

AUTOREFERAT

Dr n. med. Andrzej Badzio

Ocena wpływu czynników molekularnych na przebieg choroby u pacjentów z rozpoznaniem drobnokomórkowego raka płuca.

Gdańsk 2019

Spis treści

1. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe i specjalizacje.....	3
2. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu:.....	3
3. Osiągnięcie naukowe:.....	4
3.1. Tytuł.....	4
3.2. Wykaz publikacji składających się na osiągnięcie naukowe	4
3.3. Założenia badań.....	5
3.4. Omówienie celu naukowego wymienionych prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania	7
3.4.1. Wstęp.....	7
3.4.2. Omówienie publikacji	8
3.4.3. Podsumowanie	13
4. Pozostałe osiągnięcia naukowe	14
5. Piśmiennictwo.....	19

1. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe i specjalizacje.

- 1990** Lekarz, Wydział Lekarski Akademii Medycznej w Gdańsku
- 1994** Specjalista I stopnia w dziedzinie radioterapii onkologicznej, Akademia Medyczna w Gdańsku
- 1999** Specjalista II stopnia radioterapii onkologicznej
- 2005** Specjalista onkologii klinicznej
-
- 2000** Doktor nauk medycznych w zakresie medycyny, Wydział Lekarski Akademii Medycznej w Gdańsku, na podstawie rozprawy doktorskiej:
„Odległe wyniki leczenia ograniczonej postaci drobnokomórkowego raka płuca z uwzględnieniem roli leczenia chirurgicznego”: Promotor: Prof. dr hab. med. Jacek Jassem

2. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu:

- 1991 - 2000** Klinika Radioterapii i Onkologii; Państwowy Szpital Kliniczny nr.1 w Gdańsku.
Stanowisko: młodszy asystent
- 2000-2012** Klinika Onkologii i Radioterapii Państwowy Szpital Kliniczny nr. 1/Uniwersyteckie Centrum Kliniczne w Gdańsku
Stanowisko: starszy asystent
- 2012 - 2019** Centrum Radioterapii Nu-Med W Elblągu, Stanowisko: Zastępca Dyrektora do spraw Medycznych, Ordynator, Kierownik Zakładu Radioterapii

3. Osiągnięcie naukowe:

3.1. Tytuł

Ocena wpływu czynników molekularnych na przebieg choroby u pacjentów z rozpoznaniem drobnokomórkowego raka płuca.

3.2. Wykaz publikacji składających się na osiągnięcie naukowe

Osiągnięcie naukowe na podstawie art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki obejmuje cykl 5 powiązanych tematycznie publikacji:

1. **A. Badzio**, M. W. Wynes, R. Dziadziuszko, D. T. Merrick, M. Pardo, W. Rzyman, A. Kowalczyk, S. Singh, J. Ranger-Moore, G. Manriquez, F. Gaire, J. Jassem, F. R. Hirsch. *Increased insulin-like growth factor 1 receptor protein expression and gene copy number in small cell lung cancer*. J. Thorac. Oncol. 2010; vol. 5, nr 12, s. 1905-1911.

punktacja Impact Factor: **4,040**

punktacja ministerstwa: **32**

2. L. R. Saunders, A. J. Bankovich, W. C. Anderson, M. A. Aujay, S. Bheddah, K. Black, R. Desai, P. A. Escarpe, J. Hampl, A. Laysang, D. Liu, J. Lopez-Molina, A. Park, M. A. Pysz, H. Shao, B. Slingerland, M. Torgov, S. A. Williams, O. Foord, P. Howard, J. Jassem, **A. Badzio**, P. Czapiewski, D. H. Harpole, A. Dowlati, P. P. Massion, W. D. Travis, M. C. Pietanza, J. T. Poirier, C. M. Rudin, R. A. Stull, S. J. Dylla. *A DLL3-targeted antibody-drug conjugate eradicates high-grade pulmonary neuroendocrine tumor-initiating cells in vivo*. Sci. Transl. Med. 2015; vol. 7, nr 302, art. ID 302ra136, s. 1-13.

punktacja Impact Factor: **16,264**

punktacja ministerstwa: **50**

3. L. Zhang, H. Yu, **A. Badzio**, T. A. Boyle, H.-U. Schildhaus, X. Lu, R. Dziadziuszko, J. Jassem, M. Varella-Garcia, L. E. Heasley, A. A. Kowalewski, K. Ellison, G. Chen, C. Zhou, F. R. Hirsch. *Fibroblast growth factor receptor 1 and related ligands in small-cell lung cancer*. J. Thorac. Oncol. 2015; vol. 10, nr 7, s. 1083-1090.

punktacja Impact Factor: **5,040**

punktacja ministerstwa: **40**

4. H. Yu, C. Batenchuk, **A. Badzio**, T. A. Boyle, P. Czapiewski, D. C. Chan, X. Lu, D. Gao, K. Ellison, A. A. Kowalewski, C. J. Rivard, R. Dziadziuszko, C. Zhou, M. Hussein, D. Richards, S. Wilks, M. Monte, W. Edenfield, J. Goldschmidt, R. Page, B. Ulrich, D. Waterhouse, S. Close, J. Jassem, K. Kulig, F. R. Hirsch. *PD-L1 expression by two complementary diagnostic assays and mRNA in situ hybridization in small cell lung cancer*. J. Thorac. Oncol. 2017; vol. 12, nr 1, s. 110-120.

punktacja Impact Factor: **10,336**

punktacja ministerstwa: **40**

5. **A. Badzio**, P. Czapiewski, A. Gorczyński, K. Szczepańska-Michalska, J. Haybaeck, W. Biernat, J. Jassem. *Prognostic value of broad-spectrum keratin clones AE1/AE3 and Cam5.2 in small cell lung cancer patients undergoing pulmonary resection*. Acta Biochim. Pol. 2018. DOI: 10.18388/abp.2018_2773.

punktacja Impact Factor: **1,239**

punktacja ministerstwa: **15**

Łączna wartość współczynnika oddziaływania IF prac składających się na osiągnięcie naukowe wynosi **36,919** pkt., a łączna liczba punktów MNiSW prac składających się na osiągnięcie naukowe wynosi **177**.

Oświadczenia współautorów publikacji określające indywidualny wkład każdego autora w powstanie poszczególnych publikacji oraz oświadczenia habilitanta dotyczące wykonanych prac oraz procentowego w nich udziału znajdują się w załączniku.

3.3. Założenia badań

Osiągnięcie naukowe obejmuje cykl 5 powiązanych tematycznie publikacji dotyczących wpływu czynników molekularnych na przebieg choroby u pacjentów na drobnokomórkowego raka płuca. Materiał biologiczny wykorzystany w tym projekcie stanowią bloczki tkankowe wykonane z pierwotnych drobnokomórkowych guzów płuca uzyskanych podczas zabiegu operacyjnego od 97 pacjentów. Standardem postępowania w drobnokomórkowym raku płuca jest chemioterapia lub chemioterapia połączona z radioterapią, natomiast leczenie operacyjne

jest rzadko stosowane. Z tego powodu, dostęp do materiału biologicznego jest znacznie ograniczony. Opisywaną serię stanowią pacjenci operowani z powodu guza płuca o nieznanym charakterze, u których ze względu na trudności diagnostyczne, rozpoznanie raka drobnokomórkowego płuca ustalono dopiero po operacji. Badana grupa jest w związku z tym unikalna i jedną z największych opisywanych w literaturze. Obecnie ze względu na rozwój metod diagnostycznych, takie sytuacje zdarzają się bardzo rzadko. Wszyscy pacjenci operowani byli w Klinice Torakochirurgii w Akademii Medycznej w Gdańsku (obecnie Gdańsk Uniwersytet Medyczny) w latach 1982 – 2003. Znaczny postęp ostatnich lat w leczeniu wielu chorób nowotworowych dokonał się w głównej mierze dzięki lepszemu poznaniu mechanizmów regulacji cyklu podziałowego i wzrostu komórek oraz interakcji komórek nowotworowych i systemu immunologicznego. Istotny postęp jest efektem poznania roli receptorów błonowych - białek z rodziny IGFR oraz mutacji genów które je kodują oraz białek, wytwarzanych przez komórki nowotworowe, modyfikujących reakcje immunologiczne organizmu w ramach mechanizmu check-point inhibitor. Na tej podstawie stworzono dużą grupę nowych leków, które zmieniły przebieg wielu chorób nowotworowych. Inhibitory kinaz tyrozynowych oraz leki blokujące receptor PDL1 znalazły zastosowanie w leczeniu niedokomórkowego raka płuca i pozwalają w tej grupie uzyskiwać nawet wieloletnie remisje nowotworu, a w niektórych przypadkach zwiększają szansę na wyleczenie. Niestety postęp ten nie dotyczy chorych na drobnokomórkowego raka płuca. Jest to nadal jeden z najgorzej rokujących nowotworów – przeżycia roczne sięgają 30% a dwuletnie zaledwie 15%. Dotychczasowe badania, po części z powodu ograniczonego dostępu do materiału biologicznego i mniejszej intensywności prac w tym zakresie, nie pozwoliły na stworzenie skutecznych leków wykorzystujących mechanizmy poznane w przypadku niedrobnokomórkowego raka płuca.

Cykl prac składający się na rozprawę habilitacyjną zwiera 5 doniesień naukowych które ukazały się w czasopiśmie o międzynarodowym zasięgu. Powstały one we współpracy z Katedrą Patomorfologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Uniwersytetem Stanu Kolorado w Denver USA i firmą Stemcentrx, Kalifornia USA. Celem prac było poznanie biologii komórek drobnokomórkowego raka płuca co może w przyszłości pozwolić na stworzenie bardziej skutecznych metod systemowego leczenia tego nowotworu.

3.4. Omówienie celu naukowego wymienionych prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

3.4.1. Wstęp

Drobnokomórkowy rak płuca stanowi około 15% z pośród wszystkich nowych zachorowań na raka płuca. Nowotwór ten, oprócz innej budowy histologicznej charakteryzuje się odmiennym przebiegiem klinicznym w porównaniu z rakiem niedrobnokomórkowym. (Byers and Rudin, 2015)(Govindan *et al.*, 2006). Charakteryzuje go szybki wzrost, krótki czas podwojenia i skłonność do wczesnego uogólnienia procesu nowotworowego, u większości chorych już w chwili rozpoznania stwierdza się obecność przerzutów odległych (Kalemkerian *et al.*, 2013). Standardowym postępowaniem nadal pozostaje chemioterapia oparta na cisplatynie, a u chorych z tak zwaną „postacią ograniczoną” choroby, tj. bez przerzutów odległych, kojarzona jednocześnie lub sekwencyjnie z radioterapią (Rudin *et al.*, 2015). Wyniki leczenia są złe, nawet w postaci ograniczonej choroby przeżycia pięcioletnie wynoszą ok. 20%, a w rozsianej nie przekraczają 5% (Jemal *et al.*, 2011). Jedyny istotny postęp w leczeniu tego nowotworu, zwiększenie odsetka przeżyć trzyletnich o 5%, został w ostatnich latach osiągnięty dzięki skojarzeniu chemioterapii z napromienianiem na okolicę guza w klatce piersiowej i śródpiersie u chorych bez cech rozsiewu (Murray and Turrisi, 2006). Poprawę rokowania uzyskano także w wyniku zastosowania profilaktycznej radioterapii na mózgowie (De Ruysscher, 2010). W ciągu kilku dekad nie osiągnięto natomiast jakiegokolwiek postępu w leczeniu systemowym tego nowotworu, a schemat chemioterapii składający się z cisplatyny i etoposidu wprowadzony w latach 80 ubiegłego wieku stanowi nadal standard postępowania. W ostatnim czasie przedstawiono wyniki badania wskazującego na niewielką poprawę wyników leczenia po zastosowaniu skojarzenia chemioterapii z lekiem anty-PDL1, ale metoda ta nie znalazła jeszcze zastosowania w praktyce klinicznej. Obecnie wysiłek naukowców, podobnie jak w innych nowotworach, ogniskuje się na poszukiwaniu terapii celowanych, jednak pomimo prowadzonych badań klinicznych nie udało się udowodnić ich skuteczności terapeutycznej. Badania prowadzone w ramach przedstawianego dzieła ogniskują się na badaniach nad biologią molekularną drobnokomórkowego raka płuca oraz poszukiwaniu

czynników prognostycznych lub predykcyjnych które mogłyby stać się podstawą opracowania nowych strategii leczniczych.

3.4.2. Omówienie publikacji

W pracy „*Increased insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R) protein expression and gene copy number in small cell lung cancer*” dokonano analizy ekspresji i amplifikacji genu kodującego insulino zależny receptor wzrostu typu 1 (IGF1R). Jest to pierwsze badanie w drobnokomórkowym raku płuca w którym takiej oceny dokonano na materiale tkankowym z ognisk pierwotnych guza pobranych w trakcie zabiegu operacyjnego. Ścieżka sygnałowa insulinopodobnego receptora wzrostu reguluje szereg istotnych funkcji komórkowych: wzrost komórki, tempo proliferacji i potencjał inwazyjny (Dzadzuszko, Camidge and Hirsch, 2008).

Badana grupa obejmowała 90 chorych na drobnokomórkowego raka płuca, spośród których ocena ekspresji możliwa była w 84 przypadkach. Ocenę ekspresji przeprowadzono na macierzach tkankowych po zidentyfikowaniu przez doświadczonego patomorfologa lokalizacji guza w preparacie. Do badań immunohistochemicznych zastosowano przeciwciało Ventana G11 anti-IGF1R. Ocenę wyników oparto na H-score, wskaźniku będącym ilorazem kategorii wybarwienia (0-4) i odsetka dodatnich komórek (skala od 0-400). Ocena dokonywana była przez dwóch doświadczonych, niezależnie pracujących patologów. Liczbę kopii genu *IGF1R* badano metodą *silver in-situ hybridization* (SISH). Ekspresję IGF1R stwierdzono w 74% z 84 badanych próbek, za wartość progową H-score przyjęto 10. Nie stwierdzono znamienych korelacji pomiędzy obecnością receptora a cechami klinicznymi lub przeżyciem.

Oceny amplifikacji genu *IGF1R* dokonano u 81 chorych. Średnia liczba kopii genu wynosiła 2,4 (zakres 1,3 – 18,4), w piętnastu przypadkach stwierdzono 4 lub więcej kopii. Amplifikacja genu *IGF1R* była związana znamienne ze starszym wiekiem ($p=0,05$), inne cechy kliniczne nie były związane z liczbą kopii genu. Nie stwierdzono także związku liczby kopii genu *IGF1R* z przeżyciem chorych.

Stwierdzono statystycznie znamienne korelację pomiędzy ekspresją receptora IGF1R i amplifikacją genu; analiza taka była możliwa u 79 chorych.

Badania nad rolą receptora IGF1R w nowotworach złośliwych rozpoczęto już w latach 80-tych ubiegłego wieku. Ekspresję stwierdzano w liniach komórkowych różnych nowotworów, także drobnokomórkowego raka płuca (LEROITH *et al.*, 1995). Dotychczasowe badania wskazują, że aktywacja receptora IGFR1 stymuluje proliferację komórek tego nowotworu (Nakanishi *et al.*, 1988) a blokowanie ścieżki IGF1R za pomocą inhibitorów kinazy tyrozynowej hamuje wzrost komórek, stymuluje apoptozę w liniach komórkowych drobnokomórkowego raka płuca i uwrażliwia je na chemioterapię (Warshamana-Greene *et al.*, 2005). Podwyższona aktywność receptora IGF1R jest także związana ze zwiększoną ekspresją surwiwiny co może być elementem mechanizmu chemooporności w drobnokomórkowym raku płuca (Vaira *et al.*, 2007). Przedstawione wyniki sugerują możliwość wykorzystania leków blokujących receptor IGF1R w leczeniu chorych na drobnokomórkowego raka płuca. Dotychczasowe próby wykorzystania przeciwciał monoklonalnych przeciw IGF1R (CP-751-871 i MK-0646) w niewyselekcjonowanej populacji chorych nie wykazały korzyści klinicznych ze skojarzenia tych leków ze standardowym leczeniem (Huang *et al.*, 2016). Wyniki omawianej pracy, w której stwierdziliśmy wysoki odsetek chorych z dodatnią ekspresją IGF1R i jej korelację z amplifikacją genu IGF1R mogą ułatwić stworzenie modelu predykcyjnego i wyselekcjonowanie chorych wrażliwych na leczenie blokujące ścieżkę sygnałową IGF1R.

W pracy "*Fibroblast Growth Factor Receptor 1 (FGFR1) and related ligands in small cell lung cancer*" wykorzystano archiwalne wycinki tkankowe z drobnokomórkowych raków płuca do zbadania ścieżki sygnałowej FGFR1. Białka błonowe z grupy receptorów FGFR biorą udział w transmisji sygnałów w komórce i wpływają na takie procesy, jak angiogeneza i procesy zapalne w różnych stanach chorobowych (Beenken and Mohammadi, 2009). Aktywacja ścieżki sygnałowej FGFR1 prawdopodobnie wpływa na transformację normalnej komórki w komórkę nowotworową (Behrens *et al.*, 2008). Dotychczasowe badania and inhibitorami ścieżki sygnałowej FGFR1 w drobnokomórkowym raku płuca wskazują na pewną aktywność takiej cząsteczki. Inhibitor FGFR PD173074 blokował wzrost komórek drobnokomórkowego raka płuca zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo* (Pardo *et al.*, 2009). Inne podobne cząsteczki są obecnie w trakcie badań klinicznych I i II fazy. Dostępne dane pozwalają sądzić, że oddziaływanie na rodzinę FGFR może być wykorzystane w celach terapeutycznych. W omawianej pracy badano ścieżkę sygnałową FGFR1 obejmującą częstość występowania ekspresji białka, obecność mRNA i występowanie amplifikacji genu kodującego *FGFR1*.

Badania przeprowadzono na dwóch grupach, 24 próbek ze znaną obecnością amplifikacji FGFR1 i 90 nie badanych wcześniej. Ekspresję białka badano we wszystkich 114 próbkach tkankowych przygotowanych w formie macierzy tkankowych z zastosowaniem przeciwciał przeciwko FGFR1 (CloneEPR806Y, Origene, Rockville, FGF2, Santa Cruz FGF9). Zliczanie ekspresji wykonano w oparciu o H-score (0 x % guzów bez ekspresji+1 x % guzów z niską ekspresją+2 x % guzów ze średnią ekspresją + 3 x % guzów z wysoka ekspresją). Obecność mRNA oceniano metodą hybrydyzacji in situ przy użyciu RNA scope 2.0. Amplifikację genu kodującego *FGFR1* badano przy użyciu SISH (*silver in situ hybridization*). Wszystkie zliczenia, zarówno ekspresji białka jak obecności mRNA i liczby kopii genu *FGFR1*, były przeprowadzane niezależnie przez dwóch doświadczonych patomorfologów. Ekspresją białka FGFR1 stwierdzono w 6 próbkach (7,2%) w grupie o nieznanym stanie amplifikacji i w 17 (74%) przypadkach w grupie z amplifikacją genu *FGFR1*. Obecność mRNA stwierdzono w 19,7% przypadków. Amplifikacja genu kodującego *FGFR1* była badana w grupie z nieznanym poziomem amplifikacji i stwierdzono ją w 6 przypadkach. Dodatnia ekspresja FGFR1 korelowała znamienne z poziomem mRNA ($p<0,001$) i z liczbą kopii genu *FGFR1* ($p=0,03$). Nie stwierdzono związku ekspresji FGFR1, mRNA i amplifikacji genu z cechami klinicznymi, co może mieć związek z niskim odsetkiem guzów w których stwierdzano ekspresję FGFR1.

Uzyskane wyniki wskazują, że część przypadków drobnokomórkowego raka płuca charakteryzuje aktywna ścieżka sygnałowa FGFR1. Analiza obecności ekspresji, mRNA i liczby kopii genu kodującego FGFR1 może być potencjalnie wykorzystana do doboru pacjentów pod kątem leczenia inhibitorami FGFR1.

Kolejne doniesienie „*PD-L1 expression by two complementary diagnostic assays and mRNA in situ hybridization in Small Cell Lung Cancer*” dotyczy obecności białka programowanej śmierci-ligand1 (PDL1) oraz mRNA w komórkach drobnokomórkowego raka płuca. W tej pracy wykorzystano materiał pobrany od dwóch grup chorych na drobnokomórkowego raka płuca; 98 chorych z ograniczoną postacią choroby i 96 chorych z postacią rozległą. Analizę obecności białka PD-L1 wykonano w obu grupach, w grupie chorych z postacią ograniczoną dodatkowo oceniono poziom mRNA i ekspresję PD-L1 w komórkach naciekających guz (tumor-infiltrating immune cells-TILs). Podobnie jak w poprzednich publikacjach, analizę immunohistochemiczną przeprowadzono w oparciu o macierze tkankowe, ekspresję PD-L1 i poziom mRNA badano przy użyciu SP142 i DAKO 28-8 przeciwciał p/PD-L1.

Ekspresję białka PD-L1 w komórkach nowotworowych stwierdzono w 16,7 % przypadków (14,7% w grupie z postacią ograniczoną i 19,45% w grupie z postacią rozległą) przyjęto wartość progową 1% komórek wykazującą ekspresję białka PD-L1. W komórkach TILCs ekspresja PD-L1 była znamienne wyższa i wynosiła 50,7%. Stwierdzony w badaniu odsetek guzów z ekspresją PD-L1 jest niższy niż w przypadku niedrobnokomórkowego raka płuca (Borghaei *et al.*, 2015), ale zbliżony do wyników uzyskiwanych w drobnokomórkowy raku płuca przez innych autorów (Antonia *et al.*, 2016). Ekspresję białka PD-L1 wykazuje wiele różnych komórek nowotworowych i leczenie z zastosowaniem przeciwciał anty PD-L1 jest skuteczne np. w czerniaku złośliwym i niedrobnokomórkowym raku płuca. Wyniki badania CheckMate032 w którym porównano skuteczność Nivolumabu z lub bez Ipilimumabu w leczeniu II rzutu w drobnokomórkowym raku płuca, przyniosły obiecujące wyniki – przeżycia roczne uzyskano u 35-4-% chorych leczonych skojarzeniem dwóch leków (Antonia *et al.*, 2016). Wyniki te budzą nadzieję na przełamanie wieloletniego impasu w rozwoju metod leczenia drobnokomórkowego raka płuca, ale wymagają potwierdzenia w prospektywnych badaniach klinicznych z randomizacją. W naszym badaniu, zarówno ekspresja PD-L1 jak i wysoki poziom mRNA korelowały z nasiloną infiltracją guza komórkami TILCs, podobne wyniki uzyskano w czerniaku złośliwym (Spranger *et al.*, 2013). Obecność infiltracji lymphocytami typu T może zwiększać wrażliwość komórek na leczenie anty-PD-L1. Uzyskane przez nas wyniki potwierdzają ekspresję PD-L1 i odpowiedniego mRNA w komórkach drobnokomórkowego raka płuca, a także wzmożone naciekanie przez komórki TILCs w guzach ją wykazujących. Dane te mogą stanowić podstawę do dalszych badań nad czynnikami predykcyjnymi dla leczenia anty PD-L1. W tym badaniu zastosowanie dwóch różnych przeciwciał do oceny ekspresji PD-L1 dało zbliżone wyniki, jednak należy zwrócić uwagę, że konieczna jest standaryzacja oceny przy użyciu immunohistochemii.

W pracy “*A DLL3-targeted antibody-drug conjugate eradicates high-grade pulmonary neuroendocrine tumor-initiating cells in vivo*” w pierwszym etapie badania oceniono częstość występowania *delta-like-protein 3* (DLL3) na błonie komórek guzów pobranych od 187 chorych na drobnokomórkowego raka płuca, 95 na niedrobnokomórkowego raka płuca, 57 na raka olbrzymiokomórkowego raka płuca oraz 9 próbkach normalnego mięszu płucnego. Ekspresję DLL3 badano metodą immunohistochemiczną, wykrywając obecność białka w 65%

raków olbrzymiokomórkowych i 72% drobnokomórkowych, ekspresji DLL3 nie stwierdzono w żadnym przypadku rak niedrobnokomórkowego oraz w normalnym mięszu płucnym. Wyniki te potwierdzono badając białko DLL3 mRNA w komórkach drobnokomórkowego rak płuca i w normalnych tkankach - ekspresja w komórkach nowotworowych była 120 krotnie wyższa. W następnym etapie badań przeciwciało przeciwko DLL3 połączono z toksyną niszczącą nić DNA – perrolobenzodiazepine (PBD) i testowano aktywność koniugatu in vivo na zwierzęcych ksenoprzeszczepach drobnokomórkowych i olbrzymiokomórkowych raków płuca. We wszystkich przypadkach u zwierząt leczonych połączeniem DLL3/toksyna uzyskano całkowite remisje guzów trwające do 144 dni. Nawrotowe guzy odpowiadały także w 100% na podawany preparat. Połączenie toksyny komórkowej z przeciwciałem nakierowanym na białko występujące w wysokim odsetku na komórkach niskozróżnicowanych raków płuca i jednocześnie praktycznie nie występującym w zdrowych tkankach okazało się bardzo skuteczne w badaniach na modelu zwierzęcym. W badaniu klinicznym I fazy uzyskano odsetek odpowiedzi na leczenie na poziomie 40% (Rudin *et al.*, 2016). Na podstawie tych wyników rozpoczęto badanie II fazy w którym koniugat DLL3/toksyna o nazwie Rovalpituzumab Taserine (Rova-T) podawany był w trzecim rzucie leczenia chorym na drobnokomórkowego raka płuca. Wyniki tego badania przedstawiono na konferencji ASCO w 2018 roku – mediana przeżycia 5,6 miesiąca wskazuje jednak na niższą niż oczekiwaną aktywność leku. Obecnie toczą się dwa badania III fazy w których aktywność preparatu Rova-T oceniana jest w skojarzeniu z Topotecanem w II rzucie leczenia i w leczeniu podtrzymującym po chemioterapii. Pomimo nie w pełni satysfakcjonujących wyników badania klinicznego w III rzucie leczenia, należy podkreślić nowatorski charakter preparatu Rova-T, którego dalsze badania w skojarzeniu z lekami cytotoksycznymi dają nadzieję na realny postęp w leczeniu tej postaci raka płuca.

W artykule *“Prognostic value of broad-spectrum keratin clones AE1/AE3 and Cam5.2 in small cell lung cancer patients undergoing pulmonary resection”* przeprowadzono analizę prognostycznej roli obecności różnych keratynin w komórkach rak drobnokomórkowego płuca. Różnego rodzaju keratyny są obecne w większości nowotworów, także w niedrobnokomórkowym raku płuca, i w niektórych przypadkach ich obecność jest związana z gorszym rokowaniem (Makino *et al.*, 2009)(Fillies *et al.*, 2006). Podobnie jak w poprzednich

pracach badania prowadzono na archiwalnym materiale tkankowym pochodzącym od 97 chorych na drobnokomórkowego raka płuca z rozpoznaniem postawionym na podstawie badania materiału operacyjnego. Analizę ekspresji keratyn przeprowadzono na macierzach tkankowych, wykorzystując przeciwciała monoklonalne (clone AE1/AE3, Golstrup, Denmark; clone CAM5.2, Ventana, Tucson, Arizona, USA). AE1/AE3 jest mieszanką przeciwciał która wykrywa szeroki zakres keratyn, CAM 5.2 zawiera przeciwciała przeciwko Ks7 i 8. Ekspresje klonu keratyn AE1/AE3 stwierdzono w 49% przypadków przy wartości progowej 80% (mediana). W przypadku CAM5.2 zastosowano wartość progową 90% (mediana), stwierdzając ekspresję u 55% chorych. Ekspresja keratyn nie była znamienne związane z cechami klinicznymi i demograficznymi pacjentów. Przeżycia całkowite chorych z wyższą ekspresją AE1/AE3 były znamienne dłuższe w porównaniu z chorymi z niską ekspresją (mediany odpowiednio 24,7 miesiąca i 13,8 miesiąca $p=0.019$). W analizie wieloczynnikowej do której włączono stopień T, N, ekspresję CAM5.2, wiek i płeć dodatnia ekspresja AE1/AE3 była niezależnym znamieniem prognostycznym (HR 0,5; $p=0,031$).

Jest to pierwsze doniesienie wskazujące na korzystne rokowniczo znaczenie ekspresji keratyn w drobnokomórkowym raku płuca. Znajomość czynników prognostycznych może pozwolić w przyszłości lepiej kwalifikować pacjentów do indywidualizowanego leczenia. Należy jednak wziąć pod uwagę unikatowość analizowanej grupy, obejmującą wyłącznie chorych leczonych operacyjnie, a zatem w bardzo wczesnym stopniu zaawansowania oraz retrospektywny charakter prac.

3.4.3. Podsumowanie

Przedstawione prace stanowią spójną całość - dotyczą jednolitej grupy chorych na drobnokomórkowego raka płuca, w części artykułów rozszerzoną lub uzupełnioną o grupę porównawczą. Badania biologii, czynników rokowniczych i potencjalnych predykcyjnych stanowią podstawę do dalszych opracowań naukowych i badań nowych substancji w leczeniu onkologicznym. Wprowadzenie nowych leków ukierunkowanych na komórkowe szlaki sygnałowe i wpływających na reakcję immunologiczną organizmu (checkpoint inhibitors) poprawiły wyniki leczenia w wielu nowotworach. Nie dotyczy to jednak drobnokomórkowego

raka płuca, w którym nie odnotowano w ostatnich latach istotnego postępu. Wyniki przedstawionych badań znajdują praktyczne zastosowanie w trwających pracach nad nowymi lekami z grupy inhibitorów kinaz tyrozynowych, leków anty PD-L1 oraz koniugatów wykorzystujących receptor DLL3.

4. Pozostałe osiągnięcia naukowe

Pod koniec lat 90 ub. Wieku rozpocząłem prace nad unikalną grupą pacjentów leczonych operacyjnie z powodu drobnokomórkowego raka płuca we wczesnym stadium zaawansowania. Zabieg operacyjny nie jest rutynowo stosowany w tym typie nowotworu, ale dostępne w tamtym czasie metody diagnostyczne nie zawsze pozwalały na postawienie rozpoznania przed podjęciem decyzji terapeutycznych. W efekcie rozpoznanie raka drobnokomórkowego płuca stawiane było w tej grupie chorych w trakcie lub po resekcji. Wszyscy pacjenci poddawani byli następnie rutynowej chemoterapii. Opisana grupa jest wyjątkowa z dwóch względów, po pierwsze, istnieje mało danych dotyczących wartości zabiegu operacyjnego w tym typie nowotworu u chorych we wczesnym stadium zaawansowania, po drugie, dostępność materiału tkankowego z resekowanych guzów stwarza wyjątkowe możliwości badań translacyjnych nad tym nowotworem. Baza danych klinicznych pacjentów i materiału tkankowego resekowanych guzów jest od tego czasu sukcesywnie rozszerzana i aktualizowana. W moim pierwszym projekcie porównałem skuteczność leczenia chirurgicznego u 67 pacjentów oraz w grupie kontrolnej o podobnych najważniejszych cechach klinicznych ale otrzymujących rutynowe leczenie z zastosowaniem chemioterapii. W celu przeprowadzenia możliwe wiarygodnego porównania każdy pacjent z grupy kontrolnej był indywidualnie dobrany do chorego z grupy leczonej operacyjnie (metoda pair-matching). Pacjenci leczeni z udziałem zabiegu operacyjnego żyli znamienne dłużej od leczonych rutynowo (mediany czas przeżycia 22 i 11 miesięcy odpowiednio, $p < 0,001$) i dotyczyło to wszystkich chorych poza tymi, u których w materiale pooperacyjnym stwierdzono cechę N2. Pracę przedstawiającą wyniki tego badania opublikowałem w *European Journal of Cardiothoracic Surgery* (Badzio et al., 2004). Na podstawie tej analizy uzyskałem doktorat w 2000

roku. Opisana grupa operowanych chorych na drobnokomórkowego rak płuca stanowi jedną z największych tego typu opublikowanych na świecie. Po poszerzeniu bazy danych do 97 pacjentów i zgromadzeniu materiału tkankowego resektowanych guzów, sporządzono macierze tkankowe, co pozwoliło na przeprowadzeniu szeregu analiz histochemicznych i genetycznych opisanych w rozdziale dotyczącym habilitacyjnego osiągnięcia naukowego.

W 2003 opublikowałem wyniki wieloośrodkowego badania randomizowanego w którym porównaliśmy skuteczność jednorazowej dawki 8 Gy z dawką 20 Gy w 5 frakcjach w paliatywnym leczeniu chorych z bolesnymi przerzutami do kości (Badzio *et al.*, 2003). Badanie było w całości zaprojektowane i przeprowadzone we współpracy z zespołem Kliniki Onkologii i Radioterapii Akademii Medycznej w Gdańsku oraz realizowane w kilku ośrodkach radioterapii w Polsce. Dane dotyczące efektu leczenia – nasilenie efektu przeciwbólowego i czas trwania poprawy zbierane były za pomocą ankiet wypełnianych przez pacjentów w zaplanowanych odstępach czasu. Nie stwierdzono różnic w żadnym z ocenianych parametrów, co pozwoliło zarekomendować bardzo dogodny dla pacjenta leczenie pojedynczą frakcją 8 Gy jako równie skuteczne jak schemat 20 Gy w 5 frakcjach.

W latach 1998–2003 w ramach badań własnych Kliniki Onkologii i Radioterapii w Uniwersytecie Medycznym w Gdańsku uczestniczyłem w kilku projektach naukowych dotyczących rokowania i skutków ubocznych radioterapii u chorych na raka trzonu macicy. Efektem tych badań było 5 publikacji. W dwóch z nich, obejmujących 317 pacjentek otrzymujących pooperacyjną radioterapię, oceniono wczesne i późne odczyny po leczeniu (Jereczek-Fossa, Badzio and Jassem, 2003)(Jereczek-Fossa, Badzio and Jassem, 2000a). Ostre odczyny popromienne wystąpiły u 265 pacjentek (84%), u 66% ze strony jelit i u 36% ze strony pęcherza moczowego, w tym u 21 chorych doszło do poważnych powikłań w stopniu 3 i 4. Zwiększone ryzyko wystąpienia odczynu popromiennego ze strony jelit związane było z wyższą dawką całkowitą i frakcyjną z wiązki zewnętrznej i z brachyterapii oraz starszym wiekiem. Odczyny ze strony pęcherza moczowego występowały częściej w przypadku wyższej dawki z brachyterapii. W dalszej analizie przeprowadziliśmy porównanie częstości występowania późnych odczynów popromiennych w tej samej grupie chorych i zbadano korelację ich występowania z odczynami wczesnymi. Odczyny późne o różnym nasileniu wystąpiły u 158 pacjentek (51%). Poważne powikłania dotyczące pęcherza moczowego wystąpiły u 6% chorych, jelit u 2%, pochwy u 1% i kości u 4% leczonych pacjentek. Ryzyko wystąpienia

późnego odczynu jelitowego było znamienne związane z wystąpieniem ostrego odczynu w tym obszarze. Podobnej korelacji nie zaobserwowano w przypadku pęcherza moczowego. W kolejnej pracy oceniono czas bez powikłań i nawrotu raka trzonu macicy (TWIST) (Jereczek-Fossa, Badzio and Jassem, 2004), prawdopodobieństwo dwu i pięcioletniego TWIST dla wszystkich stopni odczynu wynosiło odpowiednio 50% i 30% przy medianie zaledwie 22 miesiące i 24 miesiące dla odczynów w 3 i 4 stopniu. Stosunkowy krótki czas bez nawrotu i objawów leczenia powinien zwrócić uwagę na częstość występowania odczynów popromiennych o średnim nasileniu.

Ostatnie doniesienie w nurcie badań nad rakiem trzonu macicy analizowało skuteczność ratunkowej radioterapii w chorych z nawrotem tego nowotworu po leczeniu operacyjnym (Jereczek-Fossa, Badzio and Jassem, 2000b). Przeżycia 3 i 5 letnie na poziomie 33 i 25% wskazuje na organiczną wartość radioterapii w takiej sytuacji klinicznej.

Innym przedmiotem moich zainteresowań naukowych były badania nad biologią molekularną niedrobnokomórkowego raka płuca. W latach 2002-2004 brałem udział w badaniach na mutacjami *Kras* i *p53* w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuca. W pierwszej publikacji obejmującej 95 pacjentów operowanych radykalnie z powodu tego nowotworu, oceniliśmy wartość rokowniczą mutacji genu kodującego białko p53 i jądrowego antygeny proliferacji komórek (PCNA) (Dworakowska *et al.*, 2002). Ekspresję białka p53 stwierdzono u 45% pacjentów, PCNA u 78%. Mediana przeżycia u pacjentów z ekspresją lub bez ekspresji p53 wynosiła odpowiednio 36 i 33 miesiące $p=0,73$, oraz 36 i 27 miesięcy odpowiednio u chorych z ekspresją lub bez ekspresji PCNA ($p=0,60$). Uzyskane wyniki wskazują na brak wartości rokowniczej badanych parametrów u chorych leczonych operacyjnie z powodu niedrobnokomórkowego raka płuca.

W innej pracy dotyczącej molekularnych aspektów niedrobnokomórkowego raka płuca badaliśmy obecność mutacji genów p53 i K-ras w marginesach chirurgicznych po resekcji tego nowotworu (Jassem *et al.*, 2004). Obecność tych zaburzeń genetycznych stwierdzono w 9% (p53) i 18% (K-ras) marginesów operacyjnych i odpowiednio w 30 i 39% guzów nowotworowych. Mutacje p53 i K-ras w marginesach chirurgicznych występowały odpowiednio u 24% chorych z mutacjami p53 i u 44% chorych z mutacjami *K-ras* w guzie nowotworowym. Nasze badania po raz pierwszy wskazały, że mutacje *p-53* i *K-ras* często

występują w marginesach chirurgicznych po operacji z powodu niedrobnokomórkowego raka płuca, jednak określenie znaczenia klinicznego tej obserwacji wymaga dalszych badań.

W serii badań prowadzonych w Klinice Onkologii i Radioterapii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego i dotyczących brachyterapii, analizowaliśmy czynniki wpływające na rozkład dawki w obszarze poddanym napromienianiu. Dwie publikacje dotyczyły aplikacji ginekologicznych stosowanych w leczeniu raka szyjki macicy (Elzbieta Senkus-Konefka *et al.*, 1997)(E. Senkus-Konefka *et al.*, 1997). W analizie wieloczynnikowej zidentyfikowano czynniki znamienne wpływające na dawki na pęcherz moczowy i odbytnicę: wiek, dawka w punkcie B, stopień zaawansowania choroby i liczbę porodów. Wyselekcjonowanie pacjentek u których można się spodziewać wyższych dawek na pęcherz i odbytnicę umożliwia potencjalnie lepszą kwalifikację do brachyterapii i zmniejszenia ryzyka powikłań leczenia.

W publikacji dotyczącej brachyterapii u chorych na raka piersi leczonych z zachowaniem narządu, porównaliśmy aplikację wykonaną śródoperacyjnie i wprowadzenie igieł w okolice łoża guza po zakończeniu leczenia chirurgicznego. W przypadku implantacji pooperacyjnej stwierdzono lepsze pokrycie dawką obszaru łoża po guzie niż w chorych leczonych śródoperacyjnie. Ocena ewentualnych odległe skutków klinicznych wymaga dalszych badań.

W dwóch kolejnych pracach analizowałem wraz z zespołem Kliniki Onkologii i Radioterapii Akademii Medycznej w Gdańsku techniczne aspekty radioterapii. W pierwszej z nich ocenialiśmy wpływ zmiany wymiaru bocznego w trakcie radioterapii chorych na nowotwory głowy i szyi na rozkład dawki (Senkus-Konefka *et al.*, 2006). Odchylenia w dawce w osi wiązki dochodziły do 6%. W drugiej pracy oceniliśmy wpływ technik – dwupolowej i czteropolowej na rozkład dawki u szczupłych pacjentek (Bednaruk-Młynski *et al.*, 2008) na nowotwory ginekologiczne. Wnioski wskazują na lepszy rozkład dawki w przypadku stosowania techniki 4 polowej.

Uczestniczyłem też w badaniach dotyczących raka piersi. W dwóch badaniach analizowaliśmy immunohistochemiczne czynniki wpływające na ryzyko wystąpienia przerzutów do kości u chorych na raka piersi (Sosińska-Mielcarek *et al.*, 2013)(Winczura *et al.*, 2015), stwierdziliśmy częstsze występowanie przerzutów u chorych z dodatnim receptorem estrogenowym i ekspresją osteopontyny. Badaliśmy także immunohistochemiczne czynniki związane z ryzykiem wystąpienia przerzutów do mózgowia w przebiegu raka piersi (Sosińska-

Mielcarek *et al.*, 2013), czynnikami znamienne wpływającymi na częstość rozsiewu do CUN były w tym badaniu: brak ekspresji receptora estrogenowego, ekspresja Rad51 i wysoki Ki67. W innej pracy, na dużym materiale 786 chorych, ocenialiśmy czynniki wpływające na decyzje terapeutyczne podejmowane w przypadku wystąpienia nawrotu miejscowego po leczeniu z powodu raka piersi (Sinacki *et al.*, 2011). Większość pacjentek leczonych była głównie z zastosowaniem radioterapii i chirurgii a najważniejszymi czynnikami wpływającymi na rodzaj podjętego leczenia było zaawansowanie miejscowe i regionalne wznowy.

5. Piśmiennictwo

- Antonia, S. J. *et al.* (2016) 'Nivolumab alone and nivolumab plus ipilimumab in recurrent small-cell lung cancer (CheckMate 032): a multicentre, open-label, phase 1/2 trial', *The Lancet Oncology*. doi: 10.1016/S1470-2045(16)30098-5.
- Badzio, A. *et al.* (2003) '20 Gy in five fractions versus 8 Gy in one fraction in palliative radiotherapy of bone metastases. A multicenter randomized study', *Nowotwory*, 53(3), pp. 261–264.
- Badzio, A. *et al.* (2004) 'A retrospective comparative study of surgery followed by chemotherapy vs. non-surgical management in limited-disease small cell lung cancer', *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*, 26(1), pp. 183–188.
- Bednaruk-Młynski, E. *et al.* (2008) 'Parallel-opposed fields versus four fields, and two- versus three-dimensional radiotherapy planning in thin patients with gynecological malignancies.', *Neoplasma*, 55(2), pp. 151–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18237254> (Accessed: 1 April 2016).
- Beenken, A. and Mohammadi, M. (2009) 'The FGF family: Biology, pathophysiology and therapy', *Nature Reviews Drug Discovery*. doi: 10.1038/nrd2792.
- Behrens, C. *et al.* (2008) 'Immunohistochemical expression of basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptors 1 and 2 in the pathogenesis of lung cancer', *Clinical Cancer Research*. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0167.
- Borghaei, H. *et al.* (2015) 'Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer', *New England Journal of Medicine*. doi: 10.1056/NEJMoa1507643.
- Byers, L. A. and Rudin, C. M. (2015) 'Small cell lung cancer: Where do we go from here?', *Cancer*. doi: 10.1002/cncr.29098.
- Dworakowska, D. *et al.* (2002) 'Prognostic relevance of proliferating cell nuclear antigen and p53 expression in non-small cell lung cancer', *Lung Cancer*. doi: 10.1016/S0169-5002(01)00287-2.
- Dziadziuszko, R., Camidge, D. R. and Hirsch, F. R. (2008) 'The insulin-like growth factor

pathway in lung cancer', *Journal of Thoracic Oncology*. doi: 10.1097/JTO.0b013e31818180f5.

Fillies, T. *et al.* (2006) 'Cytokeratin 8/18 expression indicates a poor prognosis in squamous cell carcinomas of the oral cavity', *BMC Cancer*, 6. doi: 10.1186/1471-2407-6-10.

Govindan, R. *et al.* (2006) 'Changing epidemiology of small-cell lung cancer in the United States over the last 30 years: Analysis of the surveillance, epidemiologic, and end results database', *Journal of Clinical Oncology*. doi: 10.1200/JCO.2005.04.4859.

Huang, C. H. *et al.* (2016) 'Impact Study: MK-0646 (Dalotuzumab), Insulin Growth Factor 1 Receptor Antibody Combined with Pemetrexed and Cisplatin in Stage IV Metastatic Non-squamous Lung Cancer', *Frontiers in Oncology*. doi: 10.3389/fonc.2015.00301.

Jassem, J. *et al.* (2004) 'P53 and K-ras Mutations Are Frequent Events in Microscopically Negative Surgical Margins from Patients with Nonsmall Cell Lung Carcinoma', *Cancer*, 100(9), pp. 1951–1960.

Jemal, A. *et al.* (2011) 'Global Cancer Statistics: 2011', *CA Cancer J Clin*. doi: 10.3322/caac.20107.Available.

Jereczek-Fossa, B. A., Badzio, A. and Jassem, J. (2003) 'Factors determining acute normal tissue reactions during postoperative radiotherapy in endometrial cancer: Analysis of 317 consecutive cases', *Radiotherapy and Oncology*. doi: 10.1016/S0167-8140(03)00029-X.

Jereczek-Fossa, B. A., Badzio, A. and Jassem, J. (2004) 'Time without symptoms and toxicity (TWIST) analysis of adjuvant radiation therapy for endometrial cancer', *Radiotherapy and Oncology*, 72(2), pp. 175–181.

Jereczek-Fossa, B., Badzio, A. and Jassem, J. (2000a) 'Recurrent endometrial cancer after surgery alone: Results of salvage radiotherapy', *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. doi: 10.1016/S0360-3016(00)00642-8.

Jereczek-Fossa, B., Badzio, A. and Jassem, J. (2000b) 'Recurrent endometrial cancer after surgery alone: Results of salvage radiotherapy', *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 48(2), pp. 405–413.

Kalemkerian, G. P. *et al.* (2013) 'Small cell lung cancer: Clinical practice guidelines in oncology', *JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network*. doi:

10.6004/jnccn.2013.0011.

LEROITH, D. *et al.* (1995) 'The Role of the Insulin-like Growth Factor-I Receptor in Cancer', *Annals of the New York Academy of Sciences*. doi: 10.1111/j.1749-6632.1995.tb26689.x.

Makino, T. *et al.* (2009) 'Cytokeratins 18 and 8 are poor prognostic markers in patients with squamous cell carcinoma of the oesophagus', *British Journal of Cancer*, 101(8), pp. 1298–1306. doi: 10.1038/sj.bjc.6605313.

Murray, N. and Turrisi, A. T. (2006) 'A review of first-line treatment for small-cell lung cancer', *Journal of Thoracic Oncology*. doi: 10.1016/S1556-0864(15)31579-3.

Nakanishi, Y. *et al.* (1988) 'Insulin-like growth factor-I can mediate autocrine proliferation of human small lung cancer cell lines in vitro', *Journal of Clinical Investigation*. doi: 10.1172/JCI113594.

Pardo, O. E. *et al.* (2009) 'The fibroblast growth factor receptor inhibitor PD173074 blocks small cell lung cancer growth in vitro and in vivo', *Cancer Research*. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1576.

Rudin, C. M. *et al.* (2015) 'Treatment of small-cell lung cancer: American society of clinical oncology endorsement of the American college of chest physicians guideline', *Journal of Clinical Oncology*. doi: 10.1200/JCO.2015.63.7918.

Rudin, C. M. *et al.* (2016) 'Safety and efficacy of single-agent rovalpituzumab tesirine (SC16LD6.5), a delta-like protein 3 (DLL3)-targeted antibody-drug conjugate (ADC) in recurrent or refractory small cell lung cancer (SCLC).', *Journal of Clinical Oncology*. doi: 10.1200/JCO.2016.34.18_suppl.LBA8505.

De Ruyscher, D. (2010) 'Treatment of limited disease small cell lung cancer', *Frontiers of Radiation Therapy and Oncology*. doi: 10.1159/000262473.

Senkus-Konefka, E. *et al.* (1997) 'Influence of brachytherapy applicators geometry on dose distribution in cervical cancer', *Strahlentherapie und Onkologie*. doi: 10.1007/BF03038915.

Senkus-Konefka, E. *et al.* (1997) 'Patient-related factors determining geometry of intracavitary applicators and pelvic dose distribution during cervical cancer brachytherapy', *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. doi: 10.1016/S0360-

3016(96)00561-5.

Senkus-Konefka, E. *et al.* (2006) 'Changes in lateral dimensions of irradiated volume and their impact on the accuracy of dose delivery during radiotherapy for head and neck cancer', *Radiotherapy and Oncology*, 79(3), pp. 304–309.

Sinacki, M. *et al.* (2011) 'Pattern of care in locally advanced breast cancer: Focus on local therapy', *Breast*, 20(2), pp. 145–150.

Sosińska-Mielcarek, K. *et al.* (2013) 'Immunohistochemical prediction of brain metastases in patients with advanced breast cancer: The role of Rad51', *Breast*. doi: 10.1016/j.breast.2013.08.011.

Spranger, S. *et al.* (2013) 'Up-regulation of PD-L1, IDO, and Tregs in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8+ T cells', *Science Translational Medicine*. doi: 10.1126/scitranslmed.3006504.

Vaira, V. *et al.* (2007) 'Regulation of survivin expression by IGF-1/mTOR signaling', *Oncogene*. doi: 10.1038/sj.onc.1210094.

Warshamana-Greene, G. S. *et al.* (2005) 'The insulin-like growth factor-I receptor kinase inhibitor, NVP-ADW742, sensitizes small cell lung cancer cell lines to the effects of chemotherapy', *Clinical Cancer Research*. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-1544.

Winczura, P. *et al.* (2015) 'Immunohistochemical Predictors of Bone Metastases in Breast Cancer Patients', *Pathology and Oncology Research*. doi: 10.1007/s12253-015-9957-0.

23.02.2019 