyfikacji pacjentek przed kwalifikacją do leczenia uzupełniającego.

W roku 2006 za cykl wyżej wymienionych publikacji, na temat raka gruczołu sutkowego, nasz zespół badawczy został **wyróżniony nagrodą Ministra Zdrowia**.

Zdobyte doświadczenie w opisanych pracach wykorzystałem przeprowadzając następne badania mające na celu określenie nowych czynników prognostycznych i predykcyjnych w tej grupie chorych. Najważniejsze prace z tego cyklu opublikowałem w latach 2011-2013. Szczegółowe informacje dotyczące moich badań przedstawiłem w pracy habilitacyjnej wraz z kopiami 6 publikacji oryginalnych składających się na monotematyczny cykl publikacji stanowiący moją rozprawę habilitacyjną. Dodatkowo do pracy habilitacyjnej

dołączony jest artykuł poglądowy podsumowujący monotematyczny cykl publikacji, w którym zebrałem aktualne dane na temat nowych czynników prognostycznych raka gruczołu piersiowego (Adv Clin Exp Med 2013, 22, 1, 5–15).

Ad. 2

W badaniach dotyczących czynników prognostycznych i predykcyjnych w komórkach raka jajnika, skoncentrowaliśmy się na badaniu zjawiska oporności na chemioterapię (multi-drug resistance, MDR). Bazując się na wynikach naszych badań na komórkach raka piersi opisano kilka nowych czynników prognostycznych i predykcyjnych w raku jajnika. Wykazano, że wysoki poziom ekspresji białka S100P jest niekorzystnym czynnikiem prognostycznym (Histopathology, 2007). Niekorzystnym czynnikiem rokowniczym okazała się również podwyższona ekspresja białka CD46 (Anticancer Res., 2006). W naszych publikacjach zbadano także ekspresję metalotioneiny w komórkach raka jajnika wrażliwych (A2780) lub opornych (A2780RCIS) na leczenie farmakologiczne związkami platyny. Szczególnie interesująca okazała się obserwacja subkomórkowych różnic w ekspresji metalotioneiny, związanych ze zróżnicowanym poziomem oporności na chemioterapię komórek raka jajnika. Badania wykazały, że poddane działaniu cisplatyny odporne na leczenie systemowe linie komórkowe (A2780RCIS), wykazywały zwiększoną ekspresję jedynie jądrowej (znajdującej się w jądrach komórkowych) postaci metalotioneiny. Nie wykazano natomiast tej zależności w komórkach, w których odnotowano ekspresją jedynie cytoplazmatycznej postaci metalotioneiny (Virchows Arch., 2007).

W naszych badaniach nad rakiem jajnika ocenialiśmy również wpływ innych czynników na występowanie oporności na leczenie systemowe. Analiza wykazała znaczenie prognostyczne białka p16 (Histol.Histopathol., 2008). Badanie to miało na celu ocenę wartości prognostycznej ekspresji p16 w stosunku do Ki67 i kaspazy-3. Wykazano, że niższa ekspresja p16 jest niekorzystnym wskaźnikiem prognostycznym w raku jajnika i najczęściej występuje u młodszych chorych, z krótszym okresem przeżycia całkowitego.

Podjęliśmy również próbę oceny wpływu tamoksifenu na komórki raka jajnika (Ginekol. Pol., 2010). W badaniu zaobserwowano brak korelacji pomiędzy wrażliwością komórek jajnika w liniach komórkowych na tamoksifen a ekspresją obu typów receptorów estrogenowych ER α i ER β . Wyniki pracy sugerują, że tamoksifen modyfikuje w zróżnicowany sposób wrażliwość linii komórkowych raka jajnika na związki platyny. Dodatkowo wykazano, że nie jest ona powiązana z ekspresją ER, w związku z tym należy

poszukiwać u chorych na raka jajnika innych czynników predykcyjnych wrażliwości na tamoksifen.

Kontynuując pracę nad oceną związku aktywności receptorów estrogenowych z chemiowrażliwością komórek raka jajnika zajęliśmy się bardziej szczegółowo receptorem ER β , dodatkowo badając komórki uzyskane od poddanych terapii pacjentek. Stwierdzono istotnie wyższą ekspresję ER β w materiale tkankowym uzyskanym od chorych, które odpowiedziały dobrze na chemioterapię (pełna odpowiedź) w trybie pierwotnej laparotomii niż u pacjentów z postępującą chorobą. Wykazano również w tej grupie chorych dłuższy całkowity czas przeżycia bez progresji. Obserwacja ta wskazuje na prawdopodobną rolę utraty ekspresji ER β w procesie nowotworzenia raka jajnika (Anticancer Res., 2011).

W ostatniej pracy poświęconej analizie czynników prognostycznych raka jajnika opisano rolę tkankowego inhibitora metaloproteiny 2 (TIMP 2). Stwierdzono, że istnieje związek między zwiększoną ekspresją TIMP-2 w obrębie zrębu guza i dobrą odpowiedzią kliniczną na cisplatinę i paklitaksel oraz dłuższym okresem przeżycia. Badanie to potwierdza koncepcję wykorzystania oceny ekspresji TIMP-2 w obrębie podścieliska raka jajnika jako obiecującego markera rokowniczego i markera odpowiedzi guza na cisplatinę i paklitaksel (J.Histochem.Cytochem. 2012).

W ramach zainteresowań naukowych związanych z oceną czynników prognostycznych nowotworów zainteresowaliśmy się również rakiem płuca. W immunocytochemicznych badaniach przeprowadzonych retrospektywnie w materiale uzyskanym od chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca nie wykazano predykcyjnej i prognostycznej wartości aktywności COX-2 i białek związanych z MDR (MDR1/P-gp, MRP1 lub BCRP). Aktywność COX-2 może być związana z regulacją aktywności białek MDR1/P-gp i BCRP. Dodatkowo okazało się, że istotnym czynnikiem prognostycznym w ocenie przeżycia wolnego od choroby jest obecność odpowiedzi klinicznej na zastosowaną chemioterapię (Anticancer, 2008).

Podjęliśmy również próbę analizy przyczyn niepowodzenia chemioterapii u pacjentów z chłoniakami nieziarniczymi (NHL) i jej związku z procesem powstawania oporności wielolekowej (MDR). Analiza retrospektywna grupy 56 pacjentów z tym rozpoznaniem wykazała, że nie obserwuje się zwiększonej ekspresji P-glikoproteiny (P-gp) u pacjentów, którzy nie zostali poddani chemioterapii. Opisano natomiast silną korelację między aktywnością cyklooksygenazy-2 (COX-2) i białkami MDR (MRP1, MRP2 i BCRP). Wysoka aktywność białka BCRP była najsilniej związana ze złą odpowiedzią pacjentów na chemioterapię, dlatego ocena aktywności BCRP może być użyteczna w ocenie predykcyjnej

chorego przed zastosowaniem chemioterapii. Silna korelacja między aktywnością COX-2 oraz ekspresją białek MDR w NHL sugeruje praktyczną korzyść z zastosowania inhibitorów COX-2 jako leków zwiększających chemiowrażliwość komórek chłoniaków nieziarniczych (Oncol Rep., 2009).

Ad. 3

Istotną częścią mojej działalności naukowej, która łączy się z pracą zawodową, jest ocena skuteczności radioterapii u dzieci z mięsakami tkanek miękkich. Przeprowadzono analizę ogólnopolskiej bazy klinicznej opisującej wyniki leczenia przeprowadzonego w tej grupie pacjentów wg założeń protokołu międzynarodowego CWS-96 (Pediatr. Pol., 2008). W analizie wykazano negatywny wpływ opóźnienia zastosowania napromieniania u dzieci, szczególnie w III stopniu zaawansowania choroby. Ponadto potwierdzono wartość prognostyczną opisaną w protokole CWS-96 stratyfikacji pacjentów. W efekcie publikacji w znacznym stopniu poprawił się sposób realizacji protokołu leczenia, co ma znaczący aspekt praktyczny – obecnie znacznie rzadziej obserwowane są opóźnienia w stosowaniu napromieniania. Wyniki analizy spotkały się z dużym zainteresowaniem nie tylko hematologów dziecięcych, ale również onkologów-radioterapeutów i zostały dodatkowo przedstawione w postaci ustnej prezentacji na Konferencji ESTRO (the European Society for Radiotherapy and Oncology) w Barcelonie w 2009 roku.

W analizie skuteczności stosowania radioterapii zajmuję się również oceną efektu leczenia skojarzonego chorych z rakiem odbytnicy. W pracach zespołu Dolnośląskiego Centrum Onkologii opisana została, na grupie 374 chorych, częstość występowania powikłań urologicznych po zastosowanym leczeniu skojarzonego. W analizie powikłań udowodniona została korzystna, z praktycznego punktu widzenia, rola użycia noża harmonicznego (Hepatogastroenterology 2012).

Celem naszego badania było także określenie cech kliniczno-patologicznych związanych ze złym rokowaniem pacjentów z rakiem odbytnicy. Wykazano w analizie wieloczynnikowej, że jedynie zajęcie regionalnych węzłów chłonnych i zaawansowany wiek miały negatywny wpływ na okres przeżycia pacjenta. Wnioskiem praktycznym naszej pracy jest konieczność indywidualnego projektowania leczenia uzupełniającego u osób starszych połączonego ze staranną analizą potencjalnej toksyczności zaleconej terapii (J Gastrointest Liver Dis., 2008). Osobna praca została poświęcona ocenie ryzyka rozejścia się zespolenia po całkowitym usunięciu mezorektum. Wykazano, że zastosowanie radioterapii nie nasila ryzyka

tego powikłania. Z pracy wynika, że związane ono było przede wszystkim z niską lokalizacją zmiany nowotworowej (Rep.Pract.Oncol.Radiother., 2007).

Od 2008 roku uczestniczę także w badaniach nad rolą radioterapii w leczeniu raka odbytnicy prowadzonych w ramach Polish Colorectal Study, której koordynatorem jest prof. Krzysztof Bujko z Instytutu Onkologii w Warszawie. Wyniki naszych badań są ważnym, często cytowanym, polskim osiągnięciem w zakresie promocji stosowania radioterapii przedoperacyjnej w leczeniu skojarzonym raka odbytnicy. Aktualnie została przyjęta do druku publikacja porównująca dwie strategie terapii skojarzonej zaawansowanej postaci raka odbytnicy – jedna oparta na zastosowaniu krótkiej radioterapii (5x5Gy), a druga na zastosowaniu długiego okresu leczenia (50,4Gy w 28 frakcjach). Wczesna ocena wyników tego międzyośrodkowego badania nie wykazała różnic w zakresie toksyczności i wczesnych wyników leczenia w obu grupach pacjentów (Radiotherapy and Oncology, 2013 [Epub ahead of print]).

Od 2009 roku uczestniczę w badaniach międzynarodowych nadzorowanych przez European Organisation for Research and Treatment of Cancer (EORTC), na temat leczenia skojarzonego guzów mózgu (Centric – badanie III fazy i Core - badanie II fazy). Obecnie oba badania są w trakcie analizy i wyniki stosowania w tej grupie pacjentów leczenia radioterapią z nowym lekiem z grupy inhibitorów integryny nie zostały jeszcze opublikowane.

Zajmuję się także oceną technik napromieniania całego ciała przed przeszczepem szpiku u dzieci oraz oceną toksyczności tego leczenia. Do tej pory wraz z zespołem zaprezentowałem wyniki na konferencjach polskich i międzynarodowych (ESTRO 2010, ASTRO 2011, PTRO 2012, PTO 2012). W naszych pracach zaproponowaliśmy modyfikację protokołu napromieniania całego ciała z wykorzystaniem do planowania leczenia tomografu komputerowego i w efekcie pełnej kontroli dawki w obszarze płuc. Pełne publikacje na temat są w trakcie opracowywania.

W ramach rozwoju technicznego Zakładu Teleradioterapii DCO, z mojej inicjatywy, wprowadzono w ośrodku szereg nowoczesnych technik napromieniania pacjentów z nowotworami gruczołu krokowego, płuc, piersi i ośrodkowego układu nerwowego. Do tej pory informacje na temat wczesnych wyników naszego leczenia zaprezentowaliśmy na konferencjach w Polsce w postaci prezentacji ustnej i plakatowej (PTO 2012, PTRO 2012).

Adam Kuciński