

## Warsztaty torakochirurgiczne pod patronatem firmy Covidien: Zabiegi wideotorakoskopii w chorobach nowotworowych płuca

### One port VATS lobectomy. Uniportal VATS major pulmonary resections

dr Diego Gonzalez-Rivas

Thanks to the recent improvements in thoracoscopy, a great deal of complex lung resections can be performed without performing thoracotomies. During the last years, experience gained through video-assisted thoracoscopic techniques, enhancement of the surgical instruments and improvement of high definition cameras have been the greatest advances. The huge number of surgical videos posting on specialized websites, live surgery events and experimental courses has contributed to the rapid learning of minimally invasive surgery during the last years. Nowadays, complex resections are being performed by thoracoscopy in experienced centers. Additionally, surgery has evolved regarding the thoracoscopic surgical approach, allowing us to perform difficult procedures by means of a small single incision, with excellent postoperative results. The potential advantages of reduced access trauma and better cosmesis, together with patient demand, have seen uniportal VATS spread across the world. Since we developed the uniportal technique for VATS major resections in 2010 we have increased the application of this technique to more than 95% of cases in our routine practice. We believe it is important to minimize the surgical aggressiveness especially in advanced stage lung cancer patients where the immune system is weakened by the disease or by induction treatments.

The future of the thoracic surgery is based on evolution of surgical procedures and innovations to try to reduce even more the surgical and anesthetic trauma. We recently introduced in our department the uniportal VATS lobectomy technique in non-intubated patients. The combination of nonintubated or awake thoracoscopic surgery and single-port VATS technique is promising because it represents the least invasive technique. Thanks to avoidance of intubation, mechanical ventilation and muscle relaxants the anesthetic side effects are minimal allowing to most of the patients to be included in a fast protocol avoiding the stay in a intensive care unit. Given that only one intercostal space is opened, the use of local anesthesia and blockade of a single intercostal space is enough for pain control at the beginning and during the surgery (no epidural and no vagus blockade are necessary). We use no trocar and during instrumentation we try to avoid pressure on the intercostal nerve so we reduce the risk of intercostal bundle injury. This non-intubated major pulmonary resections must only be performed by experienced thoracoscopic surgeons (preferably skilled and experienced with complex or advanced cases and bleeding control through VATS).

### The anaesthetic management in VATs lobectomy without airway intervention

dr Humberto Aymerich Cano

# Sesja I

## 1. Kompleksowa opieka nad chorym z rozpoznaniem raka płuca

**prof. Janusz Milanowski**

Katedra i Klinika Pneumonologii, Onkologii i Alergologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Diagnostyka, ustalenie stopnia zaawansowania choroby oraz leczenie raka płuca są procesem złożonym, wymagającym zaangażowania wielospecjalistycznego zespołu, w którym centralną pozycję zajmuje specjalista pulmonolog. Inni specjaliści niezbędni w tym procesie to: onkolog, radioterapeuta, torakochirurg, histopatolog, specjalista biologii molekularnej, specjalista medycyny paliatywnej, psycholog.

Rokowanie i przebieg choroby pacjenta z rakiem płuca zależą nie tylko od postaci histologicznej i stopnia zaawansowania, ale także od skutecznego leczenia chorób współistniejących, objawów miejscowych, objawów ubocznych terapii, postępowania w sytuacjach zagrożenia życia itp. Podstawą leczenia chorych z zaawansowanym NDRP pozostaje chemioterapia, ewentualnie leczenie ukierunkowane molekularnie. W tym zakresie, w ostatnich latach dokonał się ogromny postęp. Wykazano jednak, że równie ważne znaczenie dla rokowania ma postępowanie paliatywne, wspomagające, które poprawia jakość życia chorych a także wydłuża okres przeżycia. Najważniejsze punkty tego postępowania to: leczenie przeciwbólowe, zmniejszające duszność, przeciwwymiotne, antydepresyjne, sterydoterapia, stymulacja erytropoety, suplementacja żelaza, właściwe żywienie, fizykoterapia, rehabilitacja, psychoterapia.

Istotne znaczenie mają również zabiegi inwazyjne: punkcja jamy opłucnej, talkowanie, embolizacja naczyń, angioplastyka, zabiegi endoskopowe (BF, stenty, krioterapia, laseroterapia, brachyterapia). W wielu przypadkach o losie chorego decyduje szybkie postępowanie w stanach nagłego zagrożenia życia takich jak: krwotok płucny, zatorowość płucna, ostra niewydolność krążeniowo-oddechowa, zespół ostrej lizy guza, zespoły paranowotworowe oraz ostre infekcje oddechowe i wiele innych.

Specjalista pulmonolog odgrywa wiodącą rolę w realizacji wszystkich elementów postępowania diagnostyczno-leczniczego u chorego na raka płuca.

## 2. Możliwości endoskopowej diagnostyki raka płuca

**dr. hab. Artur Szlubowski**

Samodzielna Pracownia Endoskopii Krakowskiego Szpitala Specjalistycznego im. Jana Pawła II

Bronchofiberoskopia (bf), będąc jednym z najważniejszych badań diagnostycznych w diagnostyce raka płuca, ma jednak pewne ograniczenia, gdyż pozwala jedynie na makroskopową ocenę ściany tchawicy i oskrzeli. Bronchofibroskopy najnowszej generacji (tzw. rotacyjne) dzięki obrotowej końcówce pozwalają na dotarcie do zmian zlokalizowanych w oskrzelach subsegmentarnych szczytowych segmentów płuc (1 + 2 i 6) obustronnie. Technika uzupełniająca jest bf wąskopasmowa (NBI, *narrow band imaging*), pozwalająca na obrazowanie naczyń błony śluzowej i podśluzowej oskrzeli, stosowana zwłaszcza do oceny granicy nacieku nowotworowego. Ze względu na duży odsetek wyników fałszywie dodatnich aktualnie przypisuje się mniejsze znaczenie technice autofluorescencji (AFI, *autofluorescence imaging*). Możliwości obrazowania podczas bf znacznie zwiększyły się od momentu wprowadzenia na początku XXI wieku ultrasonografii wewnątrzoskrzelowej (EBUS, *endobronchial ultrasound*). Dzięki penetracji wiązki ultradźwiękowej 5–30 MHz, sięgającej 5–10 cm możliwe stało się zobrazowanie struktur zlokalizowanych w śródpiersiu i mięszu płuca. Technika EBUS z użyciem sond radialnych pozwala na ocenę ściany oskrzela, w tym głębokości nacieku nowotworowego, struktur położonych w śródpiersiu, a zwłaszcza węzłów chłonnych i naczyń. Dzięki zastosowaniu miniaturowych sond radialnych typu *mini-probe* istnieje możliwość skutecznej diagnostyki zmian obwodowych płuca większych niż 20 mm. Technika EBUS z użyciem sondy linearnej połączona z jednoczasową biopsją igłową przezoskrzelową (TBNA, *transbronchial needle aspiration*) pozwala na precyzyjną ocenę węzłów chłonnych śródpiersia przedniego i wnek płuca. W ostatnich latach coraz większą rolę w diagnostyce guzów płuca zlokalizowanych przyśródpiersiowo i w śródpiersiu tylnym odgrywa ultrasonografia wewnątrzprzełykowa (EUS, *endoscopic ultrasound*). Aktualnie techniki EUS i EUSb (EUS przy użyciu wideobronchoskopu EBUS) w połączeniu z EBUS, jako CUS (*combined ultrasound*) z powodzeniem zastąpiła mediastinoskopię w pierwotnej i wtórnej ocenie stopnia zaawansowania raka płuca. Do oceny cytologicznej materiału pobranego drogą TBNA i biopsji przezprzełykowej pod kontrolą EBUS i EUS, obok klasycznych rozmazów, aktualnie stosuje się technikę cytobloku, która pozwala na dokładną ocenę fenotypu, zwłaszcza gruczolakoraka i raka neuroendokrynnego płuca, na podstawie badań immunohistochemicznych i molekularnych.

## 3. Trudności w diagnostyce i ocenie radiologicznej raka płuca

**prof. Elżbieta Czekańska-Chehab**

## 4. Wybrane zastosowania brachyterapii w leczeniu chorych na raka płuca

**dr Marek Michnar**

## 5. Aktualne podstawy w immunoterapii raka płuca

prof. Joanna Domagała-Kulawik

Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Niezadowolające wyniki leczenia raka płuca skłaniają do stałych poszukiwań nowych form terapii. Pomyślne próby immunoterapii nowotworów litych są podstawą opracowania podobnych sposobów leczenia niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP). Osiągnięcia w tym zakresie wynikają również z poznania istotnych elementów odpowiedzi układu odporności w przebiegu choroby nowotworowej. Wiele danych wskazuje na to, że w początkowym okresie ontogenezy uruchomione są mechanizmy odporności przeciw-nowotworowej z dominującym udziałem komórek cytotoksycznych. Jednakże równocześnie odpowiedź ta jest silnie tłumiona i w guzach klinicznie wykrywalnych — niewydolna. Wyrazem niejako biernej obrony raka przed atakiem cytotoksycznym jest zmieniona i niska antygenowość komórek NDRP a także zmniejszona funkcja prezentacji antygeny zarówno przez komórki rakowe, jak i przez komórki APC (*antigen presenting cells*), w szczególności komórki dendrytyczne. Ponadto w środowisku rozwoju guza dominują limfocyty regulatorowe, których funkcja związana jest ze zwiększoną ekspresją czynnika transkrypcyjnego — FoxP3. Hamowanie odpowiedzi immunologicznej potęguje znaczna przewaga populacji makrofagów M2, komórek mieloidalnych: MDSCs (*myeloid derived suppressor cells*) oraz aktywność cytokin TGF $\beta$ , IL-10, IL-6, zmieniających polaryzację limfocytów T w kierunku supresyjno-regulatorowym, m.in. Th17. W hamowaniu aktywacji limfocytów odgrywa istotną rolę dominacja szlaku przekaźnikowego PD-1-PD-L1 (*programmed death ligand 1*) oraz blokowanie sygnału przez CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen-4*). Potwierdzenie znaczenia zaburzeń wykorzystano w produkcji leków blokujących szlak PD-1-PD-L1 (niwolumab) oraz przeciwciała przeciw- CTLA-4 (ipilimumab), obecnie w fazie badań klinicznych. Do leków nieswoiście pobudzających prezentację antygeny i efekt cytotoksyczny należy rekombinowana laktoferyna oraz liczne substancje hamujące funkcję MDSCs. Kolejną formą stymulacji odpowiedzi immunologicznej jest stosowanie szczepionek. Ich produkcja opiera się na rozpoznaniu dwóch dominujących antygenów raka płuca, tj.: MAGE-A3 i MUC1 oraz immunogenności EGF, z wykorzystaniem funkcji TGF $\beta$ . Wstępne wyniki stosowania szczepionek nie są zbyt obiecujące, jednakże wykazano istotną poprawę efektów łączenia immunoterapii z chemio- i radioterapią. Leczenie immunomodulujące ma charakter terapii indywidualizowanej, niezwykle istotne jest więc właściwe rozpoznanie stanu układu odporności pacjenta przed leczeniem i możliwość monitorowania miejscowej odpowiedzi immunologicznej, na przykład z wykorzystaniem metody płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (BAL).

## Sesja patomorfologów

### 1. The upcoming WHO thymoma classification: New histological criteria

prof. Alexander Marx

Institute of Pathology, University Medical Centre Mannheim, Heidelberg University, Theodor-Kutzer-Ufer 1-3, Mannheim, Germany

The upcoming WHO classification of thymic tumors (expected to be published in spring 2015) will maintain almost all semantic and conceptual features of its 2004 predecessor (e.g. the well accepted “A to B3 nomenclature of the main thymoma subtypes will remain). The few changes that will be introduced concern almost only the thymomas, rare “new” thymic carcinomas (e.g. the micronodular thymic carcinoma [1]), and neuroendocrine cancers. The latter will no longer be subdivided into “well differentiated” versus “poorly differentiated neuroendocrine carcinomas” but will be graded like their pulmonary counterparts according to the “old” criteria (mitotic activity, absence or presence of necrosis) [2], i.e. as low grade (typical carcinoid), intermediate grade (atypical carcinoid) and high grade tumors (large cell neuroendocrine carcinoma; small cell carcinoma of the thymus, with the latter diagnosis remaining based on H&E morphology without a need of immunohistological proof of neuroendocrine differentiation that may or may not be present). As to the thymomas, the following changes can be expected [3]:

1. Type A–B3 thymomas are now all considered as malignant tumours, implying other ICD-0 codes;
2. “Atypical type A thymoma” is introduced as a tentative new variant of type A thymoma with more aggressive clinical behavior and “true” tumor necrosis as the most likely histological hallmark (requiring further studies);
3. The definition of type A and AB thymoma is refined and the use of immunohistochemical markers recommended in ambiguous cases to detect immature (e.g. TdT-positive) interepithelial T cells that are, by definition, rare throughout adequately sampled type A thymomas and focally or diffusely abundant in type AB thymomas (“visual examples” are depicted in [3]);
4. Epithelial cell clustering (comprising 3 or more contiguous tumor cells) is introduced as a new histological feature of type B2 thymomas distinguishing them from B1 thymomas;
5. The distinction between type B2 and B3 thymomas is depend on a high versus low content of interepithelial TdT(+) T cells that impart a blue (in B2 case) or pink (in B3 cases) impression of the respective tumor on H&E histology;
6. The use of the term “combined thymic epithelial tumor” is discouraged and the reporting of thymoma heterogeneity suggested to follow a “Gleason-like” approach, i.e. start with the most common component and give percentages in 10% increments (e.g. type B2/B3 thymoma, 70% and 30%). By contrast, any thymic carcinoma component would imply reporting the carcinoma component first, irrespective of its proportion (e.g. thymic squamous cell carcinoma against a B3 thymoma background, 5%/95%). Whether these changes will improve interobserver reproducibility will need to be tested.

## References

1. Weissferdt A., Moran C. Micronodular thymic carcinoma with lymphoid hyperplasia: a clinicopathological and immunohistochemical study of five cases. *Mod. Pathol.* 2012; 25: 993–999.
2. Ströbel P. et al. Ströbel P., Zettl A., Shilo K. et al. Tumor genetics and survival of thymic neuroendocrine neoplasms: A multi-institutional clinicopathologic study. *Genes Chromosomes Cancer* 2014; 53: 738–749.
3. Marx A., Ströbel P., Badve S.S. et al. ITMIG consensus statement on the use of the WHO histological classification of thymoma and thymic carcinoma: refined definitions, histological criteria, and reporting. *J. Thorac. Oncol.* 2014; 9: 596–611.

## 2. WHO classification of lung tumours — what new in 2015?

**prof. Keith Kerr**

Department of Pathology, Aberdeen Royal Infirmary, Aberdeen, UK

## 3. Pierwotne nowotwory płuc i opłucnej u dzieci

**prof. Maciej Pronicki, prof. Wiesława Grajkowska**

Zakład Patologii, Instytut „Pomnik — Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie

Nowotwory płuc u dzieci występują rzadko. Z tego powodu ich nazewnictwo nie zawsze jest powszechnie jednoznacznie przyjęte, niekiedy brak jest nazewnictwa polskojęzycznego, przypadki nowotworów płuc u dzieci są wielokrotnie konsultowane, postępowanie kliniczne często jest niestandardowe, historia naturalna przebiegu wielu rozrostów nie jest poznana. W niektórych wypadkach nowotwory wymagają różnicowania klinicznego i histopatologicznego ze znacznie częstszymi malformacjami wrodzonymi oraz zmianami pochodzenia zapalnego. Do malformacji wrodzonych mogących na poziomie radiologicznym i klinicznym imitować zmiany nowotworowe płuc lub śródpiersia należą torbiele oskrzelopochodne, sekwestry płucne, oraz zaburzenia o charakterze congenitalpulmonaryadenomatoidmalformation (CPAM). Te ostatnie, w niektórych klasyfikacjach nie są jednoznacznie odróżnione od zmian nowotworowych.

Według różnych zestawień epidemiologicznych najczęstszym pierwotnym łagodnym nowotworem puc u dzieci jest miofibroblastyczny guz zapalny (Inflammatoryfibroblastic tumor, IMT). Nowotwór ten zbudowany jest z miofibroblastów, dojrzałych komórek zapalnych i skolegenizowanego podścieliska w zmiennych proporcjach. Co ciekawe, w przypadkach dziecięcych guz ten często związany jest z rearanżacją genu ALK i odpowiadającą ekspresją na poziomie białkowym. Wśród pierwotnych nowotworów złośliwych najczęstszy jest guz neuroendokryny — carcinoid. Kolejnymi co do częstości występowania są - znacznie rzadszy rak gruczołowy, rak śluzowo-naskórkowy, nowotwory mezenchymalne. Wśród dziecięcych złośliwych nowotworów mezenchymalnych na szczególną uwagę zasługuje Pleuropulmonaryblastoma (PPB). Ze względu na podobieństwo nazwy wymaga on odróżnienia od guza Pulmonaryblastoma - nowotworu występującego głównie u osób dorosłych. Pleuropulmonaryblastoma jest złośliwym nowotworem mezenchymalnym, o zmiennym różnokierunkowym różnicowaniu, bez towarzyszącego niedojrzałego komponentu nabłonkowego. Rokowanie w tych przypadkach jest zwykle niepomyślne, pięcioletnie przeżycia dotyczą poniżej połowy przypadków. Wśród zmian nowotworowych płuc u dzieci, od guzów pierwotnych częstsze są nowotwory przerzutowe. Ze względu na charakter i częstość pierwotnych nowotworów dziecięcych przerzuty do płuc najczęściej pochodzą z guzów typu rhabdomyosarcoma, osteosarcoma, nephroblastoma, guz Ewinga/PNET oraz guzów z komórek rozrodczych (germinalnych).

## Sesja II

### 1. The reality of immunotherapy for lung cancer

**prof. Tony Mok**

Department of Clinical Oncology at the Chinese University of Hong Kong in Prince of Wales Hospital in Hong Kong

### 2. Squamous lung carcinoma — 2014 and beyond

**dr Natasha Leighl**

Princess Margaret Hospital/University Health Network; Department of Medicine, University of Toronto, Canada

Squamous lung carcinoma remains a common challenge. Although outcomes in advanced squamous carcinoma are not reliably inferior to adenocarcinoma, there is clear disparity in systemic treatment advances across histologies. Standard first-line therapy includes non-pemetrexed platinum doublet therapy, second-line docetaxel and then final line erlotinib. Although not commonly used, erlotinib may be considered as maintenance after first-line chemotherapy. In pure squamous histology, the incidence of *EGFR* mutation is 5% and *ALK* rearrangement only 0.2%, thus routine molecular testing is not recommended.

But there are promising agents in development in all areas. Nab-paclitaxel with carboplatin yielded higher response rates in squamous carcinoma compared to paclitaxel/carboplatin, and is being further studied as maintenance therapy. Necitumumab, an EGFR-targeted antibody, demonstrated a 6-week improvement in survival when added gemcitabine/cisplatin first-line (HR 0.84,  $p = 0.012$ ). Ramucirumab, targeting VEGFR2, also yielded a 6-week improvement when added to docetaxel in NSCLC patients second-line, a quarter of

whom had squamous carcinoma. After chemotherapy failure, afatinib demonstrated superior progression-free survival over erlotinib, although the survival impact is unknown.

At least 67% of squamous carcinoma cases may harbour targetable genomic alterations, including in P53, PTEN/PI3K, RAS, receptor TKs FGFR and EGFR, NFE2L2, KEAP1, SOX2 and NOTCH. But the development of active targeted therapies has been challenging. FGFR TKIs have shown promise, with multiple agents demonstrating activity in *FGFR*-amplified lung carcinoma.

Immune-based therapy has also emerged as highly promising. Phased ipilimumab plus paclitaxel/carboplatin may improve outcomes, with a randomized trial ongoing. PD-1 checkpoint inhibitors have shown exciting activity with 20–30% response rates in pretreated and treatment-naïve patients, and similar activity across histologies. For example, nivolumab in pretreated squamous carcinoma patients yielded a 15% response rate and 41% one-year survival, unprecedented in this population.

While development of better treatments in squamous carcinoma has lagged behind in recent years, there is tremendous promise ahead.

### 3. Targeted therapy of lung adenocarcinoma. What's new?

**prof. Rafał Dziadziuszko**

Department of Oncology and Radiotherapy, Medical University of Gdansk

Lung adenocarcinoma is characterized by the presence of molecular abnormalities classified as examples of “oncogene addiction” or “oncogene dependence”. These abnormalities include *EGFR*, *RAS*, *HER2*, *BRAF*, and *MEK* mutations as well as *ALK*, *ROS1*, *RET* and novel *TRK* translocations. This year, a number of important clinical trials addressing the activity of specific inhibitors targeting proteins resulting from the above aberrations were presented. Second generation EGFR inhibitor afatinib was found to prolong overall survival in patients with lung adenocarcinomas harboring *EGFR* mutations as compared to chemotherapy. Third-generation, mutation specific EGFR inhibitors have been assessed in patients with acquired resistance to first or second generation EGFR inhibitors with very promising activity, particularly in the presence of the most common resistance mechanism, T790M *EGFR* mutation. ALK inhibitor crizotinib demonstrated significant activity as compared to first-line chemotherapy in a phase III clinical trial PROFILE 1014. A number of other inhibitors, including alectinib, ceritinib, and other agents, have shown promising activity and are close to clinical application in patients with tumors showing ALK translocations. Current clinical experience with ROS1 inhibitors is also expanding. Novel TRK fusion genes appear to serve as new predictors for the efficacy of specific inhibitors as demonstrated in a phase I trial. These results, taken together, suggest that oncogene addicted lung adenocarcinoma subsets of patients will be treated as different diseases in the near future and that rapid molecular characterization of these abnormalities in a comprehensive diagnostic test will be needed. Large scale efforts of molecular characterization of blood-based tumor DNA are also very promising for newly diagnosed patients and those who relapse on specific therapies. Phase III clinical trials with novel agents, nintedanib and ramucirumab, have demonstrated clinical activity in the second-line setting when combined with docetaxel.

### 4. ALK testing in clinical practice

**prof. Keith Kerr**

Department of Pathology, Aberdeen Royal Infirmary, Aberdeen, UK

### 5. Staging thymic epithelial tumors: The ITMIC/IASLC proposal

**prof. Alexander Marx**

Institute of Pathology, University Medical Centre Mannheim, Heidelberg University, Theodor-Kutzer-Ufer 1–3, Mannheim, Germany

The staging of thymomas and thymic carcinomas (TCs) has not changed significantly since Masaoka and Koga [1–3] proposed their stage I–IVb scheme. Although originally considered only for thymomas (since it was based only on the analysis of thymomas), the system has generally been used for TCs as well, while various provisional TNM schemes have largely been ignored by pathologists and clinicians alike due to minor clinical relevance. Therefore, the International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC), the International Thymic Malignancy Interest Group (ITMIG) and other organizations are jointly proposing an evidence based TNM staging system derived from a series of > 8.000 clinically annotated cases. Cumulative incidence of recurrence (CIR) and overall survival (OS) were assessed as endpoints in multivariate statistical analysis [4–6]. Subgroup analysis showed that the proposed system is applicable to thymomas as well as thymic carcinomas. Based on this dataset the following descriptors for T, N and M with prognostic relevance were derived:

T1a	Encapsulated or unencapsulated tumors with or without extension into mediastinal fat T1b
	Like T1a but with extension into mediastinal pleura
T2	Tumors involving pericardium
T3	Tumors involving lung, brachiocephalic vein, superior vena cava, chest wall, phrenic nerve, or hilar (extrapericardial) pulmonary vessels
T4	Tumors involving aorta, arch vessels, main pulmon. artery, myocardium, trachea, esophagus
N0, N1	No nodal involvement (N0); involvement of anterior (perithymic) nodes (N1)
N2	Deep intrathoracic or pericardial
M0	No metastasis
M1a	Separate pleural or pericardial nodule(s)
M1b	Pulmonary intraparenchymal or distant organ metastasis

Based on these TNM categories a 6-tiered stage grouping is proposed (I, II, IIIa, IIIb, IVa and IVb).

Of note, this scheme is a proposal (!) that still needs approval by the American Joint Committee on Cancer and the Union for International Cancer Control (AJCC/UICC) for inclusion in the 8th edition of the upcoming TNM classification system — and for approved clinical use.

## References

- Masaoka A., Monden Y., Nakahara K., Tanioka T. Follow-up study of thymomas with special reference to their clinical stages. *Cancer* 1981; 48: 2485–2493.
- Koga K., Matsuno Y., Noguchi M. et al. A review of 79 thymomas: modification of staging system and reappraisal of conventional division into invasive and non-invasive thymoma. *Pathol. Int.* 1994; 44:359–367.
- Detterbeck F.C., Nicholson A.G., Kondo K., Van Schil P., Moran C. The Masaoka-Koga stage classification for thymic malignancies: clarification and definition of terms. *J. Thorac. Oncol.* 2011; 6 (7 suppl. 3): S1710–S1796.
- Detterbeck F.C. et al 2014; 9 (9 suppl. 2): S65–S72.
- Nicholson A.G., Detterbeck F.C., Marino M. et al. The IASLC/ITMIG Thymic Epithelial Tumors Staging Project: Proposals for the T component of the forthcoming (8th) Edition of the TNM Classification of Malignant Tumors. *J. Thor. Oncol.* 2014; 9: S73–S80.
- Kondo K., Van Schil P., Detterbeck F.C. et al. The IASLC/ITMIG Thymic Epithelial Tumors Staging Project: Proposals for the N and M Components for the Forthcoming (8th) Edition of the TNM Classification of Malignant Tumors. *J. Thor. Oncol.* 2014; 9: S81–S87.

## Sesja III

### 1. Wykład inauguracyjny: A decade since discovery of EGFR mutation: where we are and where we shall be

prof. Tony Mok

Department of Clinical Oncology at the Chinese University of Hong Kong in Prince of Wales Hospital in Hong Kong

### 2. Charakterystyka i nowe metody wykrywania biomarkerów molekularnych raka płuca stosowanych w personalizowanej terapii

dr hab. Marzena Anna Lewandowska<sup>1,2</sup>, prof. Janusz Kowalewski<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Zakład Genetyki i Onkologii Molekularnej, Innowacyjne Forum Medyczne; Centrum Onkologii im. Prof. F. Łukaszczyka w Bydgoszczy

<sup>2</sup>Katedra i Klinika Chirurgii Klatki Piersiowej i Nowotworów, *Collegium Medicum* im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

<sup>3</sup>Oddział Kliniczny Chirurgii Klatki Piersiowej i Nowotworów, Centrum Onkologii im. Prof. F. Łukaszczyka w Bydgoszczy

Po 11 latach od uzyskania pełnej sekwencji genomu człowieka dalszym wyzwaniem jest dogłębne poznanie genomu raka. Latem bieżącego roku konsorcjum atlasu genomu raka (TCGA, *The Cancer Genome Atlas*) opublikowało analizy profili mutacji, rearanżacji strukturalnych, analizy zmienności liczby kopii (CNV, *copy number variation*), metylacji DNA, mRNA, miRNA i ekspresji białka 230 gruczolakoraków płuca od pacjentów wcześniej nieleczonych. Na szczególną uwagę zasługuje porównanie sekwencji kodujących tkanki prawidłowej a gruczolakorakiem od tego samego pacjenta. Sugeruje się, że poza strategią terapii ukierunkowanych na zmiany w szlaku RTK / RAS / RAF — również amplifikacja w genach *MET* i *ERBB2*, jak również mutacje *NF1* i *RIT1* mogą mieć znaczącą wartość kliniczną jako biomarkery czy cele terapeutyczne w gruczolakoraku płuca. Obecnie genetyczna analiza nabytych zmian nowotworowych obejmuje pojedyncze geny: mutacje punktowe genu *EGFR* analizowane przy użyciu PCR w czasie rzeczywistym lub enzymatycznej metody sekwencjonowania (*dideostry*) natomiast rearanżacje genu *ALK* —technika FISH, ewentualnie RT-PCR. Najnowsze trendy kierują nas na wielogenowe analizy, które nie tylko genetycznie charakteryzują komórki nowotworowe ale również nakreślają możliwości podjęcia terapii. Dostępne wysokoprępowe technologie jak spektrofotometr masowy do pracy z kwasami nukleinowymi czy sekwencjonowanie nowej generacji pozwala nam na przeprowadzenie analiz mutacji somatycznych od 26 po 400 genów i więcej. Nasze

4-letnie doświadczenie w profilach genetycznych ( stworzonych na podstawie analizy ekspresji ponad 20 tys. genów czy analiz mutacji somatycznych w 400 genach) potwierdza fakt, że określanie profilu nowotworu o znacznej wartości klinicznej wymaga nie tylko analizy szerokiego panelu genów, lecz również współgrających baz danych zarówno z lekami dostępnymi na polskim rynku, jak i z aktualizowanymi badaniami klinicznymi i doniesieniami naukowymi.

### 3. Miejsce patomorfologii w molekularnej ocenie czynników predykcyjnych w raku płuca

**prof. Włodzimierz Olszewski**

Zakład Patologii, Centrum Onkologii — Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie

Pomimo znacznego postępu, jakiego dokonano w zakresie poznania patogenezы raka płuca, jak też uwarunkowań molekularnych w tym nowotworze, ocena patomorfologiczna jest nadal podstawową, najbardziej specyficzną metodą rozpoznania raka płuca.

Rozwój terapii spersonalizowanej doprowadził do konieczności dokładnego określenia typu histologicznego nowotworu. Ponad 80% raków płuca rozpoznanych jest w stadium znacznego zaawansowania klinicznego i ustalenie rozpoznania mikroskopowego odbywa się na podstawie oceny mikroskopowej drobnych wycinków tkankowych lub materiału cytologicznego, co pociąga za sobą (w ok. 30% przypadków) konieczność stosowania barwień immunohistochemicznych w celu dokładniejszego określenia typu histologicznego nowotworu.

Dokładne określenie typu histologicznego pozwala zarówno na wybór właściwej terapii, jak i jest koniecznym do podjęcia decyzji związanych z oceną zmian molekularnych jako czynnik predykcyjny. W przypadku oceny mutacji *EGFR* istotnym jest odpowiedni wybór tkanki lub materiału cytologicznego do wykonania odpowiednich testów (liczba komórek nowotworowych i ich procent w danym materiale). W przypadku materiału cytologicznego najbardziej odpowiednimi są aspiraty cienkoigłowe zarówno z ogniska pierwotnego, jak i przerzutu.

W przypadkach oceny mutacji *ALK*, a ostatnio również *ROS1*, patomorfolog powinien uczestniczyć zrówno w wyborze materiału będącego podstawą wykonania testu, jak i w końcowej ocenie wyniku szczególnie z zastosowaniem metod FISH lub ISH.

Z uwagi na skąpą ilość materiału tkankowego lub cytologicznego, koniecznym jest stosowanie odpowiedniego algorytmu postępowania diagnostycznego, uwzględniającego wymóg stosowania technik immunohistochemicznych i testów molekularnych. Istotnym w postępowaniu diagnostycznym — obejmującym wymieniane techniki — jest też czas uzyskania pełnego rozpoznania z informacją o czynnikach predykcyjnych, dlatego też zalecana jest koncentracja wykonywania tych badań i tworzenie ośrodków referencyjnych. Ośrodki te dysponowałyby możliwością pełnej diagnostyki patomorfologicznej i ścisłą współpracą z pracownikami diagnostyki molekularnej.

### 4. Diagnostyczne i prognostyczne wykorzystanie czynników genetycznych

**prof. Paweł Krawczyk**

Katedra i Klinika Pneumonologii, Onkologii i Alergologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Pewna diagnoza raka płuca może być postawiona na podstawie wyniku badania patomorfologicznego tkanki lub komórek nowotworowych. Natomiast rokowanie w tym typie nowotworu zależy od rozpoznania typu raka płuca, stopnia jego zaawansowania oraz możliwości zastosowania terapii. Postęp w dziedzinie biologii molekularnej nie pozostaje jednak bez wpływu na możliwości diagnozowania i prognozowania raka płuca. Wykorzystanie badania czynników epigenetycznych (metylacja wolnego krążącego DNA, ocena ekspresji miRNAs) może być użyteczna w kwalifikowaniu osób z największym ryzykiem zachorowania na raka płuca do badań przesiewowych (tomografia komputerowa) i przyczynić się do zwiększenia odsetka chorych we wczesnych, operacyjnych stadiach NDRP. Podpisy molekularne oparte na analizie zjawisk epigenetycznych mogą w przyszłości być wykorzystane do wczesnej diagnostyki raka płuca, tak jak obecnie wykorzystuje się je w diagnostyce raka jelita grubego i odbytnicy. Analiza czynników epigenetycznych oraz ekspresji wielu genów (ekspresja mRNA w komórkach nowotworowych badana w technologii mikromacierzy) stanowi cenne, chociaż dość kosztowne, narzędzie umożliwiające precyzyjne rokowanie u chorych operowanych z powodu NDRP. Badania genetyczne DNA komórek nowotworowych umożliwiły także wykrycie wielu czynników predykcyjnych, niezbędnych we właściwej kwalifikacji chorych do leczenia ukierunkowanego molekularnie, przez co znacząco poprawiła się jakość i długość życia chorych w zaawansowanym stadium nowotworu. Ostatnie doniesienia naukowe podkreślają, że nadchodzi era badań genetycznych wykonywanych w materiale z „płynnej biopsji” — era analizy DNA i komórek nowotworowych krążących we krwi obwodowej. Ten materiał może być użyteczny w badaniach profilaktycznych, bezinwazyjnej diagnostyce, prognozowaniu przebiegu choroby niezależnie od zastosowanego leczenia oraz monitorowaniu skuteczności chemioterapii i terapii ukierunkowanej molekularnie. Wymaga jednak zastosowania niezmiernie czułych technik biologii molekularnej, między innymi platform *next generation sequencing* czy metody BEAMing (*beads, emulsion, amplification, magnetics*).

### 5. Molecular profile based decisions in precision oncology

**prof. Istvan Petak**

Oncompass Health Information Systems and KPS Diagnostics

The NCCN (National Comprehensive Cancer Network) guidelines version 1.2014 recommends multiplex/next-generation sequencing besides single gene tests in the management of advanced non-small cell lung cancer patients. Several leading oncology centers (Dana-Farber Cancer Center, Mayo Clinic, MDAnderson Cancer Center, Goussave-Roussy Institute etc.) have introduced 50–500 genes tests as part of the routine diagnostic triage of solid tumors. Our aim was to develop a molecular and clinical interpretation system, which can help the treating oncologist to increase the clinical relevance of these tests. We have linked 35-targeted drugs in clinical use

and 200 compounds currently in clinical trials to genetic alterations in 58 cancer genes. Next-generation sequencing was used to detect point mutations and small indels in 300 amplicons of these 58 genes. In addition, fluorescent in-situ hybridisation was used to detect copy number variations and translocations in selected genes. 82 non-small cell carcinomas were analyzed. Driver gene mutations were detected in 68 cases (81.7%). The most frequently mutated genes were *TP53* (39.6%), *KRAS* (12.6%), *PIK3CA* (6.3%), *EGFR* (5.4%), *JAK3* (5.4%), *ALK* (translocation) (5.1%), *MET* (amplification) (3.7%), *EGFR* (amplification) (11.1%), *FGFR1* (amplification) (4.5%). Based on these results these NSCLC cases can be divided into three major groups: EGFR mutant tumors (5%) associated with sensitivity to EGFR inhibitors, EGFR amplified and *super wild type* tumors without any driver gene mutations associated with primary resistance to EGFR inhibitors (57%), and tumors with alternative driver gene mutations (38%). Overall, we found clinically relevant information about drugs in clinical use in 70% of cases, and drugs in clinical trials in positive association with the molecular profile, which also matched the patient clinical profile 80% of cases. Non-small cell lung cancer is one of the most promising cancer types where precision medicine can be pioneered in clinical practice with the help of molecular diagnostics and bioinformatics.

## Sesja IV

### 1. Inhibitory kinaz tyrozynowych w leczeniu niedrobnokomórkowego raka płuca — co? komu? gdzie? kiedy?

dr hab. Dariusz M. Kowalski

Klinika Nowotworów Płuca i Klatki Piersiowej, Centrum Onkologii — Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie

Leczenie ukierunkowane molekularnie nie drobnokomórkowego raka płuca (NDRP) obejmuje zastosowanie przeciwciał monoklonalnych, inhibitorów kinazy tyrozynowej receptora naskórkowego czynnika wzrostu (TKI EGFR) oraz wielokinazowych inhibitorów neoangiogenezy.

Pierwsze badania dotyczące dodania TKI EGFR (gefitynib, erlotynib) dodanych do standardowej chemioterapii I linii (INTACT 1, INTACT 2, TALENT, TRIBUTE) zakończyły się niepowodzeniem. Badania III fazy z losowym doбором chorych oraz opublikowane metaanalizy porównujące zastosowanie TKI wobec konwencjonalnej chemioterapii w populacji niedobranej molekularnie nie wykazują różnic pomiędzy obiema metodami leczenia. Zidentyfikowano czynnik odpowiedzi (predykcyjny) wobec TKI. Są nim mutacje aktywujące w genie kodującym receptor EGFR. Częstość ich występowania oceniana jest w populacji kaukaskiej na 10–15%, a w populacjach azjatyckich na 30–45%. Częstość występowania mutacji w genie EGFR jest też determinowana przez inne czynniki kliniczno-patologiczne: rozpoznanie histopatologiczne, płeć i status palenia nikotyny. Zastosowanie TKI w I linii leczenia u chorych z mutacją aktywującą EGFR (najczęściej delecja w eksonie 19. lub substytucja w eksonie 21.) wobec klasycznej chemioterapii skutkuje wyższym odsetkiem odpowiedzi terapeutycznych (RR), poprawą jakości życia (QoL) i wydłużeniem czasu wolnego od progresji (PFS). Do niedawna nie wykazywano różnicy w medianie przeżycia całkowitego (OS) pod warunkiem prawidłowego leczenia chorego po progresji choroby (PD). Na podstawie dodatkowej analizy badań LUX-LUNG 3 i LUX-LUNG 6 po raz pierwszy wykazano różnicę w OS w grupie chorych leczonych afatynibem (nieodwracalny TKI) z obecną mutacją aktywującą EGFR definiowaną obecnością delecji w eksonie 19. Wpływu takiego nie wykazano dla mutacji w obrębie eksonu 21. Zastosowanie TKI w II linii leczenia nie jest już tak twardo udokumentowane. Większość badań to badania II fazy, analizy retrospektywne lub nieplanowane uprzednio analizy badań III fazy. Obecnie rekomendowane jest stosowanie TKI w przypadku PD po chemioterapii I linii u chorych z mutacją aktywującą EGFR, oczywiście jeżeli nie stosowano uprzednio takiego leczenia. Stosowanie TKI w leczeniu NDRP wiąże się również z koniecznością oceny i leczenia nowego rodzaju powikłań (najczęściej zmiany skórne i biegunka).

### 2. Inhibitor kinazy tyrozynowej EGFR w leczeniu I linii niedrobnokomórkowego raka płuca — problemy diagnostyki patologicznej na podstawie opisu przypadku

lek. Magdalena Knetki-Wróblewska

### 3. Komentarz patologa

prof. Renata Langfort

### 4. Inhibitor kinazy tyrozynowej w II linii leczenia niedrobnokomórkowego raka płuca — problemy diagnostyki molekularnej na podstawie opisu przypadku

lek. Kinga Winiarczyk



## 5. Komentarz biologa molekularnego

# Dynamika rozwoju diagnostyki mutacji genu *EGFR* w materiałach pochodzących od chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca w latach 2011–2014 w Polsce — wyniki badania ankietowego

prof. Joanna Chorostowska-Wynimko<sup>1</sup>, prof. Paweł Krawczyk<sup>2, 3</sup>, Bartosz Wasąg<sup>4</sup>, Iwona K. Rzepecka<sup>5</sup>, Piotr Wójcik<sup>6</sup>, Karolina Tęcza<sup>7</sup>, Paulina Jaguś<sup>1</sup>, Tomasz Powróżek<sup>2, 3</sup>, Bożena Konopka<sup>5</sup>, Agata Giżycka<sup>1</sup>, Kamila Wojas-Krawczyk<sup>2, 3</sup>, prof. Janusz Limon<sup>4</sup>, Barbara Pieńkowska-Grela<sup>5</sup>, Piotr Pierzchalski<sup>6</sup>, Piotr Widlak<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Zakład Genetyki i Immunologii Klinicznej Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie

<sup>2</sup>Pracownia Immunologii i Genetyki Katedry i Kliniki Pneumologii, Onkologii i Alergologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

<sup>3</sup>Instytut Genetyki i Immunologii Genim Sp. z o.o. w Lublinie

<sup>4</sup>Katedra i Zakład Biologii i Genetyki Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

<sup>5</sup>Pracownia Genetyki Nowotworów, Centrum Onkologii — Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie

<sup>6</sup>Oncogene Diagnostics Sp. z o.o w Krakowie

<sup>7</sup>Centrum Badań Translacyjnych i Biologii Molekularnej Nowotworów, Centrum Onkologii — Instytutu w Gliwicach

Wprowadzenie terapii ukierunkowanych molekularnie do leczenia niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP) zaowocowało włączeniem badań genetycznych do rutynowego postępowania klinicznego u tych chorych. W efekcie w ostatnich latach obserwuje się gwałtowny wzrost liczby testów diagnostycznych, zwłaszcza w poszukiwaniu mutacji genu *EGFR*, wykonywanych przez laboratoria genetyczne. Niniejsze badanie ankietowe objęło sześć polskich laboratoriów rutynowo, co najmniej od roku 2011, wykonujących diagnostykę mutacji genu *EGFR* w materiale biologicznym pochodzącym od chorych na NDRP. Celem badania była ocena aspektów metodologiczno-organizacyjnych diagnostyki mutacji genu *EGFR* w Polsce.

We wszystkich badanych ośrodkach podstawową techniką diagnostyczną jest metoda *real-time PCR*, w pięciu laboratoriach oparta na systemie cobas. Dwa ośrodki korzystają również z innych metod diagnostycznych wykorzystujących reakcję *real-time PCR* (metoda podstawowa lub alternatywna) oraz bezpośrednie sekwencjonowanie (metoda alternatywna w obu ośrodkach). W 2011 roku wykonano 293 oznaczeń mutacji genu *EGFR* (wynik dodatni 6,8%), w 2012 — 915 (9,6%), w 2013 — 1769 (9,6%), pierwszym półroczu 2014 — 2044 (8,9%). W okresie 2012–czerwiec 2014 wykryto 345 mutacji aktywujących genu *EGFR* zlokalizowanych w eksonie 18. — 4%, eksonie 19. — 57,4%, eksonie 21. — 38,6%. We wszystkich ośrodkach testy molekularne poprzedza ocena patomorfologiczna materiałów. Odsetek materiałów kierowanych do diagnostyki z potwierdzonym rozpoznaniem gruczolowego raka płuca wzrósł z 79% w 2012 do 93,2% w 2014 roku, podczas gdy z rozpoznaniem NDRP NOS (*not otherwise specified*) zmniejszył się odpowiednio z 14,6% do 4,8%. W połowie laboratoriów badania wykonywane są co najmniej 3 razy w tygodniu, w pozostałych co 7 dni lub rzadziej. Wynik analizy mutacji genu *EGFR* wydawany jest w ciągu 48 godzin od wpłynięcia materiału do laboratorium — 1 ośrodek, 3–5 dni — 3 ośrodki, 6–7 dni — 1 ośrodek, powyżej 8 dni — 1 ośrodek. Według deklaracji ośrodków materiały do badań kierowane są w 65% przez onkologów, 14% patomorfologów, 14% torakochirurgów oraz 7% pulmonologów (dane z 5 ośrodków). Należy podkreślić, że wszystkie ankietowane laboratoria biorą udział w międzynarodowym programie kontroli jakości, w tym 30% ośrodków w więcej niż w jednym.

W latach 2011–2014 w ankietowanych ośrodkach znacząco wzrosła liczba wykonywanych badań mutacji genu *EGFR* u chorych na NDRP. Zarówno metodologia, jak i czas realizacji testów diagnostycznych w pełni odpowiadają obowiązującym zaleceniom polskim i międzynarodowym.

## Sesja V

### 1. Leczenie chirurgiczne

prof. Tadeusz M. Orłowski, Piotr Rudziński

Klinika Chirurgii Instytutu Gruźlicy i Chorób Płuc, Warszawa

Celem pracy było przeanalizowanie i przedstawienie wyników leczenia operacyjnego i powikłań pooperacyjnych u chorych z rakiem płuca po 70. roku życia.

Przeanalizowano grupę 190 osób (72 kobiety 118 mężczyzn) powyżej 70. roku życia tj. 8,0% wszystkich operowanych. Średnia wieku wynosiła 72,3 roku. W omawianej grupie chorych wykonano 124 lobektomie (65,3%), 47 pneumonektomii (24,7%) i 19 resekcji brzeźnych (10%). Najczęstszą przyczyną operacji był rak płaskonabłonkowy w 95 przypadkach (50%) i rak gruczolowy w 79 przypadkach (41,6%). I stadium zaawansowania stwierdzono w 138 przypadkach (72,6%), II stadium zaawansowania w 21 przypadkach (11,1%), stadium III A u 31 chorych (16,3%).

W omawianej grupie zwraca uwagę duży odsetek chorych operowanych w I stadium zaawansowania — 72,6% w porównaniu z wszystkimi operowanymi chorymi — 43,5%. Również stwierdzono w omawianej grupie większy odsetek wykonanych resekcji brzeźnych niż w wszystkich chorych 1,0%. Śmiertelność we wczesnym okresie pooperacyjnym wyniosła 4,7% (9/190). Jest to prawie 3 razy więcej niż

w całej grupie chorych leczonych z powodu raka płuca 1,8% (43/2372). Z innych powikłań pooperacyjnych w omawianej grupie chorych stwierdzono zaburzenia rytmu serca w 32,6% (62/190 chorych), niewydolność oddechową wymagającą stosowania respiratora w 6,8% (13/190), przedłużający się przeciek powietrza (powyżej 6 dni) w 13,7% (26/143) niecałkowicie rozprężone płuco w 8,4% (12/143).

Na podstawie przeprowadzonej analizy stwierdzono, że podeszły wiek nie stanowi przeciwwskazania do leczenia operacyjnego, aczkolwiek istnieje wyższe ryzyko powikłań pooperacyjnych w tej grupie.

## 2. Radiochirurgia SABR w leczeniu radykalnym raka płuca

**prof. Sergiusz Nawrocki**

Katedra Onkologii i Radioterapii, Śląski Uniwersytet Medyczny

Radiochirurgia stosowana w przypadku radykalnego leczenia niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP) umożliwia uzyskanie wysokiego prawdopodobieństwa miejscowej kontroli porównywalnego do skuteczności lobektomii. Jest to możliwe dzięki zastosowaniu hipofrakcjonowania (podawanie całej dawki promieniowania w kilku wysokich dawkach frakcyjnych), nowoczesnych technik obrazowania (4D TK i bramkowanie oddechowe) oraz nowoczesnych technik modulowania kształtu i intensywności dawki (IMRT, łukowe techniki dynamiczne). W celu odróżnienia radiochirurgii od klasycznej radioterapii stworzono termin SABR (*Stereotactic Ablative Body Radio-surgery*), w którym ten rodzaj radioterapii określono jako ablację, podkreślając, że efekt radiochirurgii jest podobny jak w przypadku innych technologii ablacji, tzn. dochodzi do skutecznego i trwałego zniszczenia tkanki guza.

Ablacyjny efekt wysokich dawek promieniowania najprawdopodobniej polega obok śmierci mitotycznej komórek nowotworowych również na zniszczeniu mikrośrodowiska guza (m.in. uszkodzenie śródbłonek naczyń). SABR w przypadku raka płuca umożliwia obecnie radykalne leczenie chorych w stopniu I (T1–2, N0) z przeciwwskazaniami do lobektomii lub pacjentów, którzy nie zgadzają się na leczenie chirurgiczne. SABR jest również dobrą opcją leczenia dla chorych starszych, z małą rezerwą czynnościową płuc lub w przypadku chorych z nowotworami synchronicznymi lub metachronicznymi. SABR rozszerza w istotny sposób możliwości leczenia radykalnego NDRP. Decyzję o SABR powinien każdorazowo podejmować pacjent po przedstawieniu mu tej opcji przez doświadczony zespół wielospecjalistyczny (pulmonolog, torakochirurg, radioterapeuta).

## 3. Radioterapia i radiochemioterapia

**prof. Rafał Suwiński**

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

Wśród chorych na zaawansowanego miejscowo niedrobnokomórkowego raka płuca osoby w wieku podeszłym (po 70. rż.) stanowią ponad 60% populacji. Odsetek chorych w wieku podeszłym włączanych do badań klinicznych dotyczących radioterapii lub radiochemioterapii raka płuca jest zarazem znacząco niższy, co odzwierciedla rygorystyczne kryteria włączenia. Tym samym wyniki większości badań prospektywnych dotyczących zaawansowanego miejscowo raka płuca nie mają bezpośredniego odniesienia do ogółu chorych w wieku podeszłym. Badania o niższej jakości (głównie prace retrospektywne) wskazują, że zaawansowany wiek jest negatywnym czynnikiem prognostycznym zarówno w odniesieniu do tolerancji jak i skuteczności intensywnego leczenia miejscowego. Z tego powodu wielu autorów uważa, że większość chorych w wieku zaawansowanym nie odnosi korzyści z jednoczasowej radio-chemioterapii i powinna być leczona w sposób sekwencyjny (indukcyjna chemioterapia–radioterapia) lub z zastosowaniem samodzielnej radioterapii. Jednocześnie, skale pozwalające na ocenę obciążeń związanych ze schorzeniami współistniejącymi (np. skala Collineta) umożliwiają identyfikację stosunkowo wąskiej podgrupy chorych w wieku zaawansowanym mogącej odnieść zysk z leczenia jednoczasowego. Autorzy prac przeglądowych zalecają wprowadzenie takich skal do rutynowej praktyki klinicznej. Na ich podstawie schemat leczenia może być dobrany indywidualnie.

## 4. Chemioterapia

**prof. Rodryg Ramlau**

Katedra i Klinika Onkologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Według danych Głównego Urzędu Statystycznego z 2013 roku 18,4% ogółu społeczeństwa w Polsce to osoby w wieku poprodukcyjnym, czyli niemal co piąty Polak (kobiety 60+, mężczyźni 65+).

Rak to choroba głównie ludzi starszych, a najczęstszym nowotworem złośliwym jest rak płuca, który powoduje około 30% zgonów wśród mężczyzn po 60. roku życia.

W Polsce, podobnie jak w innych krajach Europy, szczyt zachorowań na raka płuca występuje u chorych w wieku 60–70 lat. Oszacowano, że jedna osoba na osiem, która w wieku 35 lat wypalała co najmniej 25 papierosów na dobę umrze przed 75. rokiem życia z powodu raka płuca. Pięcioletni czas przeżycia chorych na raka płuca od momentu rozpoznania jest zatrważająco niski i nie przekracza 10% wśród mężczyzn i 15% wśród kobiet.

Najczęstszym nowotworem złośliwym płuca, również u chorych w podeszłym wieku, jest niedrobnokomórkowy rak płuca (NDRP), który stanowi ponad 80% rozpoznań histologicznych.

Przed kwalifikacją chorych w starszym wieku do leczenia onkologicznego należy uwzględnić tzw. całościową ocenę geriatryczną, która w sposób zasadniczy pozwala ustalić zasady postępowania i możliwości terapeutyczne.

Leczenie systemowe chorych w podeszłym wieku przy zastosowaniu chemioterapii dwulekowej, która jest obowiązującym standardem postępowania, napotyka niejednokrotnie na zasadnicze ograniczenia. Wynikają one głównie z chorób współistniejących oraz złego stanu ogólnego. Alternatywą jest zastosowanie monoterapii, najczęściej winorelbiny stosowanej dożylnie lub doustnie. Przeprowadzone badania kliniczne potwierdziły skuteczność chemioterapii poprzez wydłużenie mediany czasu przeżycia całkowitego oraz poprawę jakości życia.

Ocena toksyczności i skuteczności leczenia w ramach pierwszej linii decyduje o możliwościach dalszego postępowania. Dobór cytostatyku jako monoterapii w leczeniu drugiej linii powinien uwzględniać typ histologiczny nowotworu.

## 5. Leczenie ukierunkowane molekularnie

**dr hab. Dariusz M. Kowalski**

Klinika Nowotworów Płuca i Klatki Piersiowej, Centrum Onkologii — Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie

Jedynym lekiem z grupy ukierunkowanych molekularnie leków posiadającym rejestrację w leczeniu nie drobnokomórkowego raka płuca (NDRP) w połączeniu z chemioterapią jest bewacyzumabbędący przeciwciałem monoklonalnym skierowanym przeciwko czynnikowi wzrostu śródbłonna (VEGF, vascular endothelial growth factor). W badaniu ECOG 4599 chorych  $\geq 70$  lat stanowili 26% ( $n=224$ ). W prezentowanej analizie nie wykazano korzyści z dodania bewacyzumabu do chemioterapii. Odnotowano wyższy odsetek powikłań  $\geq 3$  stopnia w grupie z bewacyzumabem. Niezależnie od wieku chorego w chwili obecnej zastosowanie chemioterapii z udziałem bewacyzumabu ze względu na duże ryzyko powikłań istotnie małą korzyść nie powinno być elementem rutynowej praktyki klinicznej.

W badaniu rejestracyjnym dotyczącym erlotynibu analiza podgrupy chorych  $> 70$ . roku życia ( $n=163$ ) nie wykazała różnic w medianach przeżycia całkowitego (6,4 wobec 7,6 miesiąca), czasu do progresji i współczynnika odpowiedzi wobec chorych młodszych. Odnotowano zniżenie częstotliwości powikłań  $\geq 3$ . stopnia w grupie chorych starszych (35% wobec 18%).

W badaniu z zastosowaniem gefitynibu obecność mutacji aktywującej EGFR była niezależnym czynnikiem prognostycznym wobec płci, statusu palenia czy typu histologicznego. Nie wykazano różnic również w grupie chorych z mutacją aktywującą wobec wieku (poniżej i powyżej 65 lat;  $p=0,641$ ).

## Sesja VI

### 1. Wymagania dotyczące oceny patomorfologicznej materiału do badań molekularnych

**prof. Renata Langfort**

Zakład Patomorfologii, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie

Wprowadzone nowe metody leczenia chorych z zaawansowanym rakiem niedrobnokomórkowym płuca (NDRP), tzw. ukierunkowane molekularnie, wpłynęły na konieczność odpowiedniego sposobu postępowania z materiałem histologicznym i cytologicznym. Przede wszystkim, poza stwierdzeniem w badanym materiale obecności komórek nowotworowych, ustaleniem typu raka — drobnokomórkowy vs. nie drobnokomórkowy — istotne jest określenie podtypu NDRP, a także tego, czy rak wykazuje różnicowanie gruczołowe (RGP), czy płaskonabłonkowe (RPP). W sytuacji gdy na podstawie standardowego barwienia hematoxylina + eozyna (H+E) nie można określić podtypu NDRP, konieczne jest wykonanie barwień histochemicznych (na obecność śluzu w komórkach raka) i/lub immunohistochemicznych (IHC). Wskazane jest oznaczenie ekspresji co najmniej dwóch markerów: TTF-1 i p63 lub p40. Dodatnia reakcja przeciwciałem anti-TTF-1 wskazuje na różnicowanie gruczołowe raka, natomiast z przeciwciałem p63 bądź p40 przemawia za różnicowaniem płaskonabłonkowym raka. Podobne postępowanie dotyczy rozmazów cytologicznych, które powinny być uzupełnione wykonaniem tzw. cytobłoków, czyli zawiesziny komórkowej uzyskanej z nakłucia, która jest utrwalana podobnie jak materiał tkankowy. Cytobłoki pozwalają na wykonanie większej liczby barwień, jak również są korzystniejsze do oceny występowania mutacji.

W przypadkach, w których morfologia nowotworu oraz wykonane reakcje histo- i IHC nie pozwalają na określenie podtypu NDRP, rak jest nazywany NDRP-NOS (not otherwise specified). Przypadki rozpoznane jako RGP, NDRP o morfologii i immunofenotypie RGP (TTF-1 dodatnie) oraz NDRP-NOS należy kierować do dalszych badań genetycznych, w kierunku oceny występowania mutacji genu EGFR i ewentualnej rearanżacji genu ALK. W tym celu konieczny jest wybór diagnostycznego preparatu histologicznego lub cytologicznego, z określeniem procentowego udziału komórek nowotworowych w badanym materiale. W przypadku rozmazów cytologicznych niezbędne jest oznaczenie na szkiełku grup komórek nowotworowych.

Decyzję o wykonaniu badania genetycznego u chorego na NDRP na ogół podejmuje lekarz onkolog lub pulmonolog na podstawie indywidualnej oceny stanu chorego oraz stopnia zaawansowania klinicznego nowotworu. W przypadkach, w których patomorfolog posiada informacje kliniczne wskazujące na nieoperacyjność raka, może również przekazać materiał do dalszych badań molekularnych.

Informacja o rozpoznaniu typu i podtypu raka, o wykonanych barwieniach i reakcjach IHC z ich interpretacją oraz o przekazaniu materiału do pracowni badań molekularnych powinna się znaleźć w wyniku badania histopatologicznego. Na wynik badania histopatologicznego, zwłaszcza reakcji IHC, jak również badania genetycznego wpływ ma stosowany utrwalacz oraz czas utrwalania. Zalecanym utrwalaczem dla materiałów tkankowych jest 10-procentowy roztwór zbuforowanej formaliny. Czas utrwalania małych wycinków nie powinien być krótszy niż 6 godzin i dłuższy niż 48 godz. Materiały cytologiczne, zwłaszcza utrwalone w postaci cytobłoków lub jako rozmaz na szkiełku podstawowym, nadają się zarówno do badań IHC, jak i do analizy mutacji genu EGFR oraz rearanżacji genu ALK. Rozmazy cytologiczne powinny być utrwalone w co najmniej 70-procentowym roztworze alkoholu etylowego, natomiast materiał przeznaczony do sporządzenia cytobłoku należy utrwalać jak małe wycinki tkankowe — w 10-procentowym zbuforowanym roztworze formaliny lub w gotowych mediach, sporządzonych zmieszaniem alkoholu.

Ze względu na unikalność materiału histologicznego, zwłaszcza drobnych wycinków bronchofiberoskopowych lub cytobłoków, niezwykle ważne jest odpowiednie dysponowanie materiałem, który jest wykorzystywany do wykonania standardowego barwienia H+E, ewentualnych barwień histochemicznych i IHC oraz do dalszych badań molekularnych. W związku z tym wskazane jest przygotowanie

seryjnie skrojonych kliku preparatów (ok. 8) z bloczków parafinowych lub cytobloków, zwłaszcza w przypadkach zaawansowanych, nieoperacyjnych NDRP, rozpoznanych jako RGP, NDPR najprawdopodobniej RGP i NDRP-NOS.

Przedstawiony algorytm postępowania, wymagający bardzo przemyślanego dysponowania materiałem histologicznym i cytologicznym, wymaga ścisłej współpracy pomiędzy patomorfologiem a klinicystą (pulmonologiem, onkologiem, torakochirurgiem) i biologiem molekularnym. W tym celu korzystne jest tworzenie zespołów diagnostycznych, w których informacje dotyczące zaawansowania nowotworu, przeszłości onkologicznej chorego, planowanego dalszego leczenia, byłyby pomocne w ustaleniu rozpoznania histopatologicznego i jak najszybszym przekazaniu [materiału?] do badań molekularnych.

## 2. Wymagania dotyczące badania mutacji genu *EGFR*

**prof. Joanna Chorostowska-Wynimko**

Zakład Genetyki i Immunologii Klinicznej, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie

Poszerzenie kanonu leczenia niedrobnokomórkowego raka płuca o leki ukierunkowane molekularnie stało się bezpośrednim powodem włączenia badań mutacji genu *EGFR* do rutynowej diagnostyki klinicznej. Liczba testów molekularnych wykonywanych z tego powodu w Polsce gwałtownie wrasta. Konieczne jest więc zapewnienie nie tylko szybkiego dostępu do tego typu diagnostyki, ale również jej adekwatnej jakości zapewniającej rzetelność wyników przekazywanych klinicyście z laboratorium genetycznego. W 2014 roku grupa ekspertów Polskiego Towarzystwa Chorób Płuc, Polskiego Towarzystwa Onkologicznego, Polskiego Towarzystwa Onkologii Klinicznej, Polskiego Towarzystwa Patologów, Polskiego Towarzystwa Genetyki Człowieka we współpracy z Krajową Izbą Diagnostów Laboratoryjnych przygotowała dokument stanowiący kompendium kluczowych zaleceń metodycznych dotyczących oceny mutacji genu *EGFR* w materiałach pochodzących od chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca.

Zaleca się, aby diagnostykę wykonywać po indywidualnej ocenie stanu chorego i wskazań klinicznych do leczenia inhibitorami kinazy tyrozynowej *EGFR* (TKI-*EGFR*) u chorych z guzem o utkaniu innym niż płaskonabłonkowe niezależnie od stopnia zróżnicowania histologicznego, pochodzenia materiału z guza pierwotnego lub przerzutu. Wybór reprezentatywnego materiału do oznaczenia mutacji genu *EGFR* powinien być dokonywany przez patomorfologa. Diagnostyki może być prowadzona zarówno w oparciu o materiał tkankowy, jak i cytologiczny. Konieczne jest jednak dokonanie oceny ilości i jakości wyizolowanego DNA. Ośrodkiem diagnostycznym zaleca się stosowanie metod wysoko swoistych, o czułości pozwalającej na wiarygodną analizę materiałów zawierających co najmniej 10% komórek nowotworowych, a więc zwłaszcza technik opartych na reakcji PCR, w tym przede wszystkim *real-time PCR*. Rekomenduje się, aby diagnostykę molekularną genu *EGFR* prowadziły wyłącznie laboratoria dysponujące odpowiednim sprzętem, doświadczonym personelem, uczestniczące w międzynarodowych programach kontroli jakości.

## 3. Wymagania dotyczące oceny rearanżacji genu *ALK*

**prof. Paweł Krawczyk**

Katedra i Klinika Pneumonologii, Onkologii i Alergologii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Badanie rearanżacji genu *ALK* jest, drugim po badaniu mutacji w genie *EGFR*, testem molekularnym wykonywanym u chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP) w celu ich kwalifikacji do terapii ukierunkowanych molekularnie. Kryzotynib został zarejestrowany w krajach Unii Europejskiej (UE) u chorych z rearanżacją w genie *ALK* do terapii II linii, a ceritynib uzyskał rejestrację w Stanach Zjednoczonych u chorych po niepowodzeniu terapii kryzotynibem. Niestety w Polsce terapie za pomocą inhibitorów kinazy tyrozynowej (IKT) *ALK* nie są refundowane. Mimo to, dostosowując polskie rekomendacje dotyczące badań molekularnych wykonywanych u chorych na NDRP do zaleceń obowiązujących w UE, zawarto w nich opis metod i zasad prowadzenia diagnostyki rearanżacji genu *ALK*. Uznano, że badanie rearanżacji genu *ALK* wykonane u chorych na raka gruczołowego płuca jest podstawą w kwalifikacji do terapii IKT *ALK*.

Zalecono wykorzystanie badania immunohistochemicznego (IHC), wykrywającego obecność białka fuzyjnego EML4-*ALK* w komórkach nowotworowych, do przesiewowej analizy obecności rearanżacji genu *ALK*. Dodatnia reakcja IHC powinna być zweryfikowana za pomocą metody fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH). Badanie rearanżacji genu *ALK* może być przeprowadzone w materiale histologicznym lub cytologicznym odpowiednio utrwalonym i przechowywanym w postaci bloczków parafinowych. Nie ma możliwości badania rearanżacji genu *ALK* w materiale cytologicznym wybarwionym wcześniej w celu oceny patomorfologicznej typu NDRP (H+E lub IHC). Materiał powinien być kwalifikowany do badania rearanżacji genu *ALK* (IHC i FISH) przez patomorfologa, który ocenia zawartość i lokalizację komórek nowotworowych. Badanie FISH może być wykonywane przez diagnostów laboratoryjnych ze specjalizacją z laboratoryjnej genetyki medycznej. Do badania rearanżacji genu *ALK* należy wykorzystywać testy z certyfikatem CE-IVD. Laboratoria genetyczne powinny spełniać wymogi Ustawy o Diagnostyce Laboratoryjnej oraz poddawać się regularnym zewnętrznym badaniom jakości wykonywanych badań genetycznych.

## Sesja VII

### 1. Leczenie przerzutów do kości

**dr hab. Dariusz M. Kowalski**

Klinika Nowotworów Płuca i Klatki Piersiowej, Centrum Onkologii — Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie

Morfologicznie przerzuty do kości dzieli się na zmiany osteolityczne, osteoblastyczne i mieszane. W onkologii klinicznej bardzo często używa się pojęcia tak zwanych zdarzeń kostnych (SRE, *skeletal related events*) oznaczające pojawienie się złamań patologicznych, zespołu ucisku rdzenia kręgowego, konieczności zastosowania paliatywnej radioterapii, chirurgii, a także hiperkalcemii. Pojawienie się SRE w przebiegu choroby nowotworowej skutkuje skróceniem całkowitego czasu przeżycia, a przede wszystkim pogorszeniem jakości życia chorego.

Leczenie przerzutów do kości zależy od wielu czynników, a przede wszystkim od ich lokalizacji, stanu ogólnego chorego, patofizjologii przerzutów i towarzyszących objawów klinicznych. W przypadku złamania patologicznego podstawową metodą jest leczenie chirurgiczne. W przypadku zmian o różnym charakterze morfologicznym (szczególnie osteolitycznych) postępowaniem z wyboru jest radioterapia hipofrakcjonowana. Zastosowanie paliatywnej radioterapii skutkuje zniesieniem dolegliwości bólowych u prawie 70–80% chorych.

W zapobieganiu SRE znajdują zastosowanie bisfosfoniany, a w szczególności kwas zoledronowy oraz przeciwciało monoklonalne — denosumab. W każdym przypadku stwierdzenia przerzutów do kości obowiązuje prawidłowe leczenie przeciwbólowe.

### 2. Żywnienie

**dr Aleksandra Kapała**

### 3. Leczenie przeciwwymiotne

**dr Adam Płużański**

### 4. Leczenie przeciwwzakrzepowe

**prof. Witold Tomkowski**

### 5. Leczenie bólu nowotworowego

**dr Aleksandra Ciałkowska-Rysz**

Pracownia Medycyny Paliatywnej Katedra Onkologii Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Bólem nowotworowym nazywamy każdy ból u pacjenta chorego na nowotwór. Najczęstszą jego przyczyną jest rozwoju procesu nowotworowego i związanego z nim uszkodzenia tkanek, a w szczególności tkanki nerwowej. Bólem nowotworowym jest także ból będący następstwem leczenia onkologicznego: np. ból po torakotomii lub mastektomii, radioterapii (parestezje) lub chemioterapii (neuropatia obwodowa oraz bóle wynikające z innych schorzeń, np. zmiany zwyrodnieniowe w układzie kostnym).

U około 90% chorych ból nowotworowy można skutecznie leczyć, stosując jedynie farmakoterapię. Leczenie bólu nowotworowego oparte jest na zasadach opracowanych przez WHO oraz zaleceniach towarzystw naukowych. Zgodnie z nimi w terapii bólu stosuje się leki w regularnych odstępach czasu, podawane najdogodniejszą dla chorego drogą, konieczne jest monitorowanie skuteczności oraz profilaktyka objawów ubocznych. Wybór leku oparty jest na „trójstopniowej drabinie analgetycznej”. Lek pierwszego stopnia: paracetamol i niesterydowe leki przeciwzapalne określane są mianem analgetyki nieopiodowe. Są zalecane, gdy ból na słabe natężenie i jeśli nie ma przeciwwskazań wynikających z objawów niepożądanych. Na drugim stopniu drabiny analgetycznej znajdują się słabe opioidy (tramadol, kodeina, dihydrokodeina) lub niskie dawki silnych opioidów. W przypadku bólu o natężeniu umiarkowanym do silnego zalecane są silne opioidy. Lekami pierwszego wyboru są morfina, oksykodon podane doustnie, najlepiej w formie tabletek o kontrolowanym uwalnianiu. Alternatywnie, w przypadku stabilnego bólu, można zastosować buprenorfinę lub fentanyl w plastrze. Metadon zaleca się stosować przez doświadczonych specjalistów. Petydyna i pentazocyna w bólu nowotworowym są przeciwwskazane. W przypadku bólów przebijających chory powinien otrzymać dodatkowe dawki analgetyków krótkodziałających. Do każdej grupy leków podstawowych można w zależności od potrzeb dołączyć leki adjuwantowe. W przypadku podejrzenia neuropatycznego lub mieszanego charakteru bólu, w celu zwiększenia skuteczności terapii do leków opioidowych dołącza się koanalgetyki. Zgodnie z ostatnimi zaleceniami są to gabapentyna lub pregabalina. Przy wyborze leku oraz drogi podania uwzględnić należy sytuacje szczególne związane ze stanem klinicznym pacjenta (wiek podeszły, zaburzenia połykania, zaburzenia świadomości, zespoły uciskowe, niewydolność nerek lub wątroby, wyniszczenie). Terapia bólu powinna być zindywidualizowana.

## Sesja VIII

### P1

## Ocena wpływu polimorfizmów MMP1, MMP2 i MMP3 na przeżycie chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca leczonych z zastosowaniem RT lub RTCT

**Anna Drosik**

**Wstęp:** W wielu nowotworach złośliwych obserwuje się podwyższony poziom metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP). Ekspresja tych białek może być modulowana przez polimorfizmy czynnościowe w kodujących je genach. W licznych badaniach wykazano, że niektóre polimorfizmy w obszarach regulatorowych genów *MMP* wiążą się z podatnością na zachorowanie oraz przebiegiem klinicznym różnych nowotworów złośliwych, w tym NDRP. Badania dotyczące związku pomiędzy obecnością wybranych polimorfizmów w genach *MMP1*, *MMP2* i *MMP3* a przeżyciem chorych na NDRP są nieliczne, a ich wyniki niejednoznaczne.

**Cel pracy:** Zbadanie wpływu trzech funkcjonalnych polimorfizmów, *MMP1* –1607ins/delG (rs1799750), *MMP2* –1306C>T (rs243865) i *MMP3* –1171ins/delA (rs3025058), na przeżycie całkowite (OS), wolne od progresji choroby (PFS) oraz charakterystykę kliniczno-patologiczną chorych na NDRP.

**Materiał i metody:** Do badania włączono 132 chorych na NDRP w stopniach zaawansowania I–III, którzy zostali poddani radykalnej radioterapii lub radiochemioterapii w Centrum Onkologii — Instytucie w Gliwicach w latach 2006–2011. Identyfikację polimorficznych wariantów genów przeprowadzono z zastosowaniem techniki PCR-RFLP.

**Wyniki:** W analizie wieloczynnikowej, z mniejszym ryzykiem zgonu wiązały się genotypy *MMP1* –1607 1G2G+2G2G (HR 0,56; 95%CI, 0,31–1,00,  $p = 0,04$ ) oraz *MMP3* –1171 6A5A+5A5A (HR 0,62; 95%CI 0,36–1,08,  $p = 0,09$ ). Trend w kierunku poprawy przeżyć utrzymywał się także w podgrupie chorych będących jednoczesnymi nosicielami przynajmniej jednego allelu *MMP1* –1607 2G i przynajmniej jednego allelu *MMP3* –1171 5A (HR 1,56; 95%CI, 0,99–2,45,  $p = 0,05$ ). Nie stwierdzono znamiennego statystycznie związku pomiędzy badanymi polimorfizmami a charakterystyką kliniczną chorych.

**Wnioski:** Badane polimorfizmy genów *MMP1* i *MMP3* wydają się interesującymi kandydatami do włączenia do wieloczynnikowych indeksów prognostycznych dla oceny ryzyka zgonu chorych leczonych z zastosowaniem radykalnej radioterapii.

### P2

## Poziom apoptozy i zdolności cytotoksyczne limfocytów pęcherzykowych (AL) u chorych we wczesnym stadium niedrobnokomórkowego raka płuca

**Agata Giżycka**

**Wstęp:** Limfocyty T są prawdopodobnie kluczowym regulatorem przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej, gdyż mogą m.in. rozpoznać i eliminować komórki nowotworowe. Z drugiej strony jednym z mechanizmów ucieczki komórek guza spod nadzoru immunologicznego jest indukcja apoptozy limfocytów.

**Cel:** Ocena apoptozy i czynnościowych własności AL uzyskanych podczas płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (BAL) u chorych we wczesnym stadium niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP).

**Materiał i metody:** W BALF pobranym od chorych na NDRP (z gruczolakorakiem,  $n=10$ ; z rakiem płaskonabłonkowym,  $n = 5$ ; w stadium I–IIA), w porównaniu do grupy kontrolnej ( $n = 13$ ) zbadano wzór odsetkowy komórek zapalnych (barwienie MGG i HE). W cytometrii przepływowej określono odsetki limfocytów (ekspresja markerów CD3, CD4 i CD8), ich zdolność cytotoksyczną (ekspresja FasL, TRAIL i granzymu B), oraz odsetek apoptotycznych AL.

**Wyniki:** Stwierdzono znamienne wyższy odsetek limfocytów ( $20,7 \pm 3,5$  vs  $4,8 \pm 0,5\%$ ,  $p < 0,05$ ) i neutrofilów ( $4,7 \pm 2,0$  vs  $1,3 \pm 0,3\%$ ,  $p < 0,05$ ) w BALF chorych na NDRP, a także istotnie wyższą ekspresję FasL przez komórki o fenotypie Th (CD4+) ( $13 \pm 7,5$  vs  $2,3 \pm 1,7\%$ ,  $p < 0,05$ ). Ekspresja granzymu B była porównywalna w obu grupach, zauważono tendencję do wyższej ekspresji TRAIL u chorych. Aktywność apoptotyczna AL była znacząco niższa w grupie z gruczolakorakiem płuca w porównaniu do zdrowych ( $0,2 \pm 0,3$  vs  $1,4 \pm 1,2\%$ ,  $p < 0,05$ ).

**Wnioski:** AL chorych na NDRP charakteryzuje zwiększony potencjał cytotoksyczny i niższa aktywność apoptotyczna, co wskazuje na brak supresji odpowiedzi immunologicznej u chorych we wczesnych stadiach raka płuca.

## P3

## Fenotyp DCs stymulowanych antygenami EGFR, MAGE-A3 i MUC-1 generowanych z monocytów chorych na gruczołowego raka płuca

Iwona Homa

**Wstęp:** Komórki dendrytyczne (DCs, *dendritic cells*) są głównymi komórkami prezentującymi antygen. Dojrzałe DCs po stymulacji antygenami nowotworowymi są w stanie je zaprezentować limfocytom T i wzbudzić specyficzną odpowiedź immunologiczną. Uczulone w ten sposób DCs można wykorzystać w immunoterapii chorób nowotworowych.

**Materiał i metody:** Autologiczne DCs były generowane w obecności IL-4, GM-CSF oraz TNF-alfa w pożywce *CellGrow* z monocytów krwi obwodowej pobranej od 21 chorych na gruczołowego raka płuca. Dojrzałe DCs były stymulowane syntetycznymi epitopami antygenów nowotworowych: EGFR, MUC-1, MAGE-A3 oraz CMV (kontrola pozytywna). Za pomocą cytometrii przepływowej oraz przeciwciał monoklonalnych został oceniony stopień różnicowania monocytów w DCs, odsetek DCs wykazujących ekspresję cząsteczek kostymulujących oraz świadczących o zdolności DCs do endocytozy antygenów, ekspresja antygenów biorących udział w regulacji odpowiedzi immunologicznej, ekspresja receptorów dla chemokin, świadcząca o zdolnościach migracyjnych DCs.

**Cel:** Celem pracy było stwierdzenie różnic w fenotypie DCs generowanych *ex vivo* od chorych na gruczołowego raka płuca w zależności od rodzaju antygeny nowotworowego użytego do stymulacji.

**Wyniki:** Przeprowadzono skuteczną generację DCs linii mieloidalnej (CD45+CD11c+). DCs były dojrzałe i zdolne do stymulacji limfocytów poprzez cząsteczki kostymulujące (CD1a+CD83+, B7H1+B7DC+, CD80+CD86+), były zdolne do fagocytozy (CD209+) i migracji (CCR7+). Odsetek DCs o fenotypie B7H1+B7H4- był istotnie wyższy w hodowlach stymulowanych MAGE-A3 i CMV niż MUC-1 (odpowiednio:  $p = 0,0078$ ,  $p = 0,0348$ ) oraz EGFR niż MAGE-A3 ( $p = 0,0362$ ). Odsetek DCs z ekspresją cząsteczek B7H1 i CD83 oraz B7H1 i B7DC był istotnie wyższy w hodowlach stymulowanych EGFR i MAGE-A3 niż MUC-1 (odpowiednio:  $p = 0,0013$ ,  $p = 0,0190$ ) oraz hodowlach stymulowanych MAGE-A3.

## P4

## Ocena ekspresji czynników limfangiogenicznych w guzach pierwotnych u chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca

Radosław Charkiewicz

**Wstęp:** Limfangiogeneza odgrywa istotną rolę w progresji niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP) i wpływa na długość życia chorych.

**Cel:** Celem pracy była analiza ekspresji 15 genów, kodujących czynniki limfangiogeniczne, m.in.: *VEGFD*, *VEGFR-3*, *TEK*, *Prox-1*, podoplanina, chemokina CCL21 w guzach pierwotnych chorych na NDRP leczonych operacyjnie. Poziomy ekspresji genów poddano korelacji z parametrami kliniczno-patologicznymi oraz oceniono ich znaczenie prognostyczne. Dodatkowym celem było opracowanie modelu prognostycznego, klasyfikującego chorych do grupy wysokiego i niskiego ryzyka nawrotu i zgonu po doszczętej resekcji mięszu płucnego.

**Materiał i metody:** Do badań zakwalifikowano 122 chorych we wczesnych stadiach zaawansowania NDRP, poddanych radykalnemu leczeniu operacyjnemu. Materiał do badań stanowiły wycinki z guzów pierwotnych płuca. Do oceny ekspresji wybranych genów została zastosowana metoda ilościowego PCR w czasie rzeczywistym.

**Wyniki:** Badania wykazały zwiększoną ekspresję genu podoplaniny w raku płaskonabłonkowym w porównaniu do raka gruczołowego i wielkokomórkowego ( $p < 0,001$ ). Stwierdzono, iż zwiększona ekspresja genu *VEGFR-3* ( $p < 0,001$ ), *VEGFD* ( $p = 0,008$ ) i *TEK* ( $p = 0,002$ ) występowała głównie w guzach o najniższym stopniu zaawansowania (T1). Wysoki poziom ekspresji podoplaniny był związany z obecnością przerzutów do węzłów chłonnych ( $p = 0,05$ ), zaś w przypadku genu *TEK* zależność przedstawiała się odwrotnie ( $p = 0,05$ ). Wysoka ekspresja genów: *VEGFR-3*, *VEGFD*, *TEK*, *Prox-1* oraz *CCL21* wykazywała istotny statystycznie związek z dłuższym czasem całkowitego przeżycia chorych ( $p < 0,05$ ). Nadekspresja genów: *CCL21*, *TEK* i *Prox-1* była znamiennej związana z mniejszym ryzykiem nawrotu choroby ( $p < 0,05$ ). Opracowano 3-czynnikowy model prognostyczny, kwalifikujący chorych do grup wysokiego i niskiego ryzyka zgonu z powodu NDRP. Dokładność przewidywania zgonu w okresie 3 lat po operacji wynosiła 71,9%.

## P5

## Częstość występowania rzadkich mutacji w genie *EGFR* u polskich chorych z rozpoznaniem niedrobnokomórkowego raka płuca

Katarzyna Kałakucka

**Wstęp:** Ocena mutacji w eksonach 19. i 21. genu *EGFR* u chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP) stanowi obecnie standard diagnostyczny mający, na celu kwalifikację chorych do spersonalizowanej terapii z użyciem inhibitorów kinazy tyrozynowej *EGFR* (IKT-*EGFR*). Ponadto istnieje możliwość wykrycia rzadkich mutacji w eksonach 18.–21. genu *EGFR* za pomocą komercyjnie dostępnych testów diagnostycznych. Istnieją doniesienia naukowe potwierdzające skuteczność terapii IKT-*EGFR* u chorych z takimi zaburzeniami genetycznymi.

**Materiały i metody:** W niniejszej pracy oceniono częstość występowania mutacji w genie *EGFR* u 2475 chorych na NDRP głównie o typie gruczolowym (n = 2060). Z wykorzystaniem technik ASP-PCR oraz *real-time PCR* (testy firmy Entrogen i Roche) zbadano występowanie najczęstszych mutacji w eksonie 19. (delekcje) i 21. (L858R) oraz rzadkie mutacje w eksonach 18.–21. (mutacje G719X, S768I, L861Q oraz insercje w eksonie 20.) w DNA izolowanym z komórek nowotworowych.

**Wyniki:** Wykryto 239 mutacji u 215 chorych (9,7% badanej grupy), w tym 45 rzadkich mutacji w eksonach 18.–21. (1,8% badanej grupy). Najczęściej wykrywaniem rzadkimi mutacjami były insercje w eksonie 20. (n = 14; 31,1% rzadkich mutacji), substytucja L861Q (n = 9; 20% rzadkich mutacji) oraz substytucja G719X (n = 8; 17,8% rzadkich mutacji). U jednej chorej na raka gruczolowego ze współistnieniem substytucji G719X i S768I zaobserwowano wczesną progresję w trakcie terapii II linii erlotynibem. Natomiast u chorego z rakiem gruczolowym i substytucją L861Q terapia erlotynibem w I linii spowodowała remisję choroby trwającą 16 miesięcy. Progresję w tym przypadku stwierdzono pod postacią wystąpienia przerzutów do wątroby, a chorego zakwalifikowano do leczenia IKT *EGFR* III generacji — CO1686.

**Wnioski:** Rzadkie mutacje w genie *EGFR* w polskiej populacji są stosunkowo często wykrywane i występują one jako jedyna nieprawidłowość genetyczna w komórkach NDRP lub współistnieją ze sobą lub częstymi mutacjami.

## P6

## Analiza SNP -2166T>C promotora genu *STMN1* w kwalifikacji do leczenia za pomocą związków platyny i winorelbiny u chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca

Radosław Mlak

**Wstęp:** Połączenie związków platyny i winorelbiny jest często stosowanym schematem leczenia I linii u chorych na zaawansowanego niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP), nieposiadających mutacji aktywujących w genie *EGFR* i *ALK*. Niestety mniej niż połowa chorych odnosi korzyść z chemioterapii pod postacią obiektywnej odpowiedzi na leczenie i poprawy jakości życia chorych. Większość chorych (również tych bez efektów chemioterapii) jest narażona są na szereg działań niepożądanych terapii. Statmina-1 (*STMN1*, oncoproteina 18) jest białkiem regulowanym przez produkt genu supresorowego *P53*. W istotny sposób wpływa ono na dynamikę mikrotubul odpowiedzialnych za formowanie wrzeciona podziałowego. Z tego względu zmiany w obrębie genu *STMN1* mogą stanowić potencjalny czynnik prognostyczny i/lub predykcyjny odpowiedzi na schematy leczenia zawierające cytostatyki zaburzające dynamikę mikrotubul (alkaloidy *Vinca* lub taksoidy).

**Cel:** Celem pracy było określenie związku pomiędzy polimorfizmem pojedynczego nukleotydu (SNP) promotora genu *STMN1* (-2166T>C) a skutecznością chemioterapii opartej na związkach platyny i winorelbiny u chorych na NDRP.

**Materiał i metody:** Grupa badana obejmowała 110 chorych leczonych w I linii chemioterapią opartą na związkach platyny i winorelbiny. SNP było oznaczane metodą SNaPshot PCR® w DNA izolowanym z krwi obwodowej.

**Wyniki:** Mediana czasu wolnego od progresji była znacząco krótsza u nosicieli genotypu TT genu *STMN1* w porównaniu do chorych posiadających genotypy CC lub CT (2,75 vs 6,5 mies.; p = 0,0033,  $\chi^2 = 8,63$ , HR = 5,91, 95%CI: 1,81–19,3). Oceniany SNP nie wpływał istotnie na odpowiedź na leczenie oraz czas życia badanych chorych.

**Wnioski:** Rzadko występujący genotyp TT genu *STMN1* może być niekorzystnym czynnikiem predykcyjnym chemioterapii opartej na związkach platyny i winorelbiny u chorych na NDRP.



## P7

## Ocena obecności mutacji w genie *KRAS* u chorych z przerzutami niedrobnokomórkowego raka płuca do centralnego układu nerwowego — potencjalne zastosowanie w kwalifikacji do terapii

Marcin Nicoś

**Wstęp:** Mutacje w genie *KRAS* są najczęstszymi mutacjami kierującymi u chorych na NDRP. Połączenie terapii IKT EGFR (erlotynib) z inhibitorami c-Met (onartuzumab lub tiwantynib) może okazać się skuteczne u chorych z mutacjami w genie *KRAS*. Również selumetinib, podwójny inhibitor MEK1 i MEK2, wykazuje aktywność u chorych z mutacjami w genie *KRAS*.

**Materiały i metody:** Materiał z guza przerzutowego do CUN zebrano u 145 chorych na NDRP. U 30 chorych dostępny był jednocześnie materiał z pierwotnego i przerzutowego guza NDRP. DNA izolowano z materiału tkankowego z bloczków parafinowych. Częstość występowania i rodzaj mutacji został oceniony przy użyciu techniki *real-time PCR* z wykorzystaniem zestawu *KRAS/BRAF Mutation Analysis Kit* (EntroGen, USA) wykorzystującego allelospecyficzne hybrydujące sondy molekularne.

**Wyniki:** Wykryto 34 mutacje genu *KRAS* w przerzutach NDRP do CUN (23,4% chorych) oraz 7 w guzach pierwotnych (23,3% chorych). U 5 chorych mutacje występowały jednocześnie w guzie pierwotnym i przerzutowym, u 1 jedynie w guzie pierwotnym, u 2 chorych jedynie w guzie przerzutowym. Mutacje były częstsze u chorych z rozpoznaniem raka gruczołowego (67,6% mutacji *KRAS*) oraz u mężczyzn (70,6% mutacji *KRAS*). Najczęściej diagnozowano mutacje w kodonie 12. genu *KRAS*; a u pojedynczych chorych zdiagnozowano rzadkie substytucje G13D i Q61R. Nie wykazano współistnienia mutacji w genie *KRAS* z mutacjami w genach *EGFR*, *BRAF* i *HER2*. U jednego chorego stwierdzono w guzie przerzutowym do CUN współistnienie mutacji w genach *KRAS* i *DDR2*.

**Wnioski:** Mutacje w genie *KRAS* (głównie w kodonie 12.) są częstą nieprawidłowością genetyczną w pierwotnych i przerzutowych guzach NDRP, zwłaszcza u mężczyzn chorych na raka gruczołowego. Wyniki badania wskazują na molekularnie odmienny charakter zmian pierwotnych i przerzutów do CUN.

## P8

## Bronchonawigacja — doświadczenia wstępne

Jarosław Pieróg

**Cel:** Celem pracy jest przybliżenie zastosowania nowatorskiej metody diagnostyczno – leczniczej bronchonawigacji w warunkach polskiej służby zdrowia.

**Materiał i metody:** W naszej klinice wykonano procedurę bronchonawigacji u 9 pacjentów w wieku 48–77 lat (11% stanowiły kobiety). Kwalifikowani byli chorzy ze zmianami guzowatymi w płucach o nieznannej etiologii po diagnostyce w oddziałach pulmonologicznych, u których biopsja przezklatkowa czy zabieg operacyjny były obciążone znacznym ryzykiem. Każdy pacjent miał wykonane planowanie do bronchonawigacji w oparciu o tomografię klatki piersiowej w dniu poprzedzającym badanie. Wszystkie procedury były wykonane w znieczuleniu ogólnym z użyciem bronchofiberoskopu, sztywnego bronchoskopu i wentylacji dyszowej. Czas trwania procedur wahał się między 40 a 60 minut. W trakcie badania pobierano materiał z okolicy zmian patologicznych w pierwszej kolejności za pomocą igły aspiracyjnej, następnie szczoteczki, a na końcu skrawki za pomocą szczypczyków. Rutynowo wykonywano RTG klatki piersiowej w dniu następnym.

**Wyniki:** U 6 pacjentów uzyskano cytologiczny wynik niedrobnokórkowego raka (66%). Wszystkie rozpoznania uzyskano z biopsji aspiracyjnej cienkoigłowej lub szczoteczki. Jeden przypadek był powikłany odmą opłucnową i wymagał drenażu. Jeden pacjent miał wykonaną lobektomię górną lewą po uzyskaniu rozpoznania, jeden pacjent został skierowany na chemioterapię neoadjuwantową, reszta chorych z rozpoznaniem nowotworu otrzymała radioterapię.

**Wnioski:** Metoda bronchonawigacji jest skutecznym narzędziem diagnostycznym. W naszej wstępnej serii uzyskaliśmy skuteczność rzędu 66%. Do wad metody należy wysoki koszt zakupu aparatury i jednorazowych zestawów z sensorem i narzędziami do biopsji.

## P9

## Autorski program wczesnej profilaktyki i wykrywania chorób odtytoniowych: przewlekłej obturacyjnej choroby płuc (POChP) i raka płuc

**Zygmunt Podolec**

Program profilaktyki chorób odtytoniowych (PPChO) finansowany przez NFZ dotyczy osób palących tytoń powyżej 18. roku życia oraz składa się z etapu podstawowego i specjalistycznego. Autorski program wczesnej profilaktyki i wykrywania chorób odtytoniowych składa się z pięciu etapów.

Etapy I i II dotyczą dzieci w wieku przedszkolnym oraz szkolnym i obejmują: opracowanie i wdrożenie prozdrowotnych programów edukacyjnych, kształcenie umiejętności oddychania (odruchów oddychania) oraz oczyszczania dróg oddechowych oraz wprowadzenie do programów wychowania fizycznego — nauki i treningu odpowiedniego dla rozwoju układu oddechowego. Na zakończenie II etapu zostanie wykonane badaniem spirometryczne, którego wynik zostanie zapisany w systemie informatycznym.

Etap III dotyczy osób palących tytoń. Polega na wykonywaniu badań spirometrycznych co 3–5 lat w celu oceny wpływu palenia na czynność układu oddechowego. Wyniki badań zostaną umieszczone w systemie informatycznym w celu automatycznej analizy trendu i porównania z wartościami należnymi i/lub badaniami wykonanymi wcześniej. Wyniki zostaną przesłane do lekarza rodzinnego oraz osób wykwalifikowanych w zakresie poradnictwa antynikotynowego.

Etapy IV i V dotyczą osób palących tytoń, u których wynik badania spirometrycznego wskazuje na obturację FEV1/FVC poniżej 0,7 (GOLD) lub poniżej DGN (ERS/ATS) lub zostanie stwierdzony spadek wartości FVC, FEV1 lub AEX poniżej 90% wartości należnych. Osoby te otrzymają skierowanie do poradni pulmonologicznej w celu wykonania konsultacji oraz badania tomograficznego klatki piersiowej — w celu wczesnego rozpoznania raka płuc i/lub badania spirometrycznego przed i po podaniu leku rozkurczowego — w celu ustalenia rozpoznania POChP. Planujemy wdrożenie oraz wykonanie wstępnej oceny programu.

## P10

## Wartość prognostyczna oraz przydatność oceny metylacji genów *SEPT9* i *DCLK1* w krążącym DNA krwi obwodowej chorych na raka płuca

**Tomasz Powrózek**

**Wstęp:** Hipermetylacja regionów promotorowych genów supresorowych prowadzi do wyciszenia ich funkcji, co skutkuje niekontrolowaną proliferacją komórek nowotworowych. Możliwość wykrycia metylacji w wolnym krążącym DNA (fc-DNA) krwi obwodowej u chorych na nowotwory oraz brak obecności tego zaburzenia u zdrowych, czyni ją użytecznym markerem diagnostycznym, rozwijającego się bezobjawowo raka. Hipermetylację genów *SEPT9* oraz *DCLK1* opisano dotychczas jedynie u chorych na raka jelita grubego.

**Materiał i metody:** Metylację promotorów genów *SEPT9* oraz *DCLK1* oceniono w fc-DNA u 60 chorych na raka płuca oraz u 120 osób zdrowych za pomocą metylo-specyficznej reakcji łańcuchowej polimerazy (MSP-PCR). Ponadto obecność metylacji badanych genów skorelowano z czasem życia chorych.

**Wyniki:** Metylację promotora genu *SEPT9* oraz *DCLK1* wykryto odpowiednio u 30 i 28 (50% i 46,7%) chorych na raka płuca oraz u 5 i 8 osób zdrowych (4,2% i 6,7%). U 12 chorych na raka płuca (20%) stwierdzono równoczesną metylację obu genów, natomiast współistnienia metylacji nie wykryto u zdrowych. Metylację promotora *DCLK1* wykrywano istotnie częściej u chorych na DRP niż u chorych na NDRP ( $p = 0,006$ ). Chorzy z metylacją *SEPT9* lub *DCLK1* wykazywali istotnie krótszą medianę czasu życia w porównaniu do chorych bez metylacji tych genów (odpowiednio: 7 i 18 miesięcy,  $p = 0,004$ ; HR = 3,2 oraz 9 i 15 miesięcy,  $p = 0,029$ ; HR = 3,3). U chorych z równoczesną metylacją obu genów mediana czasu życia wyniosła 4 miesiące w porównaniu do 12 miesięcy u chorych bez metylacji, bądź z metylacją jednego z genów ( $p < 0,0001$ ; HR = 6,6).

Ocena metylacji badanych genów w fc-DNA może być przydatna w bezinwazyjnej diagnostyce raka płuca oraz w badaniach profilaktycznych. Ponadto obecność metylacji należy uznać za niekorzystny czynnik prognostyczny związany ze skróceniem mediany czasu życia.

## P11

## Ocena czułości i swoistości cytometrii przepływowej jako metody wykrywania krążących komórek nowotworowych raka płuca

**Paweł Rybojad**

**Wstęp:** Ocena krążących komórek nowotworowych (CTC) i potwierdzenie ich obecności może mieć znaczenie prognostyczne oraz wpływ na dalsze leczenie pacjenta operowanego z powodu raka płuca. Dostępne dane literaturowe dotyczące tego zagadnienia koncentruje się na różnych typach chorób nowotworowych, prawie całkowicie ignorując raka płuca. Celem pracy było określenie czułości i swoistości cytometrii przepływowej jak narzędzia do wykrywania CTC.

**Materiał i metody:** Wykorzystano cytometr przepływowy BDFACS Canto II oraz linię komórkową raka płuca A549. Komórki nowotworowe zawieszono w krwi obwodowej pobranej od zdrowych dawców. W trakcie pobrania odrzucano pierwsze 2 ml próbki, aby uniknąć zanieczyszczenia próbki jest z komórek nabłonkowych. Zastosowano 5 różnych stężeniach komórek nowotworowych: 0, 10, 50, 100 i 200 na 1 ml krwi. Po lizie erytrocytów, CK-19 + komórki wyznakowano według procedury barwienia wewnątrzkomórkowego i identyfikowano z wykorzystaniem cytometru przepływowego.

**Wyniki:** Nie wykrywano komórek pochodzenia nabłonkowego w próbce negatywnej. Przy stężeniu komórek rakowych 10/ml wynik badania cytometrycznego wykazywał obecność tych komórek w próbce jednak z reguły w ilości niższej niż zakładana. W próbkach z kolejnymi stężeniami komórek rakowych zawsze wykrywaliśmy ich obecność jednak oceniana ilość odbiegała istotnie od założonego stężenia.

**Wnioski:** Cytometria przepływowa pozwala wykryć relatywnie małe ilości komórek nowotworowych we krwi obwodowej — 10/ml, jednak nie znamy dokładnych ilości CTC jakie faktycznie mogą krążyć we krwi pacjentów. Zwłaszcza u pacjentów w niskich stopniach zaawansowania ilość ta może nie przekraczać wyliczonego przez nas progu detekcji. Cytometria przepływowa wydaje się być metodą przydatną, jednak wymaga porównania z innymi metodami detekcji CTC: metody biologii molekularnej czy dożylnie opłaszczone przeciwciałami wychytującymi CTC.

## P12

## Ocena mieloidalnych komórek supresorowych CD14+HLA-DR-/low w tkankach pacjentów chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca

**Paweł Rybojad**

**Wstęp:** Mieloidalne komórki supresorowe — MDSCs stanowią niejednorodną populację niedojrzałych komórek mieloidalnych, które silnie hamują odpowiedź immunologiczną. Zostały one zidentyfikowane u chorych na nowotwory złośliwe i uważa się je za kolejny z czynników immunologicznych wpływających niekorzystnie na rokowanie kliniczne. MDSCs mogą stanowić nowy cel dla terapii korygujących funkcję układu immunologicznego u pacjentów z NDRP.

**Materiał i metody:** Odsetek MDSCs został oceniony za pomocą przeciwciał monoklonalnych i cytometrii przepływowej. Komórki CD14+ pozbawiano ekspresji HLA-DR lub z niską ekspresją uznawano za należące do grupy mieloidalnych komórek supresorowych. W przeciwieństwie do komórek CD14+HLA-DR+, które wykazują właściwości immunostymulujące. Dodatkowo oceniono zdolność obu populacji do produkcji cytokin stymulujących i hamujących odpowiedź immunologiczną: IL-1, IL-12/23p40, TNF oraz TGF-beta i IL-10. MDSCs oceniono we krwi obwodowej, węzłach chłonnych i tkance nowotworowej pacjentów operowanych z powodu NDRP.

**Wyniki:** Wykazaliśmy istotną statystycznie przewagę komórek CD14+HLA-DR-/low nad komórkami CD14+HLA-DR+ we wszystkich badanych tkankach. Pośród komórek o fenotypie MDSCs przeważały komórki produkujące immunosupresyjny TGF-beta w przeciwieństwie do komórek CD14+HLA-DR+, wśród których przeważały komórki produkujące prozapalne IL-1 i TNF.

**Wnioski:** Nasze wyniki sugerują systemowy wpływ nowotworu skutkujący przewagą komórek o fenotypie immunosupresyjnym we wszystkich tkankach. Eliminacja tych komórek mogłaby osłabić immunosupresyjny wpływ nowotworu i przyczynić się do odbudowy skutecznej odpowiedzi immunologicznej.

## P13

## Ekspresja receptorów histaminowych w efekcie polowym w niedrobnokomórkowych rakach płuc w odniesieniu do P53, COX-2 i PCNA

Ewa Sobańska

**Wstęp:** Ocena biomarkerów w efekcie polowym dostarcza informacji na temat biologicznego zachowania guza i jest dodatkowym wskaźnikiem przy wyborze terapii. Zainteresowanie wzbudza udział histaminy w rozwoju i progresji nowotworów oraz możliwość wykorzystania agonistów i antagonistów receptorów histaminowych w terapii przeciwnowotworowej.

**Cel:** Ocena ekspresji receptorów histaminowych (H1, H2, H4), białka P53, cyklooksyzogenazy-2 i aktywności proliferacyjnej (PCNA) w centrum zmiany złośliwej oraz w tkance przyległej, z uwzględnieniem gradientu odległości pobranych wycinków, w odniesieniu do parametrów kliniczno-patologicznych raka płuca.

**Materiał i metody:** Immunohistochemiczną ocenę ekspresji badanych markerów wykonano na 60 wycinkach tkankowych pochodzących z 15 pierwotnych niedrobnokomórkowych raków płuc.

**Wyniki:** Wysokiej ekspresji P53 i COX-2 w guzie towarzyszyła zazwyczaj wysoka aktywność proliferacyjna oraz obecność receptorów histaminowych H1 i/lub H4. Zaobserwowano wyższą ekspresję receptorów histaminowych w gruczolakorakach niż w rakach płaskonabłonkowych płuca. Porównując centrum zmiany nowotworowej z wycinkami oddalonymi od guza, nie wykazano istotnych statystycznie różnic w ekspresji receptora H1, natomiast ekspresja receptora H4 nasilała się w efekcie polowym niezależnie od typu histologicznego raka.

**Wnioski:** Stwierdzone w gruczolakorakach płuc współwystępowanie receptorów histaminowych i markerów związanych z progresją nowotworu wskazuje, że ocena ekspresji receptorów H1 i H4 w otoczeniu guza powinna być rozważana przy planowaniu terapii przeciw-histaminowej. Dodatkowo, ocena ekspresji COX-2 w mikrośrodowisku guza może być wykorzystana jako wskaźnik do typowania chorych na raka płuc do leczenia wspomagającego z użyciem inhibitorów COX-2.

## P14

## Ocena immunofenotypowa i czynnościowa komórek granulocytarnych towarzyszących rakowi płuca obecnych w wysiękach opłucnowych

Łukasz Spychalski

**Wstęp:** Neutrofile są najliczniejszą populacją pośród leukocytów krwi obwodowej, stanowią pierwszą linię obrony układu odpornościowego. W zależności od mediatorów wydzielanych przez komórki mikrośrodowiska nowotworu, neutrofile mogą przyjmować odmienny immunofenotyp. Stwierdzono, że fenotyp N1 ma charakter przeciwnowotworowy, a N2 charakteryzuje się działaniem wspierającym rozwój nowotworu. Granulocytowe komórki supresorowe pochodzenia szpikowego (GrMDSC) również wykazują działanie pronowotworowe. Ich rola i znaczenie w mikrośrodowisku nowotworu pozostaje przedmiotem wielu badań.

**Cel:** Identyfikacja i charakterystyka funkcjonalna neutrofilii oraz komórek GrMDSC w mikrośrodowisku niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP).

**Materiał i metody:** Przebadano materiał pochodzący od pacjentów z NDRP (62 wysięki opłucnowe i 27 próbek krwi obwodowej). Grupę kontrolną stanowiła krew obwodowa pozyskana od 15 zdrowych dawców. Stosując cytometrię przepływową, oceniono immunofenotyp komórek w zakresie ekspresji antygenów CD45, CD14, CD15, HLA-DR, CD33, CD66b, CD62L, CD11a, CD11b, CD11c, CD18.

**Wyniki:** Neutrofile w badanych wysiękach opłucnowych wykazywały obniżoną ekspresję cząsteczki CD62L oraz zwiększoną ekspresję CD11b/CD18 w porównaniu z neutrofilami krwi obwodowej od chorych z NDRP, które z kolei charakteryzowały się obniżoną ekspresją CD62L i podwyższoną CD11b/CD18 w stosunku do neutrofilów kontrolnych. W badanym materiale stwierdzono również obecność GrMDSC.

**Wnioski:** Zmiany obserwowane w zakresie ekspresji badanych cząsteczek adhezyjnych na neutrofilach towarzyszących nowotworom sugerują ich zwiększoną mobilność i pobudzoną aktywność fagocytarną w mechanizmie zależnym od dopełniacza. Obecne w wysiękach opłucnowych GrMDSC stanowią ważną składową związaną z silnym charakterem immunosupresyjnym tego mikrośrodowiska. Uzyskane wyniki pomogą lepiej scharakteryzować znaczenie immunologiczne granulocytarnych komórek towarzyszących nowotworom w mikrośrodowisku.

## P15

## Fenotyp niskozróżnicowanych raków niedrobnokomórkowych płuca (NDRP) w oligobiopsjach i wycinkach pooperacyjnych

**Jolanta Szade**

**Wstęp:** Większość chorych na raka płuca to pacjenci, którzy nie mogą być poddani leczeniu operacyjnemu, a diagnostyka guza opiera się na materiałach oligobiopsyjnych i cytologicznych. Możliwość stosowania nowych metod leczenia pierwotnego raka płuc obciąża patologów do precyzyjnego określenia typu raka niedrobnokomórkowego.

**Cel:** Celem pracy była ocena fenotypu niskozróżnicowanych niedrobnokomórkowych raków płuca oraz korelacja wyników w oligobiopsjach z dużymi wycinkami pooperacyjnymi.

**Materiał i metody:** Materiał pochodził od 123 pacjentów, w 39 przypadkach dostępny był materiał z oligobiopsji i pooperacyjnej. Dodatkowo utworzono mikromacierze, które zawierały próbki wszystkich guzów. Największą grupę stanowiły raki płaskonabłonkowe — 46%, następnie gruczołowe — 24%, wielkokomórkowe — 14%, gruczołowo-płaskonabłonkowe — 5%. Pozostałe 11% to inne rzadsze typy histologiczne i guzy złożone. Rozpoznanie typu histologicznego opierało się na morfologii nowotworu widocznej w barwieniu H-E.

**Wyniki:** Uzyskano następujące wyniki ekspresji markerów w wycinkach pooperacyjnych (tab. 1).

**Tabela 1**

	Marker						
	p40	P63	CK5/6	CK7	TTF1	Napsin A	Mucykarmin
Raki gruczołowe	2/30 (6,7%)	7/30 (23,3)	1/30 (3,3%)	30/30 (100%)	28/30 (93%)	21/30 (70%)	12/30 (40%)
Raki płaskonabłonkowe	55/57 (96,5)	55/57 (96,5)	49/57 (85,96)	12/57 (21%)	3/57 (5%)	0/57	0/57
Raki gruczołowo-płaskonabłonkowe	3/6 (50%)	4/6 (66,7%)	3/6 (50%)	5/6 (83,3%)	4/6 (66,7%)	2/6 (33,3%)	1/6 (16,6%)
Raki wielkokomórkowe	2/17 (11,76)	8/17 (47%)	2/17 (11,76)	15/17 (88,24)	9/17 (52,94)	9/17 (52,94)	2/17 (11,76%)
Inne	3/13 (23%)	2/13 (15,3%)	3/13 (23%)	7/13 (53,85%)	7/13 (53,85%)	2/13 (15,3%)	1/13 (7,7%)

Uzyskane odczyny z dużych wycinków wykazywały wysoką zgodność zarówno z oligobiopsjami jak i mikromacierzami. Najwyższą zgodność pomiędzy oligobiopsjami a dużymi wycinkami była dla CK 7 i CK 5/6, najniższą dla TTF1 i Napsin A. W przypadku mikromacierzy najwyższą zgodność odnotowano dla TTF1, p40 i CK7, najniższą dla p63.

**Wnioski:** Wyniki pracy wskazują, że fenotyp NRNP uzyskany w oparciu o badanie drobnych wycinków koreluje z wynikami badań całych guzów pooperacyjnych. Najwyższą czułość dla raków płaskonabłonkowych w badanej grupie wykazały przeciwciała: p40 i p63 oraz CK 5/6, a dla raków gruczołowych: CK7, TTF1 i Napsin A.

## P16

## Ocena stężenia w surowicy, fenotypu i ekspresji białka alfa-1 antytrypsyny u chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca

**Adam Szpechciński**

**Wstęp:** Alfa-1 antytrypsyna (A1AT) jest jednym z najważniejszych osoczowych i tkankowych inhibitorów proteaz serynowych w organizmie człowieka. Niedostateczny poziom A1AT w organizmie chorych z przewlekłym stanem zapalnym układu oddechowego, m.in. POChP, może sprzyjać enzymatycznej degradacji tkanek płuc na skutek nadaktywności enzymów proteolitycznych. W chorobach nowotworowych równowaga proteazowo-antyproteazowa jest zaburzona. Dotąd nie przestudiowano dostatecznie kwestii związku A1AT z rakiem płuca.

**Cel:** Celem badań była analiza stężenia we krwi, fenotypu oraz ekspresji białka A1AT u chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP) w odniesieniu do chorych na POChP.

**Materiał i metody:** Badano surowice krwi od 153 chorych na NDRP oraz 154 chorych na POChP z fenotypem MM białka A1AT. Stężenie A1AT w surowicy mierzono metodą nefelometryczną. Fenotyp A1AT analizowaną metodą ogniskowania izoelektrycznego. Ekspresję A1AT w preparatach tkanki NDRP (i prawidłowym marginesie) wykrywano metodą immunohistochemiczną.

**Wyniki:** Wyniki opracowano statystycznie. Wśród chorych na NDRP wykryto 6 nosicieli deficytowych alleli A1AT o fenotypach: 3 MS, 1 MZ oraz rzadkie FM i MX. Średnie  $\pm$  SD stężenie A1AT w surowicy chorych na NDRP wynosiło  $206,33 \pm 54,95$  mg/dl (mediana 192,00) i było znamienne wyższe od średniej wartości w grupie POChP:  $171,39 \pm 34,86$  mg/dl (mediana 170,46;  $p < 0,0000$ ). Średnie stężenie A1AT u chorych z typem płaskonabłonkowym NDRP (205,42 mg/dl) było istotnie wyższe od wartości notowanej w grupie chorych na raka gruczołowego (182,76 mg/dl;  $p < 0,029$ ). Istotnie wyższe wartości stężenia A1AT obserwowano wśród chorych w zaawansowanych stadiach NDRP (IIIb–IV, 241,36 mg/dl), w stosunku do chorych w stadiach wcześniejszych (I–IIIa, 194,62 mg/dl;  $p < 0,0000$ ). Potwierdzono silną ekspresję białka A1AT w komórkach NDRP, zarówno typu gruczołowego, jak i płaskonabłonkowego.







