

IX WARSZAWSKA KONFERENCJA ONKOLOGICZNA

24 maja 2023



N
N **Narodowy**
Instytut
Onkologii

im. Marii Skłodowskiej-Curie
Państwowy Instytut Badawczy



*filles qu'au
de sentir
sont beaux
dehors lui
mes les au
et, se pro
sente de son
longueurs
ait souf
de l'Ar
à l'Ar
jours et
laisier. Tu diras
à dénomé Eve
ras fachie de la
bien que son ar
comme conséquence
priver de son man
l'était très commode
ta lui diras aussi
nrmis se portent
t lui souhaitent
avons un
ce, ce qui
Mais j'aimera
avoir moi
de brune
mais*

SKŁAD KOMISJI OCENIAJĄCEJ ABSTRAKTY

prof. dr hab. Jan Walewski

prof. dr hab. Piotr Rutkowski

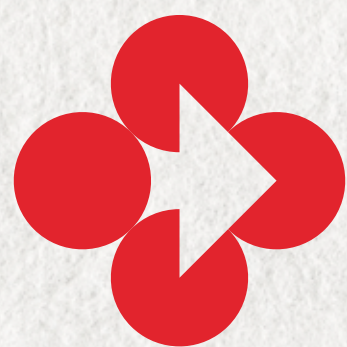
prof. dr hab. Andrzej Siedlecki

dr hab. Paweł Wiechno, prof. Instytutu

dr hab. Michał Mikula, prof. Instytutu

dr hab. Hanna Koseła-Paterczyk

ORGANIZATOR TECHNICZNY



Onco
Transfer

SPONSORZY





24 maja 2023 | 09:00-17:10

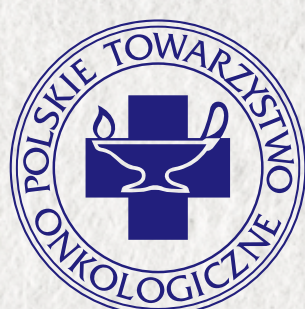
Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie
Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie

PROGRAM

SESJA I. INAUGURACYJNA | 09:00–12:30

PROWADZĄCY: Mariusz Gierej, Rzecznik Prasowy NIO-PIB

- 09:00** *Otwarcie konferencji*
prof. dr hab. Jan Walewski, prof. dr hab. Piotr Rutkowski,
dr hab. Paweł Wiechno, prof. Instytutu
- 09:15** *70 lecie Kliniki Chirurgii Onkologicznej*
prof. dr hab. Andrzej Kułakowski
- 09:30** *Narodowy Instytut Onkologii anno 2023 – osiągnięcia, wyzwania, perspektywy*
prof. dr hab. Jan Walewski
- 09:50** *Kierunki badań podstawowych w Narodowym Instytucie Onkologii*
dr hab. Michał Mikula, prof. Instytutu
- 10:05** *Rola Krajowego Ośrodka Monitorującego (TBD) Krajowej Sieci Onkologicznej*
dr hab. Adam Maciejczyk
- 10:20** *Wytyczne diagnostyczno-terapeutyczne w systemie opieki onkologicznej i Narodowej Strategii Onkologicznej*
prof. dr hab. Piotr Rutkowski
- 10:35** *Polish Mission Cancer Hub. Zadania i cele*
Agnieszka Janowska
- 10:50** *Polskie Towarzystwo Onkologiczne - platformą współpracy wielu środowisk w onkologii*
dr hab. Bożena Cybulska-Stopa
- 11:05** *Organizacje pacjenckie - projekty we współpracy z PTO i NIO-PIB*
Szymon Bubitek, Kamil Dolecki
- 11:20** *100 lat "Nowotwory"*
prof. dr hab. Wojciech Wysocki
- 11:35** *Wykład im. dr Bronisławy Dłuskiej: 25 lat onkologii w Polsce z perspektywy konsultanta krajowego*
prof. dr hab. Maciej Krzakowski



IX WARSZAWSKA KONFERENCJA ONKOLOGICZNA



24 maja 2023 | 09:00-17:10

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

11:50 *Dyskusja*

12:00 *Przerwa / Lunch*

SESJA II. NAUKOWA | 12:30-14:15

PROWADZĄCY: *prof. dr hab. Jan Walewski, prof. dr hab. Kazimierz Roszkowski-Śliż, prof. dr hab. Piotr Rutkowski*

12:30 *Uroczyste wręczenie stopni naukowych przyznanych przez Radę Naukową Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie w 2022 roku*

13:30 *Wykład laureata I nagrody za najlepszą pracę doktorską obronioną w NIO-PIB*

13:40 *Sesja plakatowa, prezentacja trzech wybranych plakatów*

14:15 *Przerwa*

SESJA III. EDUKACYJNA | 14:30-15:50

SALA 1

Wykłady edukacyjne / nowotwory układu moczowego

14:30

Wykład online: Is there a place for prostate cancer screening?
prof. Hendrik Van Poppel

14:55

Miejsce nowoczesnych leków hormonalnych w leczeniu pacjentów z rakiem stercza
dr hab. Paweł Wiechno, prof. Instytutu

15:15

Strategia leczenia pacjentów z uogólnionym rakiem nerkowokomórkowym
dr hab. Jakub Kucharz

15:35

Czy doszło do przelomu w leczeniu pacjentów z uogólnionym rakiem urotelialnym dróg moczowych?
dr hab. Paweł Wiechno, prof. Instytutu

15:50 *Przerwa*

SALA 3

Wykłady edukacyjne / nowotwory piersi

14:30

Leczenie około-operacyjne raka piersi HER2
dr hab. Barbara Radecka

14:55

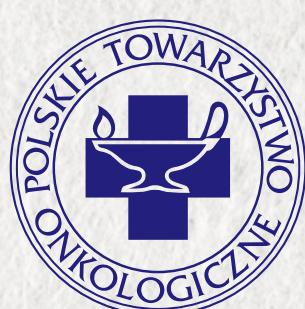
Hormonoterapia wczesnego raka piersi
dr n. med. Roman Dubiański

15:15

Perspektywy w leczeniu HER2 dodatniego uogólnionego raka piersi
dr n. med. Agnieszka Jagiełło-Gruszfeld

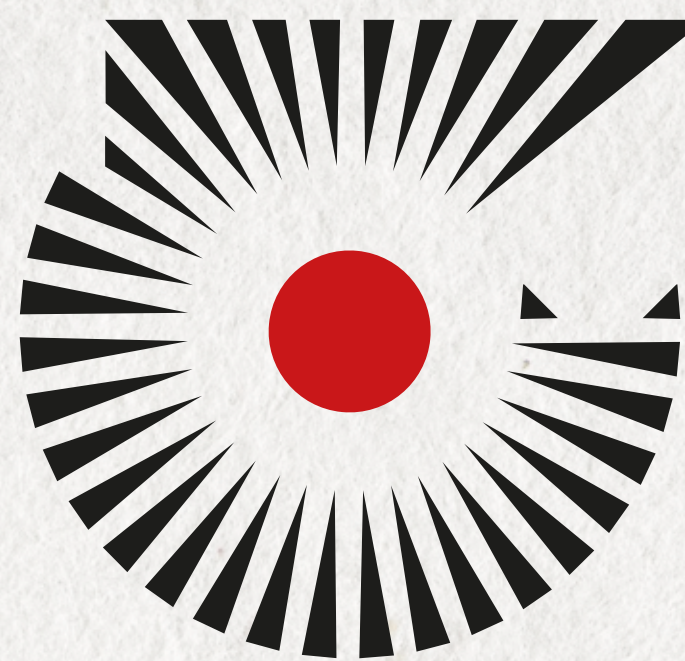
15:35

Trójnegatywny rak piersi
dr n. med. Katarzyna Pogoda





IX WARSZAWSKA KONFERENCJA ONKOLOGICZNA



24 maja 2023 | 09:00-17:10

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

SESJA III. EDUKACYJNA | 15:55-17:10

SALA 1

Wykłady edukacyjne / nowotwory płuca

15:55

Implementacja leków innowacyjnych w radykalnym leczeniu chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca

prof. dr hab. Dariusz Kowalski

16:10

Perspektywy leczenia ukierunkowanego molekularnie w niedrobnokomórkowym raku płuca

dr hab. Adam Płuzański

16:25

Perspektywy immunoterapii w niedrobnokomórkowym raku płuca

dr n. med. Magdalena Knetki-Wróblewska

16:40

Perspektywy leczenia chorych na drobnokomórkowego raka płuca i międzybłoniaka opłucnej

dr n. med. Aleksandra Piórek

16:55

Nowe technologie w radioterapii nowotworów klatki piersiowej i nowy paradygmat leczenia chorych na niedrobnokomórkowego raka płuca z oligoprogresją

dr n. med. Marta Olszyna-Serementa

17:10

Zakończenie konferencji

SALA 3

Wykłady edukacyjne / nauki podstawowe

15:55

Immuno-onkologia - dokąd zmierzamy?

dr hab. Elżbieta Sarnowska, prof. Instytutu

16:20

Potencjał wykorzystania badań metabolomicznych w onkologii

prof. dr hab. Piotr Młynarz

16:50

Organoidy jako nowoczesny model badawczy i platforma testowania terapii w onkologii

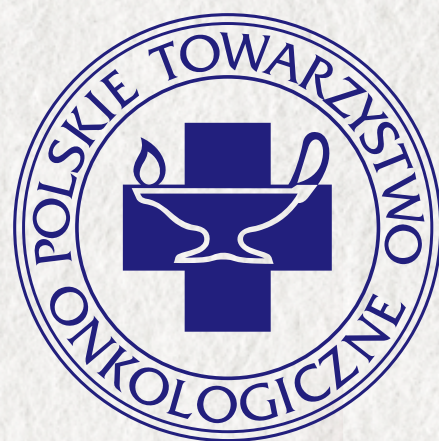
dr hab. Dawid Walerych



**Narodowy
Instytut
Onkologii**

im. Marii Skłodowskiej-Curie
Państwowy Instytut Badawczy

KSIĄŻKA ABSTRAKTÓW



**Narodowy
Instytut
Onkologii**

im. Marii Skłodowskiej-Curie
Państwowy Instytut Badawczy



SPIS ABSTRAKTÓW

STR. 11 | Berezowska Alicja

Clinical utility of HE4 and CA125 tumor markers determination and prognostic evaluation in monitoring treatment of recurrent ovarian cancer without and with mutation in BRCA1 and/or BRCA2 genes and during targeted therapy with Olaparib

STR. 12 | Bińkowski Robert

Validation of the VHHs against SS18-SSX and EZH2 proteins

STR. 13 | Błoński Piotr

Comparison of all available BRAF/MEK inhibitors' efficacy in treatment of patients with advanced melanoma

STR. 14 | Bobak Klaudia

Profil mutacyjny mięsaków tkanek miękkich

STR. 15 | Bobak Klaudia

Ocena skuteczności leczenia wielodyscyplinarnego pacjentów chorych na mięsaka nabłonkowego

STR. 16 | Chojnacka Magdalena

Ocena skuteczności leczenia wielodyscyplinarnego pacjentów chorych na mięsaka nabłonkowego
Ocena skuteczności leczenia wielodyscyplinarnego pacjentów chorych na mięsaka nabłonkowego

STR. 17 | Czarnecka Anna M.

Evaluation of long-term effectiveness of neoadjuvant immunotherapy in the treatment of oligoprogression and borderline resectable stage III B-D or IV melanoma

STR. 18 | Czarnecka Anna M.

Ipilimumab as a second-line treatment in patients with advanced melanoma - Real-world data from the reference centre

STR. 19 | Ćwiek Paweł

Construction of innovative platform based on Arabidopsis, human cell lines, mice, VHH and chemoinformatics modelling for identification of drugs targeting metabolome-related human diseases

STR. 20 | Garbicz Damian

Anti-CD19 nanobodies and CAR-T cells

STR. 21 | Iwaneczko Edyta

Czy zachorowanie na nowotwór jądra i leczenie mają negatywny wpływ na seksualność pacjenta?

STR. 22 | Jagodzińska-Mucha Paulina

A nomogram model to predict the overall survival of adolescent and young adult (AYA) patients with locally advanced Ewing sarcoma

STR. 23 | Jozghorbani Maryam

Investigation of the stimulatory effect of brain extract and glucose treatment on salivary gland adenoid cystic carcinoma (SACC) cell line

STR. 24 | Kluebsoongnoen Jakkapong

Penaeus monodon – a shrimp model for functional studying of steroid hormone role in modulating ovary development

STR. 25 | **Knetki-Wróblewska Magdalena**

Ocena wartości immunochemioterapii u chorych z rozpoznaniem niedrobnokomórkowego raka płuca i ekspresją PD-L1<1%. Dane z praktyki klinicznej w Polsce

STR. 26 | **Knetki-Wróblewska Magdalena**

Skuteczność pembrolizumabu u chorych z rozpoznaniem niedrobnokomórkowego raka płuca i przerzutami do mózgu – dane z codziennej praktyki

STR. 27 | **Łuba Maciej**

The importance of PD-L1 ligand expression and the T cell type infiltration in the assessment of the prognosis of clear cell renal cell carcinoma

STR. 28 | **Makówka Agata**

Evaluation of the prognostic value of the systemic response to inflammatory markers (SII, SIRI) in breast cancer patients qualified for neoadjuvant treatment

STR. 29 | **Olczak Bartłomiej**

Ocena ekspresji receptora witaminy D i białka CYP27B1 w przebiegu raka pęcherza moczowego in vitro oraz u pacjentów po zabiegach cystektomii oraz TURBT

STR. 30 | **Paszowska Monika**

Wolny płąt promieniowy w materiale Kliniki Nowotworów Głowy i Szyi Narodowego Instytutu Onkologii w Warszawie

STR. 31 | **Pojda Zygmunt**

Chemotactic secretome profiling of glioblastoma multiforme cell lines and human mesenchymal stromal cells in 3D bioprinted co-cultures

STR. 32 | **Rzepecka Iwona**

20 lat terapii celowanej w nowotworach GIST – opis przypadku

STR. 33 | **Sadaf Hummaira**

Does PD-L1 signaling effect the epigenetic alteration in classic Hodgkin lymphoma?

STR. 34 | **Saensuwanna Apisara**

Inhibitory effects of epidrugs on salivary gland adenoid cystic carcinoma (SACC) cells through regulating BRM expression

STR. 35 | **Sobczuk Paweł**

Modulacja splicingu RNA jako potencjalny cel terapeutyczny w złośliwym guzie rabdoidalnym

STR. 36 | **Spatek Mateusz**

Preoperative radiotherapy with hyperthermia in recurrent and radiation-induced sarcomas: results of a phase 2 clinical trial

STR. 37 | **Stawarz Grzegorz**

The evaluation of molecular changes in renal clear cell carcinoma

STR. 38 | **Stawarz Kasia**

The evaluation of molecular changes in Adenoid Cystic Carcinoma (ACC) in salivary gland

STR. 39 | **Szarkowska Joanna**

The role of BRCA1 and RNR subunits in ccRCC

été 1925 Vendredi
mon chérie,
jeune que tu vas être à
Paris dans un jour
à l'Arcouest dans
quelques jours et cela me fait
bien plaisir. Tu diras au petit
monstre dénommé Eve que j'en

STR. 40 | Szumera-Ciećkiewicz Anna

SATB2, CKAE1/AE3 i synaptofizyna jako rekomendowany panel immunohistochemiczny do wykrywania przerzutów raka z komórek Merkla do węzłów chłonnych

STR. 41 | Szurmak Jakub

The impact of changes in the chromatin remodeling machinery in clear cell renal cell carcinoma

STR. 42 | Świętek Monika

Glycoprotein S from SARS-CoV-2 acts like superantigen and alters expression in human immune cells

STR. 43 | Świć Agnieszka

Persistently activated CD4+ T cells induce the expression of PD-L1 and the expression of metastasis markers in HER-2-positive breast cancer cells

STR. 44 | Wilga Magdalena

The role of alterations of epigenetic machineries on the development and progression of clear cell renal cell carcinoma

STR. 45 | Zajac Agnieszka

Ocena zmian genetycznych w chrzestniakomięsakach ocenianych celowanym panelem genetycznym

STR. 46 | Zajac Agnieszka

Molecular characteristics of sarcomas diagnosed in Maria Sklodowska-Curie National Research Institute Of Oncology Using Targeted Sequencing

Clinical utility of HE4 and CA125 tumor markers determination and prognostic evaluation in monitoring treatment of recurrent ovarian cancer without and with mutation in BRCA1 and/or BRCA2 genes and during targeted therapy with Olaparib

Alicja Berezowska ¹, Małgorzata Fuksiewicz ², Magdalena Kowalska ³, Mariusz Bidziński ³, Beata Kotowicz ²

¹ Department of Experimental Immunotherapy, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology

² Independent Laboratory of Biomarkers, Cancer and Cytokines, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology

³ Department of Gynecologic Oncology, Maria Skłodowska Curie National Research Institute of Oncology

Background

In recent years, much attention has been paid to the genetic predisposition of ovarian cancer and abnormalities in BRCA gene sequences. In patients with confirmed mutation in these genes, treatment with PARP inhibitor is possible after systemic treatment. The aim of the present study was to determine the clinical utility and predictive value of CA125 and HE4 tumor marker concentrations in assessing response to systemic treatment and PARP inhibitor treatment.

Methods

Serum concentrations of CA125 and HE4 were determined by electrochemiluminescence. Mutation status in BRCA genes was determined by NGS - next-generation sequencing.

Material

111 patients were enrolled in the study, with confirmed recurrence of ovarian cancer before the start of the next line of systemic treatment. Targeted therapy with PARP inhibitor (Olaparyb) was implemented in 48 patients.

Results

Systemically treated patients showed that elevated levels of CA125 and HE4 correlated with clinical presentation according to CT scans. Proprietary cut-off points for marker concentrations, differentiating patients with progression up to one year after the end of treatment, were lower than those recommended by the reagent kit manufacturer. One year after completion of treatment, as many as 93% of patients without a confirmed mutation had elevated CA125 levels, while in patients with a confirmed mutation, the percentage was only 36%. Moreover, in BRCA-positive patients, both disease-free time and overall survival time were significantly longer ($p < 0.001$). In patients, with maintenance therapy in place, the stronger diagnostic power of CA125 for detecting recurrence during treatment was demonstrated ($p < 0.0001$). The apparent slow increase in CA125 cutoff points indicated the occurrence of recurrence despite Olaparib maintenance therapy.

Conclusions

Regardless of mutation status, tumor markers have predictive value in assessing response to systemic therapy. CA125 and HE4 concentrations determined during therapy and one year after completion of therapy correlate with imaging findings. An increase in their concentrations between the 3rd and 6th courses of chemotherapy indicates disease progression up to one year after the end of treatment. In patients with the mutation, marker concentrations are lower during CHTH, and relapse is confirmed in a lower percentage of patients, indicating a better response to treatment. Both the progression-free period and overall survival time are longer than in patients without the mutation. Determination of CA125 concentrations has greater clinical utility and predictive value than HE4 and plays a key role in estimating the efficacy of Olaparib maintenance treatment.

Validation of the VHHs against SS18-SSX and EZH2 proteins

R. Binkowski ¹, P. Cwiek ¹, S. Kubala ¹, M. Stachowiak ², J. Steciuk ¹, E. Sarnowska ², T. Sarnowski ¹

¹ *Institute of Biochemistry and Biophysics Polish Academy of Sciences*

² *Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology, Warsaw, Poland*

Introduction

Chromatin remodeling complexes (CRC) constitute an important group of proteins that control genes expression by modification of the chromatin structure. One of the best studied CRC is SWI/SNF complex, with mutations in genes encoding its subunits resulting in changes in the distribution of nucleosomes in chromatin and deregulation of expression of numerous genes. SWI/SNF complexes play an important role in the eviction of Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) which is involved in DNA and histones modification, and acts predominantly in opposition to the SWI/SNF complex. SS18 protein, one of the subunits of the SWI/SNF complex fuses with SSX protein in synovial sarcoma, resulting in the formation of the pathological SS18-SSX fusion protein, characteristic for this cancer. The EZH2 protein is the central subunit of the PRC2 with methyltransferase properties. The aim of my project is to evaluate the effects of sudden induced inactivation of SS18-SSX and EZH2 proteins in synovial sarcoma cell lines using specific VHH.

Materials and Methods

The SS18-SSX protein was overexpressed and purified. The biopanning procedure was performed in frame of the Phage Display. Phages were rescued from the immunologically naïve library. ELISA tests were performed with isolated VHH.

Results

The SS18-SSX and EZH2 proteins were used as baits to search for the specific VHHs using biopanning procedure. There was an enrichment of colonies number on the dishes in study group where proteins were incubated with phages in contrast with control group. Subsequently, I validated the binding specificity of the obtained VHHs in ELISA test and received colonies containing sequences of specific VHH.

Conclusions

Preliminary results of ELISA tests show the presence of the specific VHHs targeting SS18-SSX and EZH2. Their sequences will be cloned into the mammalian expression vector and the effects of precise inactivation will be observed.

Financial support

The work was supported by the National Science Center grant No. 2018/30/M/NZ1/00180 for TJS.

Comparison of all available BRAF/MEK inhibitors' efficacy in treatment of patients with advanced melanoma

Piotr Błoński^{1,2}, Anna Czarnecka¹, Krzysztof Ostaszewski¹, Gustaw Laskowski^{1,2}, Mikołaj Zajdel^{1,2}, Tomasz Świtaj¹, Paweł Rogala¹, Katarzyna Kozak¹, Hanna Koseła-Paterczyk¹, Piotr Rutkowski¹

¹ Department of Soft Tissue/Bone Sarcoma and Melanoma, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology, Warsaw, Poland

² Faculty of Medicine, Medical University of Warsaw, 02-091 Warsaw, Poland

Introduction

All combinations of BRAF and MEK inhibitors: vemurafenib plus cobimetinib, dabrafenib plus trametinib and encorafenib plus binimetinib belong to the preferable medications for patients with advanced melanoma. The aim of this study was to directly compare these agents – in terms of efficacy as first-line treatment– in real-world conditions.

Materials and methods

In this study electronic medical records were retrospectively reviewed and a total number of 247 patients met the inclusion criteria. Patients treated for advanced cutaneous or mucosal BRAF-mutated melanoma, who started their treatment between 1st October 2015 and 31st July 2021, were enrolled. The follow-up is ongoing and the last revision took place on the 2nd May 2023. The first-line treatment of all patients was targeted therapy with BRAF/MEK inhibitors. Patients receiving adjuvant therapy, enrolled in clinical trials or previously treated with other systemic therapies were excluded from the analysis. Data analysis was performed with Kaplan-Meier estimator and logrank test.

Results

247 patients were included in this study. Within this group, 215 (87%) were treated with dabrafenib plus trametinib and their median progression-free survival (mPFS) was 6.7 months (95% CI: 6-9.2). There were 26 (11%) patients treated with vemurafenib plus cobimetinib and they achieved mPFS of 6.3 months (95% CI: 4.4-13.9). Moreover, 6 (2%) patients treated with encorafenib plus binimetinib were enrolled. Their mPFS was 7.8 months (95% CI: 6.2-Not reached). No significant difference has been observed between subgroups treated with distinct combinations of BRAF/MEK inhibitors in terms of progression-free survival and overall survival ($p = 1$ and $p = 0.5$, respectively). In the total group of 246 patients, the mPFS was 6.7 months (95% CI: 6-8.7) and the median overall survival was 12.6 months (95% CI: 10.4-14.6).

Conclusions

In this real-world study, the analogous efficacy of all available in clinical practice BRAF/MEK inhibitors has been observed in patients treated for advanced melanoma, allowing them to achieve clinical benefits. Larger groups should be studied, to confirm these preliminary results.

Profil mutacyjny mięsaków tkanek miękkich

Klaudia Bobak¹, Andrzej Tysarowski², Katarzyna A. Seliga², Mateusz J. Spątek^{1 3}, Anna Szumera-Ciećkiewicz^{4 5}, Kamil Sokół⁴, Michał Wągródzki⁴, Hanna Koseła-Paterczyk¹, Piotr Rutkowski¹, Anna M. Czarnecka^{1 6}

¹ Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie, Klinika Nowotworów Tkanek Miękkich, Kości i Czerniaków

² Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie, Zakład Diagnostyki Genetycznej i Molekularnej Nowotworów

³ Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie, Zakład Radioterapii I

⁴ Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie, Zakład Patologii i Diagnostyki Laboratoryjnej

⁵ Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Zakład Diagnostyki Hematologicznej

⁶ Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk, Zakład Farmakologii Doświadczalnej

Wstęp

Mięsaki tkanek miękkich (MTM) to grupa rzadkich, heterogennych nowotworów, które stanowią mniej niż 1% guzów litych u dorosłych. Znanych i opisanych jest ponad 100 podtypów MTM. Ze względu na wysoką heterogenność tego typu nowotworów, trudno jest postawić odpowiednią diagnozę. Celem badania była ocena zmian genetycznych w MTM, które mogłyby posłużyć jako potencjalne biomarkery diagnostyczne.

Materiały i metody

Przeanalizowano materiał z biopsji cienkoigłowej zatopiony w bloczkach parafinowych 19 pacjentów sprzed leczenia, którzy wzięli udział w badaniu klinicznym II fazy (NCT03651375), w tym 10 chorych na niezróżnicowanego mięsaka pleomorficznego (UPS), 1 chory na mięśniakomięsaka gładkokomórkowego (LMS), 5 chorych na włókniakomięsaka śluzowatego (MFS), 1 chory na tłuszczakomięsaka pleomorficznego (PLPS), 1 chory na odróżnicowanego tłuszczakomięsaka (DDLPS), 1 chory na złośliwego guza ośronek nerwów obwodowych (MPNST). Do sekwencjonowania następnej generacji (NGS) użyto TruSight™ Oncology 500, firmy Illumina.

Wyniki

U chorego na DDLPS została wykryta amplifikacja genów CDK4 i MDM2, które są charakterystyczne dla tego podtypu MTM. Substytucja genu NF1 wystąpiła jedynie u chorego na MPNST. Zmiany genetyczne genu NF1 są powszechne u pacjentów z MPNST. Mutację genu TP53 wykazano u chorych na UPS i MFS, a u pacjenta z MFS wykryto mutację genu RB1. Mutacje genów TP53 oraz RB1 często są opisywane u pacjentów z tymi podtypami. Dodatkowo te same warianty genów TP53, FGFR4, KDR, CCND3 wystąpiły zarówno u pacjentów chorych na UPS jak i na MFS. Amplifikacja genów CCND1 i EGFR oraz utrata genu PTEN również pokrywała się między przypadkami UPS i MFS, co może potwierdzać hipotezę, że oba te podtypy mimo różnych fenotypów mogą mieć wspólne pochodzenie.

Wnioski

W przypadku występowania charakterystycznego zaburzenia molekularnego dla danego podtypu MTM, badania z wykorzystaniem technologii NGS mogą potwierdzić lub zmienić rozpoznanie.

Ocena skuteczności leczenia wielodyscyplinarnego pacjentów chorych na mięsaka nabłonkowego

Klaudia Bobak¹, Anna M. Czarnecka^{1 3}, Aneta Borkowska^{1 2}, Paweł Teterycz^{1 4}, Sylwia Kopeć¹, Mateusz Spałek^{1 5}, Marcin Zdzienicki¹, Jakub Śledź¹, Tomasz Świtaj¹, Anna Szumera-Ciećkiewicz^{6 7}, Bartłomiej Szostakowski¹, Tadeusz Morysiński¹, Sławomir Falkowski¹, Piotr Rutkowski¹

¹ Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie Państwowy Instytut Badawczy, Klinika Nowotworów Tkanek Miękkich, Kości i Czerniaków

² Politechnika Warszawska, Centrum Zaawansowanych Materiałów i Technologii CEZAMAT

³ Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk, Zakład Farmakologii Doświadczalnej

⁴ Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie, Zakład Matematyki Onkologicznej

⁵ Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie, Zakład Radioterapii I

⁶ Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie, Zakład Patologii i Diagnostyki Laboratoryjne,

⁷ Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Zakład Diagnostyki Hematologicznej

Wstęp

Mięsak nabłonkowy (MN, ang. epithelioid sarcoma) jest rzadko występującym nowotworem z grupy mięsaków tkanek miękkich (MTM). Dane dotyczące długoterminowej skuteczności leczenia pacjentów z MN są nadal ograniczone, głównie ze względu na rzadkość występowania choroby. Celem tego badania była analiza długoterminowego przeżycia pacjentów z MN leczonych w ośrodku referencyjnym.

Materiały i metody

Oceniono długoterminowe wyniki leczenia chorych z rozpoznaniem MN leczonych w Klinice Nowotworów Tkanek Miękkich, Kości i Czerniaków Narodowego Instytutu Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie w latach - 1998-2022. Do oceny przeżycia wykorzystano estymator Kaplana-Meiera.

Wyniki

Mediana wieku pacjentów w trakcie diagnozy wynosiła 38 lat (17 – 79 lat). Spośród 87 kolejnych pacjentów włączonych do analizy, 30 pacjentów (34,48%) poddano resekcji guza pierwotnego w naszym ośrodku, 54 pacjentów (62,07%) było operowanych w szpitalu rejonowym, a 3 pacjentów (3,45%) otrzymało chemioterapię paliatywną. Spośród leczonych radykalnie w NIO-PIB 28 pacjentów otrzymało leczenie przedoperacyjne: 23 przedoperacyjną radioterapię, 3 przedoperacyjną chemioterapię, a 2 leczenie wielodyscyplinarne przedoperacyjne. Spośród chorych, u których wyjściowo guz pierwotny resekowano w rejonie żaden nie otrzymał leczenia przedoperacyjnego. Nasz zespół uzyskał resekcję R0 u 19 chorych. W NIO-PIB pooperacyjną radioterapię zastosowano u 4 chorych z powodu resekcji R1 lub R2. U 10 chorych zespół NIO-PIB przeprowadził radykalizację po resekcji w rejonie, a u 13 resekcję wznowy miejscowej po leczeniu w rejonie. Spośród chorych leczonych wyjściowo radykalnie w NIO-PIB u 5 pacjentów (13,16%) wystąpiła wznowa miejscowa, a u 10 pacjentów (26,32%) doszło do rozsiewu choroby. Mediana czasu wolnego od nawrotu (RFS ang. relapse-free survival) u chorych operowanych w NIO-PIB wyniosła 83,5 miesięcy, a 4,4 miesięcy kiedy guz pierwotny radykalnie operowano w rejonie.

Wnioski

Chorzy na MN po biopsji diagnostycznej powinni być oceniani przez MDT. Zgodnie z wytycznymi ESMO/NCCN oraz zaleceniami polskimi chorzy wysokiego ryzyka powinni otrzymać leczenie wielodyscyplinarne, preferencyjnie w ośrodkach referencyjnych takich jak NIO-PIB.

Ocena skuteczności leczenia wielodyscyplinarnego pacjentów chorych na mięsaka nabłonkowego

Beata Kotowicz ¹, Małgorzata Fuksiewicz ¹, Magdalena Chojnacka ¹, Piotr Kucha ², Edyta Zagórowicz ^{2 3}

¹ *Independent Laboratory of Tumor Biomarkers and Cytokines, The Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology, Warsaw, Poland*

² *Department of Gastroenterology, The Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology, Warsaw, Poland*

³ *Department of Gastroenterology, Hepatology, and Clinical Oncology, Center of Postgraduate Medical Education, Warsaw, Poland*

Introduction

Infliximab (IFX) and vedolizumab (VDZ) are monoclonal antibodies used for the treatment of inflammatory bowel diseases such as Crohn's Disease (CD) and ulcerative colitis (UC). The biological drugs concentration must be high enough for a therapeutic response. The aim of the study was to evaluate the correlation of biologic drug concentrations: IFX/VDZ with clinical condition of patients with inflammatory bowel disease (IBD) during therapy.

Material and methods

The study comprised 100 patients with IBD treated with VDZ and IFX antibodies. Blood samples were collected before control visit and administration of the next drug dose. Serum drugs were determined by ELISA with RIDASCREEN kits from R-Biopharm-AG. The Mann-Whiney test of the program Statistica PL. 9.0 (StatSoft) were used for statistical calculations, and ROC curves from MedCalc software were used to assess diagnostic power.

Results

Analysis of group patients with UC treated with VDZ revealed no significant association between drug levels and clinical condition of patients. However, the highest median serum concentrations of VDZ observed in patients with a clinical response. In addition, the largest differences between medians in patients with a clinical response (21.5 ug/ml) and in patients without a response (15.9 ug/ml) were obtained. The median VDZ serum concentration during the maintenance phase in patients with endoscopic remission remained at similar levels (12.4 ug/ml; 12.7 ug/ml), while their decrease was shown in patients without remission (10.1 ug/ml; 8.8 ug/ml). Receiver operating curves analysis were used to determine the VDZ cut-off value to differentiate UC patients with endoscopic remission or endoscopic response after treatment from patients not responding to treatment, but no statistical significance was found (AUC= 0.629; AUC=0.641). Due to the small group of patients with CD treated with VDZ, analyses were not performed. In the group patients with CD, up to 91% of patients responded to treatment with IFX in the maintenance phase.

Conclusions

The measurement of serum concentrations of biological drugs can be a useful monitoring tool in the treatment of IBD. However, this study is a pilot study and requires larger study groups, longer follow-up time and analysis of blood drug concentrations during treatment of patients.

Evaluation of long-term effectiveness of neoadjuvant immunotherapy in the treatment of oligoprogression and borderline resectable stage III B-D or IV melanoma

Krzysztof Ostaszewski ^{1 ^}, Anna M. Czarnecka ^{1 ^}, Piotr Błoński ^{1 2}, Katarzyna Kozak ¹, Joanna Placzke ¹, Anna Terlecka ^{1 2}, Paweł Rogala ¹, Monika Dudzisz-Śledź ¹, Tomasz Świtaj ¹, Beata Mitręga-Korab ¹, Maciej Sałamacha ¹, Anna Szumera-Ciećkiewicz ³, Aneta Borkowska ¹, Donata Makuła ⁴, Piotr Rutkowski ¹

¹ *Department of Soft Tissue/Bone Sarcoma and Melanoma, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology*

² *Faculty of Medicine, Medical University of Warsaw*

³ *Department of Pathology and Laboratory Diagnostics, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology*

⁴ *Department of Radiology I, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology*

[^] *Equal contribution*

Introduction

Neoadjuvant therapy has gained significant importance in patients with advanced melanoma, as confirmed by the results of the S1801 trial (NCT03698019) presented at the 2022 ESMO Congress. Currently, there is no data from routine clinical practice regarding multidisciplinary treatment of melanoma that includes preoperative immunotherapy. The aim of this study was to evaluate the effectiveness of neoadjuvant treatment in patients with borderline resectable stage III or IV melanoma in a reference center setting.

Materials and Methods

Patients with melanoma who underwent preoperative immunotherapy with anti-PD1 and anti-PD1 with anti-CTLA-4 between 1/08/2016 and 01/09/2021 were included in the analysis. Preoperative treatment was administered for at least 8 weeks. Adjuvant treatment was administered for at least 1 year after resection. Imaging studies were performed every 3 months. Patients were followed up until 30.04.2023.

Results

Nineteen patients received nivolumab, 15 received pembrolizumab, 2 received nivolumab with ipilimumab, and 2 received ipilimumab. R0 resection was achieved in 79% of patients. The most common procedures were lymphadenectomy or resection of nodal recurrence. The median follow-up time was 38.7 months. At the time of analysis, 42% of patients were free of disease progression. Nine patients experienced disease progression during postoperative immunotherapy, and 8 were on drug holidays. The most common sites of disease progression were skin and subcutaneous tissue, followed by lung and central nervous system. Local recurrence occurred in 13% of patients. The 1-year RFS was 78%, 2-year was 64%, and 3-year was 41%, while the OS was 97%, 90%, and 83%, respectively. The incidence of complications during the postoperative period was similar to historical data for lymphadenectomy procedures, with complications occurring in 3 patients. No patient died during preoperative treatment due to immunotherapy toxicity or disease progression. Six patients experienced immunotherapy-related toxicity during the preoperative period, with cardiac toxicity being the most common. 26% of patients died by the time of analysis.

Conclusions

In routine clinical practice, patients with advanced melanoma are treated with immunotherapy or BRAFi/MEKi combination therapy. Due to the demonstrated possibility of long-term disease control after neoadjuvant treatment, the subgroup with borderline resectable lesions should be referred to reference centers to check eligibility for clinical trials.

Ipilimumab as a second-line treatment in patients with advanced melanoma - Real-world data from the reference centre

Barbara Buchalska ^{1 2 ^}, Julia Szymkiewicz ^{1 2 ^}, Piotr Błoński ^{1 2}, Krzysztof Ostaszewski ¹, Tomasz Świtaj ¹, Paweł Rogala ¹, Monika-Dudzisz-Śledź ¹, Anna Klimczak ¹, Piotr Rutkowski ¹, Anna M. Czarnecka ¹

¹ *Department of Soft Tissue/Bone Sarcoma and Melanoma, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology*

² *Faculty of Medicine, Medical University of Warsaw*

[^] *Equal contribution*

Introduction

The anti-CTLA4 drug ipilimumab was shown to be effective in patients with advanced melanoma in a phase III trial. However, results of treatment in routine practise are often challenged by different patient characteristics, that is, comorbidities, presence of brain metastases and a poor advanced percentage of patients. The aim of this study was to evaluate the results of second-line palliative treatment with ipilimumab in patients with advanced melanoma treated in the reference melanoma centre.

Materials and Methods

Subsequent patients with advanced unresectable or metastatic melanoma were enrolled. Ipilimumab was used as a second line of treatment. All patients received anti-PD1 therapy in the first line (nivolumab or pembrolizumab). Ipilimumab was administered intravenously at a dose of 3 mg/kg every 3 weeks. The patients started treatment between 1/01/2016 and 31/12/2021. The data cut-off was 30/04/2023. Patients were treated according to the inclusion and follow-up guidelines of the Drug Reimbursement programme.

Results

At the time of the analysis 70 patients with a median age of 66.5 (20 to 92) years were treated in NIO-PIB. The median overall survival since the start of ipilimumab treatment was 7.6 months (95 CI 5.9-11), and the median progression-free survival after ipilimumab treatment was 2.8 months. The longest progression free survival was 49.5 months. The objective response (complete or partial) response was observed in 4 patients (5.7%). Immune-related adverse events were observed in 39 patients (55.7%). Among the adverse effects, the most common were liver toxicity, diarrhoea, and maculopapular rash. At the time of analysis, 9 patients were alive.

Conclusions

Ipilimumab as a second line of treatment is beneficial in patients with advanced melanoma who progressed with anti-PD-1 therapy. However, many patients must deal with the adverse effects of treatment.

Construction of innovative platform based on Arabidopsis, human cell lines, mice, VHH and chemoinformatics modelling for identification of drugs targeting metabolome-related human diseases

Pawel Cwiek ¹, Szymon Kubala ¹, Joanna Szarkowska ², Malgorzata Stachowiak ², Marcin Leszczyński ², Anna Balcerak ², Wagner L. Araújo ³, Takayuki Tohge ³, Alidair R. Fernie ³, Csaba Koncz ^{4 5}, Pawel Siedlecki ², Janusz Siedlecki ², Elzbieta Sarnowska ^{2 ^}, Tomasz J. Sarnowski ^{1 ^}

¹ *Institute of Biochemistry and Biophysics Polish Academy of Sciences, Department of Protein Biosynthesis, Poland*

² *Maria Sklodowska-Curie National Research Institute of Oncology, Warsaw*

³ *Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology, Potsdam, Germany*

⁴ *Max-Planck Institut für Pflanzenzüchtungsforschung, Köln, Germany*

⁵ *Institute of Plant Biology, Biological Research Center of Hungarian Academy, Szeged, Hungary*

[^] *Equal contribution*

Introduction

Tumors are featured by the impairment of various important regulatory processes including chromatin structure control and gene expression by SWI/SNF-type chromatin remodeling complexes (CRCs) as well as mRNA splicing. Such disturbances lead to alterations at the transcriptomic or proteomic levels and affect important cellular regulatory processes like metabolism. TOR hyperactivation and metabolic alterations are typical for clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) which is treated with TOR kinase inhibitors.

Materials and Methods

In our study we used Arabidopsis thaliana model plants and HeLa or A498 human cell lines to examine evolutionarily conserved processes among eukaryotes and VHH based platform for protein targeting.

Results

We show that the nuclear fraction of mTOR kinase interacts with the subunit of NineTeen Complex (NTC) involved in mRNA splicing and TOR pathway controls NTC and SWI/SNF CRCs subunit phosphorylation. We found the TOR-SWI/SNF interaction and show that inactivation of SWI/SNF complex causes TOR hyperactivation. The SWI/SNF CRCs and TOR kinase directly bind to fructose-1,6-bisphosphatase (FBP1) gene promoter region and regulate its expression. We found that the mTOR inhibitor-everolimus, a drug used in oncology, does not significantly affect the transcriptome of the wild plant Arabidopsis thaliana while it causes widespread transcriptomic changes in swi3c mutant with inactivated core SWI/SNF subunit. We constructed a platform employing the swi3c mutants as test plants to search for substances acting similarly to everolimus. We are currently using the system established in our lab, to find VHH recognizing the catalytic part of the TOR kinase to block its activity.

Conclusions

Our study indicated the existence of ancient, evolutionarily conserved, multilevel cellular control system involving SWI/SNF-dependent chromatin remodeling, RNA splicing and metabolism regulation. Our results enabled to better understand the genesis of molecular changes observed in ccRCC, thus, may serve as a solid basis for establishment of new, future anticancer therapy.

Financial support

National Science Center grant No. UMO-2018/30/M/NZ1/00180 (TJS)

Anti-CD19 nanobodies and CAR-T cells

Damian Garbicz ¹, Daniel Bajerski ¹, Monika Świątek ¹, Joanna Szarkowska ¹, Agnieszka Świć ¹, Ryszard Konopiński ¹, Elżbieta Sarnowska ¹

¹ *Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology, Roentgena ⁵, Warsaw, Poland*

Introduction

The chimeric antigen receptor (CAR) is a genetically modified receptor protein consisting of an extracellular antigen-binding fragment, a spacing domain, a transmembrane domain and an intracellular signaling domain. Recognition of the target antigen by CAR-containing T cells (CAR-T) leads to their activation. Conventionally, the variable domains of the antibody light chain (VL) and heavy chain (VH) are used as the antigen recognition and binding fragment. However, in recent years, much attention has been focused on nanobodies (Nb, VHH). In camelid antibodies, among others, which contain only heavy chains with no light chains, there is a single variable domain on each heavy chain, referred to as the VHH domain. Nanobodies are small particles, with a molecular weight of about 15 kDa, which is ten times smaller than the molecular mass of a human IgG-type antibody. Due to their structure and hypervariability, VHH easily adapt to new conditions and are characterized by a relatively easy acquisition procedure. CD19 protein is as an adaptor protein which drafts cytoplasmic signaling proteins to the membrane and operates within the CD19/CD21 complex to decrease the threshold for B cell receptor signaling pathways. CD19 is present on all B cells, and therefore is a biomarker for lymphoma diagnosis, B lymphocyte development and can be used as a target for immunotherapies.

Materials and Methods

A library of nanobodies, in phagmid pSEX81, was prepared from B lymphocytes from alpaca blood immunized with CD19 protein. Phage display and biopanning techniques were used to select nanobodies potentially interacting with the CD19 protein. The interactions were confirmed using an immunoenzymatic assay - ELISA. The selected Nb together with the CAR construct were cloned into eukaryotic plasmid pcDNA3.1 and transfected into T lymphocytes and HeLa cell line.

Results and Conclusions

More than 100 positive hits were obtained after ELISA. Analysis of their sequence allowed the selection of 20 different anti-CD19 nanobodies. Eight, the most frequent ones were cloned together with the CAR construct into the pcDNA3.1 plasmid by two different methods. Transfection of T-lymphocytes showed that about 20% of them expressed the obtained construct on their surface. It was also noted that the transfected HeLa cells showed high sensitivity to the obtained CAR constructs compared to control cells. Using Western blot technique, it was shown that HeLa cells expressed CD19 protein.

Funding

Medical Research Agency 2020/ABM/04/00002-01.

Czy zachorowanie na nowotwór jądra i leczenie mają negatywny wpływ na seksualność pacjenta?

Edyta Iwaneczko ¹, Wojciech Michalski ³, Bożena Sikora ², Grażyna Poniatońska ²,
Paweł Wiechno ²

¹ *AplusMed – praktyka seksuologiczna, Warszawa*

² *Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie (NIO-PIB), Klinika Nowotworów Układu Moczowego*

³ *BIOSTAT – Statystyczna Analiza Danych Klinicznych i Eksperymentalnych*

Wstęp

Rozpoznanie i leczenie nowotworu jądra (NJ) sprawia, że towarzyszący pacjentowi stres może doprowadzić do długotrwałego pogorszenia jakości życia, której elementem jest także satysfakcja seksualna a obserwowane w tej grupie niedobory testosteronu (T) mogą potęgować problemy. Zachorowanie na nowotwór złośliwy w młodym wieku może zaburzać procesy rozwojowe, w tym sfery seksualnej. Problem ten jest zwykle niedostrzegany w praktyce klinicznej.

Cel pracy

Oceniono wpływ zachorowania na NJ na sferę seksualną życia jako elementu dobrostanu. Oceniono stężenia T u badanych. Wyniki dla grupy badanej odniesiono do populacji zdrowych mężczyzn.

Materiał i metody

Badanie obserwacyjne przeprowadzono w NIO-PIB w Warszawie. Grupa badana to 200 mężczyzn, co najmniej 2 lata po skutecznym leczeniu; mediana wieku 42 lata, grupa kontrolna to 100 wolontariuszy płci męskiej, bez obciążenia chorobą nowotworową; mediana wieku 39 lat. U wszystkich pacjentów oznaczono stężenie T. W prezentowanej pracy przedstawiono wybrane wyniki większej pracy: dotyczące ściśle seksualności pacjentów. Uwzględniono skale: satysfakcji seksualnej (KSS), objawów andropauzalnych (ADAM), samooceny (SES), podskale zaburzeń seksualnych w skali objawów starzejącego się mężczyzny (AMS). Oceniono korelację skal: KSS, SES oraz jakości życia (VAS).

Wyniki

Stężenia T były wyższe w grupie kontrolnej ($p=0.003$). Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy wyników dla skali KSS ($p=0.791$), jakości życia ($p=0.308$), samooceny SES ($p=0.804$), ADAM ($p=0.267$) pomiędzy grupami. Stwierdzono istotną różnicę w podskali AMS dotyczącej zaburzeń seksualnych na niekorzyść pacjentów z grupy badanej ($p=0.044$). Wykazano korelację pomiędzy KSS i SES oraz jakością życia w skali VAS.

Wnioski

Zachorowanie na nowotwór jądra i leczenie sprawiają, że stężenie T u pacjentów obciążonych chorobą jest niższe niż w zdrowej populacji. Potwierdzono wpływ choroby na funkcjonowanie pacjenta w sferze seksualnej i wykazano że samoocena pacjenta oraz jego funkcjonowanie w sferze seksualnej korelują z ogólną jakością życia - dobrostanem pacjenta.

A nomogram model to predict the overall survival of adolescent and young adult (AYA) patients with locally advanced Ewing sarcoma

Paulina Jagodzińska-Mucha, Sylwia Kopeć, Magdalena Rosińska, Paweł Sobczuk, Katarzyna Kozak, Paweł Teterycz, Michał Wągradzki, Anna Raciborska, Katarzyna Bilka, Iwona Ługowska, Piotr Rutkowski

Introduction

There are several well-known prognostic factors for Ewing sarcoma (ES) patients, but so far they have not been implemented in decision making in clinical practice. We aimed to construct a prognostic model for overall survival after the completion of the curative treatment in patients with locally advanced ES.

Material and Methods.

We extracted data on 256 nonmetastatic patients ≥ 25 years of age, treated between 1998 and 2018 in Mother and Child Institute, Warsaw (n=192) and Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology in Warsaw (n=64). Training set (n=188) was used to identify independent prognostic factors for overall survival (OS) with the Kaplan-Meier estimator, log-rank test, and the multivariate Cox model. Identified factors were used to construct the nomogram, which was validated in the validation set (n=65).

Results

The results of multivariate Cox regression used to create the nomogram showed that age, pathologic fracture, type of induction chemotherapy (VIDE vs other), type of local treatment (radiotherapy+ surgery vs surgery vs radiotherapy), and the time of diagnosis were independent prognostic factors.

Pathological fracture (HR 4.62, 95% CI 1.81 – 11.80), and no local treatment (6.10, 95%CI 1.93 – 19.30) are negative prognostic factors. The prognosis improved significantly with the time of diagnosis, by 8% per year (HR 0.92, 95% CI 0.87-0.97). Age 10 years or less at diagnosis and receiving VIDE as an induction therapy regimen tended to predict better OS. Model calibration assessment showed that the nomogram has a good agreement for the patient's survival at selected time-points (24 and 60 months). The Harrell's concordance index on the training dataset was 0.78 (95%CI 0.72 - 0.84) and on the validation dataset 0.69 (95% CI 0.56 – 0.83).

Conclusions

Our nomogram has a predictive power and could be helpful to assess the risk among ES patients and guide treatment decision; however, it should be further validated in external datasets.

Investigation of the stimulatory effect of brain extract and glucose treatment on salivary gland adenoid cystic carcinoma (SACC) cell line

Maryam Jozghorbani ^{1*}, Jakkapong Kluebsoongnoen ¹, Apisara Saensuwanna ¹, Elzbieta Sarnowska ², Tomasz J. Sarnowski ¹

¹ *Institute of Biochemistry and Biophysics Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland*

² *Department of Experimental Immunotherapy, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology, Warsaw, Poland*

*jmaryam@ibb.waw.pl

Introduction

Salivary gland adenoid cystic carcinoma (SACC) is a slow-growing cancer that tends to spread along nerves and lungs, and it has a high rate of recurrence even after treatment. Our previous studies have shown a correlation between alterations in the SWI/SNF chromatin remodeling complex (CRC) and the development of ACC. Recent research has suggested that mutations in the BRM gene may be associated with a higher risk of developing ACC and BRM mutations may be associated with more aggressive forms of this disease. Here we aimed to investigate the role of BRM in an altered metabolic-related pathway in the development and progression of SACC.

Materials & Methods

To investigate the proliferation and cell viability of UM-HACC-2A ACC cell line, the cell was treated with different concentrations of brain extract and glucose for 72 h. Then, the cell viability was determined using growth rate and MTT assays. The specific concentrations of brain extract and glucose were selected for investigation of the transcriptional and protein levels of SWI/SNF CRC subunits.

Results

A significant proliferation of cell line was observed at 72 h after treatment with both brain extract and glucose compared to 48 h. Specifically, treatment with 5 µg/ml of brain extract and 5 mM of glucose resulted in a 50 % increase in cell viability compared to untreated control cells. The transcriptional and protein levels of a core SWI/SNF subunit; BRM higher under treatment with both brain extract and glucose compared to the control.

Conclusion

The findings indicate that metabolic supplementary agents have an impact on the growth of the UM-HACC-2A cell line and can be useful in predicting further research on the influence of these substances on SACC proliferation. Furthermore, SACC is known to metastasize to the brain through the nervous system or to the lung and liver through blood vessels, which implies the involvement of distinct molecular mechanisms that could be linked to the energy source and metabolism of cancer cells.

Funding

The project was funded by the National Science Center grant No. 2020/39/B/NZ5/02116.

Penaeus monodon – a shrimp model for functional studying of steroid hormone role in modulating ovary development

Jakkapong Kluebsoongnoen ¹*, Ponsit Sathapondecha ², Pornpatsorn Lertphadungkit ³, Szymon Kubala ¹, Pawel Cwiek ¹, Maryam Jozghorbani ¹, Apisara Saensuwanna ¹, Malgorzata Stachowiak ⁴, Elzbieta Sarnowska ⁴, Tomasz J. Sarnowski ¹^, Apinunt Udomkit ⁵ ^

¹ *Institute of Biochemistry and Biophysics Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland*

² *Center for Genomics and Bioinformatics Research, Division of Biological Science, Faculty of Science, Prince of Songkhla University, Thailand*

³ *Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mahidol University, Bangkok, Thailand*

⁴ *Department of Experimental Immunotherapy, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology, Warsaw, Poland*

⁵ *Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University, Salaya Campus, Nakhon Pathom, Thailand*

**jkuebsoongnoen@ibb.waw.pl*

^ *Equal contribution*

Introduction

Ovarian cancer (OC) is a poor prognostic gynecological malignancy. In the early stage, patients often experience limited or no characteristic symptoms, making it difficult to diagnose. OC is categorized into acquired tumorigenesis due to multiple factors including hormonal imbalances. However, the initial OC tumorigenesis is still obscure and needs to be explored. This study aims to investigate a key role of vertebrate homolog of steroid hormone receptor, ecdysteroid receptor (EcR) in ovary using shrimp model, *Penaeus monodon*.

Materials and Methods

EcR gene was silenced using EcR-dsRNA. The ovary RNAs were subjected to RNA-sequencing. De novo transcriptomic assembly, gene annotation, and differential gene expression (DEG) were performed and expression was verified by RT-qPCR. EcR partner proteins were identified using co-immunoprecipitation followed by LC-MS/MS.

Results

The EcR suppression resulted in 3,158 DEGs including these involved in yolk production, nutrient metabolisms and transcriptional regulation. Among the down-regulated group, tumor suppressors, i.e. SWI/SNF chromatin remodeling subunits (CRCs), and DNA repair genes were identified, while DNA damage recognition and apoptotic-related genes were significantly up-regulated. The detection of EcR-interacting ovary proteins led to the identification of partners that are involved in growth-related processes and transcriptional regulation. Moreover, in vitro protein pull-down showed that EcR protein binds a core SWI3-type SWI/SNF subunit. Currently, the specific anti-EcR VHH are selected to be used in the future investigation of potential chromatin-related EcR function. This study implies that EcR might crosstalk with the epigenetic mechanism in ovary to control ovarian development in shrimp.

Conclusions

The functionally conserved cross-talk between endocrine and tumor gene regulators suggests that the shrimp model may be helpful in studying the in-depth mechanisms of initial OC tumorigenesis.

Funding

The project was funded by National Research Council of Thailand (NRCT)/Mahidol University (NRCT5-RSA63015-04), and TJS was supported by the National Science Centre, Poland grant No. UMO-2018/30/M/NZ1/00180.

Ocena wartości immunochemioterapii u chorych z rozpoznaniem niedrobnokomórkowego raka płuca i ekspresją PD-L1<1%. Dane z praktyki klinicznej w Polsce

Magdalena Knetki-Wróblewska ¹, Maciej Bryl ², Paweł Krawczyk ³, Tomasz Jankowski ³, Janusz Milanowski ³, Anna Wrona ⁴, Artur Bandura ⁴, Rafał Dziadziuszko ⁴, Jolanta Smok-Kalwat ⁵, Jolanta Rok-Knapińska ⁵, Kinga Szydźiak-Zwierzyńska ⁵, Krzysztof Rogoziewicz ⁶, Katarzyna Stencel ², Grzegorz Czyżewicz ⁷, Marek Wojtukiewicz ⁸, Ewa Kalinka ⁹, Piotr Wysocki ¹⁰, Mateusz Łobacz ¹⁰, Hubert Pawlik ¹, Dariusz M.Kowalski ¹, Maciej Krzakowski ¹

¹ Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowy Instytut Badawczy, Warszawa

² Wielkopolskie Centrum Pulmonologii i Torakochirurgii, Poznań

³ Uniwersytet Medyczny w Lublinie, Lublin

⁴ Uniwersytet Medyczny w Gdańsku, Gdańsk

⁵ Świętokrzyskie Centrum Onkologii, Kielce

⁶ Dolnośląskie Centrum Onkologii, Wrocław

⁷ Krakowski Szpital Specjalistyczny im. Jana Pawła II, Kraków

⁸ Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, Białystok

⁹ Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki, Łódź

¹⁰ Szpital Uniwersytecki w Krakowie, Kraków

Wstęp

Pembrolizumab w skojarzeniu z chemioterapią stał się standardem postępowania u chorych z rozpoznaniem niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP) z ekspresją PD-L1 wyrażoną na <50% komórek nowotworowych. U około 30-40% chorych poziom ekspresji PD-L1 nie przekracza 1%, a dane dotyczące skuteczności immunochemioterapii nie są konkluzywne. Istnieje potrzeba oceny wartości immunochemioterapii w tej grupie chorych w codziennej praktyce.

Metody

Przeprowadzono wielośrodkową retrospektywną analizę chorych z NDRP w 4. stopniu zaawansowania, zakwalifikowanych do leczenia pembrolizumabem i chemioterapią opartą na pochodnych platyny w okresie 01.2021-06.2022. Kryteria włączenia obejmowały dobry stan sprawności (ECOG 0-1), brak aktywnych przerzutów do mózgu oraz brak zaburzeń molekularnych w genach EGFR, ALK i ROS1. Medianę przeżycia wolnego od progresji (PFS) i przeżycia całkowitego (OS) oszacowano za pomocą metody Kaplana-Meiera. Do analizy jedno- i wieloczynnikowej zastosowano test log-rank oraz model regresji Coxa.

Wyniki

Do badania włączono grupę 339 chorych z rozpoznaniem NDRP (w 39% przypadków rozpoznano raka płaskonabłonkowego). Ekspresję PD-L1 <1% stwierdzono u 51% chorych. W całej analizowanej populacji odsetek obiektywnych odpowiedzi wyniósł 40,6%, a mediany PFS i OS wyniosły-odpowiednio- 13 miesięcy (95% CI 11,4-15) i 16,8 miesiąca (95% CI 13,3-20,3). Typ histologiczny nowotworu nie miał znaczenia rokowniczego. W grupie chorych z ekspresją PD-L1<1% mediana OS wyniosła 16,7 miesięcy, wobec 16,5 miesięcy w grupie 1-49% (p=0,39). Wśród chorych z ekspresją PD-L1 <1%, mediana OS była krótsza w podgrupie chorych z rozpoznaniem raka płaskonabłonkowego, ale różnica nie była istotna statystycznie (15 vs 17,4 miesiąca, p=0,59). W analizie wieloczynnikowej dla całej analizowanej populacji NLR>3 (HR 2,3, 95%CI 1,3-4,2; p=0,04), obecność przerzutów w wątrobie (HR 2,0, 95%CI 1-3,7; p=0,03) i kościach (HR 1,3, 95%CI 1-3; p=0,04) oraz suma zmian mierzalnych >110mm (HR 1,7, 95%CI 1-2,9, p=0,049) miały negatywny wpływ na OS.

Wnioski

Dane z codziennej praktyki potwierdzają skuteczność immunochemioterapii u chorych na NSCLC niezależnie od ekspresji PD-L1 i typu histologicznego. Uwzględnienie wybranych czynników klinicznych ocenianych przed rozpoczęciem leczenia może być pomocne w identyfikacji optymalnej populacji chorych.

Skuteczność pembrolizumabu u chorych z rozpoznaniem niedrobnokomórkowego raka płuca i przerzutami do mózgu – dane z codziennej praktyki

Magdalena Knetki-Wróblewska¹, Sylwia Tabor¹, Kinga Winiarczyk¹, Adam Płużański¹, Paweł Sobczuk², Zofia Lewandowska¹, Aleksandra Piórek¹, Katarzyna Zajda¹, Anna Janowicz-Żebrowska¹, Magdalena Zaborowska-Szmit¹, Paweł Badurak¹, Magdalena Borucka¹, Dariusz M. Kowalski¹, Maciej Krzakowski¹

¹ *Klinika Nowotworów Płuca i Klatki Piersiowej, Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie*

² *Klinika Nowotworów Tkanek Miękkich, Kości i Czerniaków, Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie*

Wstęp

Pembrolizumab stanowi uznaną metodę leczenia chorych z rozpoznaniem zaawansowanego niedrobnokomórkowego raka płuca (NDRP) z ekspresją PD-L1 (ang. programmed death-ligand 1) na $\leq 50\%$ komórek nowotworowych. Szczególną grupę chorych stanowią pacjenci z pierwotnym rozsiewem choroby do ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Istnieje potrzeba oceny wartości immunoterapii w tej grupie chorych w codziennej praktyce.

Metody

Niniejsze badanie to jednoośrodkowa retrospektywna analiza chorych z NDRP w 4. stopniu klinicznego zaawansowania, zakwalifikowanych do leczenia pembrolizumabem w ramach Programu Lekowego. Kryteria włączenia obejmowały dobry stan sprawności (ECOG 0-1), nieobecność zaburzeń molekularnych w genach EGFR lub ALK. Chorych z przerzutami do mózgu kwalifikowano po przeprowadzeniu wstępnego leczenia miejscowego. Medianę przeżycia wolnego od progresji (PFS) i przeżycia całkowitego (OS) oszacowano za pomocą metody Kaplana-Meiera. Do analizy jednoczynnikowej zastosowano test log-rank.

Wyniki

Do badania włączono grupę 240 chorych (39,6% kobiet), z czego u 24 chorych (10%) stwierdzono przerzuty do OUN. Odsetek obiektywnych odpowiedzi w całej analizowanej populacji wyniósł 34% (17% chorych- zmarło przed pierwszą oceną radiologiczną, u 23% chorych potwierdzono progresję jako najlepszą odpowiedź na leczenie). Mediany PFS i OS w całej populacji wyniosły odpowiednio 8,4 miesiąca (95% CI 4,9-11,8; 153 zdarzenia) i 13,8 miesiąca (95% CI 10,47-17,12; 141 zdarzeń). W grupie chorych z przerzutami do OUN odsetek obiektywnych odpowiedzi ogółem wyniósł 30%, a korzyść kliniczną udokumentowano u 65% chorych (w większości przypadków- również wewnątrzczaszkowo). Nie zanotowano różnic w zakresie parametrów przeżycia w podgrupach podzielonych względem obecności zmian wtórnych w OUN. Mediany- dla chorych z przerzutami oraz bez- wyniosły odpowiednio dla PFS wyniosły 13 mies. (95% CI 6,5-20,2) vs 8 mies. (95%CI 5,1-8,9; p=0,314), zaś dla OS 16 mies. (95%CI 8,6-15,7) vs 12.1 mies. (95%CI 13-18,9;p=0,13).

Wnioski

Dane z codziennej praktyki potwierdzają aktywność pembrolizumabu u chorych z zaawansowanym NDRP i wysoką ekspresją PD-L1, u około 30% chorych możliwe jest uzyskanie obiektywnej odpowiedzi na leczenie. Obecność przerzutów do OUN- u chorych w dobrym stanie sprawności, po wstępnym leczeniu miejscowym na obszar mózgowia - nie stanowi negatywnego czynnika rokowniczego.

The importance of PD-L1 ligand expression and the T cell type infiltration in the assessment of the prognosis of clear cell renal cell carcinoma

Maciej Luba ^{1 2}, Natalia Rusetska ¹, Elzbieta Sarnowska ¹, Pawel Wiechno ³

¹ Department of Experimental Immunotherapy, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology, Warsaw

² Department of Urology and Urological Oncology, Praski Hospital, Warsaw

³ Department of Uro-oncology, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology, Warsaw

Background

Immunotherapy is now widely used in the treatment of locally advanced and metastatic renal cancer, however, not all patients respond well to this type of treatment. It is currently believed that PD-L1 expression on the surface of neoplastic cells is not an appropriate tool to predict response to treatment. Tumor infiltrating lymphocytes (TILs) must be present in tumor microenvironment (TME) for effective anti-PD-L1 immunotherapy. TILs become exhausted by TME and direct contact with cancer cells, which means that they cannot destroy cancer cells. Therefore, the presence of PD-L1 on cancer tissue can be a marker for effectiveness of immunotherapy, although it has not been confirmed that negative staining of tumor tissue for the PD-L1 means that immunotherapy is ineffective. The current research focuses mainly on the activity of the CD8 T cells, which mainly have a cytotoxic function. However, the work of Dr Matzinger has shown that CD4 T cells are much more efficient in killing cancer cells than CD8 T cells (Matzinger P. et al., 2007.). The prognostic models used in patients with renal cell carcinoma, after radical treatment, do not take into account information about types of TILs and changes in the immune system. Such information, on a limited basis, is used in the prognostic classification of patients with metastatic disease (IMDC Model).

Methods

Immunohistochemistry (IHC) were performed on samples from 161 patients with ccRCC treated and observed at the Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology in Warsaw in the years 2014-2020. Patients were divided for 3 groups: organ-confined disease without a 5-year relapse (n=60), organ-confined disease with a 5-year relapse (n=49), primary metastatic disease (n=52). The post hoc analysis of associations between PD-L1 expression (membrane and nuclear), T cells infiltration (CD4 and CD8) and stage of the disease and OS were performed as well as positively correlated genes with CD4 expression were defined using TCGA database.

Outcomes

Our results showed significantly higher infiltration of CD4 T cells than CD8 T cells in ccRCC samples in all studied groups, although the CD4/CD8 ratio dramatically decreased in primary metastatic ccRCC. Additionally, the expression of CD4 was significantly higher in ccRCC samples compared to healthy control, and positively correlates with CD8 T cell exhaustion markers like TIGIT, LAG3 and other immune-dependent genes (e.g. CD80, CD86, etc.). IHC studies showed no significant overexpression of PD-L1 on the surface of ccRCC cells. Interestingly, the nuclear localization of PD-L1 was observed in a group of patients with metastatic ccRCC.

Conclusion

The evaluation of CD4/CD8 ratio correlates with ccRCC prognosis, which can be used in the future as new prognostic marker. Additionally, the CD4 TILs may induce the CD8 T cell exhaustion in TME, although the exact function of effector CD4 T cells in ccRCC is not fully understood. The function of nuclear PD-L1 in metastasis of ccRCC needs to be further evaluated.

Evaluation of the prognostic value of the systemic response to inflammatory markers (SII, SIRI) in breast cancer patients qualified for neoadjuvant treatment

B. Kotowicz ¹, M. Fuksiewicz ¹, A. Makówka ¹, M. Jodkiewicz ³, M. Meluch ², A. Jagiełło-Gruszfeld ²

¹ *Independent Laboratory of Cancer Biomarkers and Cytokines, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology*

² *Department of Breast Cancer and Reconstructive Surgery, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology*

³ *Medical Center of the National Institute of Public Health - National Institute of Hygiene, Warsaw, Poland*

Introduction

The aim of the study was to determine the prognostic usefulness of SII and SIRI in predicting complete response to neoadjuvant treatment (NAT) in patients with TNBC and HER2+ breast cancer. The relationship between the SII and SIRI indices and the concentration of vitamin D and BMI values was also analyzed.

Material and methods

The study included 96 patients with breast cancer before neoadjuvant treatment (51 patients with TNBC cancer and 45 patients with HER2-positive cancer). Patients' BMI (body weight [kg]/height [m²]) and vitamin D 25(OH)D concentration were determined using the Cobas E-601 device. On the basis of established morphology, the SII and SIRI indices of inflammation were determined according to the formulas: $SII = \text{platelet count} \times \text{neutrophil count} / \text{lymphocyte count}$, $SIRI = \text{neutrophil count} \times \text{monocyte count} / \text{lymphocyte count}$. The Mann-Whitney test and Spearman's rank correlation of the Statistica PL program were used for statistical calculations. The diagnostic value of the coefficients was assessed on the basis of ROC curves.

Results

Significantly higher SIRI scores were found in TNBC patients ($P=0.001$) than in HER2-positive patients. In both groups of patients, the areas under the AUC curves for SII and SIRI were similar and showed low diagnostic sensitivity in terms of response to treatment. Median SII values were higher in patients who responded to treatment in both groups (TNBC: 701 vs. 544; HER2+: 910 vs. 543). There were no statistical differences in the levels of SII, SIRI, BMI and vitamin D depending on the response to NAT in patients with TNBC, HER2+ as well as in the entire study group. In HER2+ patients, significantly higher SII values ($P=0.027$) were found in patients with residual disease (RBC) stage I than in patients with stage II+III ($P=0.027$). In the HER2+ group, SII values correlated negatively with vitamin D concentrations ($R=-0.39$; $P=0.008$). A similar correlation was observed in patients who responded to the NAT ($R=-0.53$; $P=0.013$). However, in non-responders, SII was positively correlated with BMI ($R=0.41$; $P=0.045$). In the group with TNBC, no significant correlations between the examined parameters were found.

Conclusions

Elevated SII values before treatment may be a favorable prognostic factor in patients with HER2+ subtype who did not respond to NAT. The greater the vitamin D deficiency in patients with the HER2+ subtype of breast cancer, the higher the SII index. SII and SIRI have not been shown to have a significant prognostic value in predicting complete response to neoadjuvant treatment in patients with TNBC and HER2+ breast cancer.

Ocena ekspresji receptora witaminy D i białka CYP27B1 w przebiegu raka pęcherza moczowego *in vitro* oraz u pacjentów po zabiegach cystektomii oraz TURBT

Bartłomiej Olczak^{1 4}, Małgorzata Stachowiak³, Natalia Rusetska³, Michał Szymański¹, Łukasz Michałowski², Michał Panek⁴, Elżbieta Sarnowska³

¹ *Klinika Urologii i Urologii Onkologicznej, Państwowy Instytut Medyczny MSWiA w Warszawie*

² *Zakład Patomorfologii, Państwowy Instytut Medyczny MSWiA w Warszawie*

³ *Zakład Immunoterapii Eksperymentalnej, Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie Państwowy Instytut Badawczy*

⁴ *Klinika Chorób Wewnętrznych, Astmy i Alergii, Uniwersytecki Szpital Kliniczny nr 1 im. Norberta Barlickiego*

Wstęp

Nowotwory układu moczowego, mimo zastosowaniu wielu nowych metod leczenia, wciąż charakteryzują się wysoką agresywnością i śmiertelnością u pacjentów. Wpływ na to mają zmiany molekularne i metaboliczne w wielu szlakach. Odkrywanie i zrozumienie tych zmian pozostaje wyzwaniem dla dzisiejszej medycyny. Niniejsze badanie ma na celu ocenę korelacji stężenia witaminy D₃, ekspresji receptora dla witaminy D₃ i białka CYP27B1 na liniach komórkowych raka pęcherza moczowego w różnych stadiach złośliwości histologicznej. Dodatkowo badanie ma na celu ocenę ekspresji receptora witaminy D₃ i CYP27B1 u pacjentów z rozpoznanym rakiem pęcherza moczowego po zabiegach przezcewkowej elektroresekcji guza pęcherza moczowego (TURBT) oraz cystektomii celem oceny korelacji ekspresji receptora witaminy D₃ i CYP27B1 ze stopniem zaawansowania nowotworu, ocenianego według skali TNM. Stawiamy hipotezę, że istnieje korelacja między poziomem witaminy D₃, a ilością receptora dla witaminy D₃ i enzymu konwertującego nieaktywną formę witaminy D₃ do bioaktywnej 25OH D₃ CYP27B1, co może przekładać się na zaburzenia molekularne występujące w komórkach nowotworowych pęcherza moczowego *in vitro*, a także korelacja między ilością receptora dla witaminy D₃ i CYP27B1, a stopniem zaawansowania nowotworu u pacjentów po zabiegach TURBT oraz cystektomii.

Metody

Ilości białek VDR (receptor witaminy D₃) i CYP27B1 na liniach komórkowych raka pęcherza moczowego oznaczono metodą immunocytochemii (ICC), natomiast w materiale pooperacyjnym po zabiegach TURBT lub cystektomii metodą immunohistochemii (IHC).

Materiał

Do immunocytochemii wykorzystano przeciwciała swoiste anty VDR i anty CYP27B1 oraz linie komórkowe raka pęcherza moczowego T24, 5637, SW1710 i SW780. Dodatkowo do badania metodą IHC zakwalifikowano materiał pooperacyjny od 103 pacjentów z potwierdzonym rakiem pęcherza moczowego w różnych stopniach zaawansowania wg skali TNM.

Wyniki

Immunocytochemia na liniach komórkowych raka pęcherza wykazała, że w zależności od linii, VDR występował zarówno w jądrze jak i cytoplazmie, przy czym w linii SW780 było go najmniej i znajdował się głównie wokół jądra komórkowego. We wszystkich liniach natomiast obserwowano ekspresję enzymu CYP27B1. Suplementacja wit D₃ powodowała translokację VDR do jądra komórkowego przy czym linie SW1710 oraz T24 najlepiej odpowiadały na podanie wit. D₃. Analiza ilości VDR w próbkach klinicznych u chorych z rakiem pęcherza moczowego potwierdziła odwrotną korelację między poziomem VDR, a stopniem zaawansowania wg klasyfikacji TNM ($p < 0,022$) - im bardziej zaawansowana choroba wg TNM, tym mniejsza ilość VDR w materiale pooperacyjnym. Ponadto u chorych z rakiem pęcherza moczowego HG-G₂, G₃, niezależnie od klasyfikacji TNM, wykazano znaczące zmniejszenie ilości VDR, porównując z pacjentami z rakiem pęcherza moczowego LG-G₁, G₂ ($p < 0,044$). Ponadto, w tkance zdrowej obserwuje się znaczącą ilość VDR w lokalizacji zarówno cytoplazmatycznej jak i jądrowej natomiast w komórkach nowotworowych VDR występuje głównie w cytoplazmie.

Wolny płat promieniowy w materiale Kliniki Nowotworów Głowy i Szyi Narodowego Instytutu Onkologii w Warszawie

M. Paszkowska ¹, A. Mydlak ¹, J. Zwoliński ¹, A. Gałązka ¹, K. Dominiak ¹, A. Kawecki ¹

¹ *Klinika Nowotworów Głowy i Szyi, Narodowy Instytut Onkologii w Warszawie*

Wstęp

Wolny płat promieniowy (płat chiński) został po raz pierwszy opisany przez Yanga i wsp. w Chinach w 1978 roku. Jest jednym z najczęściej wykorzystywanych płatów w onkologii głowy i szyi. Cienki płat skórno-powięziowy uszypułowany na tętnicy promieniowej i towarzyszących żyłach, pozwala na rekonstrukcję po rozległych resekcjach guzów jamy ustnej, gardła, krtani i przełyku.

Materiał i metody

Przeanalizowano ponad 120 dokumentacji medycznych pacjentów Kliniki Nowotworów Głowy i Szyi, Narodowego Instytutu Onkologii w Warszawie z okresu od 2019 do 2021 roku.

Wyniki

Płat z przedramienia wykorzystywany był zarówno w chirurgii pierwotnej, ratującej jak i w operacjach naprawczych.

Dał dobre wyniki leczenia, wgajalność płata w ubytek poresekcyjny przekraczała 95%. W materiale Kliniki płat chiński najczęściej używany był do rekonstrukcji dna jamy ustnej i języka, po rozległych zabiegach resekcyjnych z powodu raka płaskonabłonkowego.

Do powikłań pooperacyjnych należały: krwawienie, zakrzepy w zespoleniu, rozejście się rany, zakażenie, przetoki i martwica płata.

Wnioski

Wolne płaty z przedramienia dają dobre rezultaty funkcjonalne u pacjentów po resekcjach nowotworów w obrębie głowy i szyi. Preparowanie płata jest powtarzalne i nie przedłuża znacząco czasu zabiegu. Wadą płata jest pobranie jednej z dwóch głównych tętnic z przedramienia, co przy niewydolności łuków dłoniowych może powodować niedokrwienie ręki.

Chemotactic secretome profiling of glioblastoma multiforme cell lines and human mesenchymal stromal cells in 3D bioprinted co-cultures

Radosław Zagożdżon^{1,2}, Anna Słysz¹, Katarzyna Zielniok², Kinga Rusinek¹, Nikoletta Buczek¹, Katarzyna Siennicka¹, Agata Michalak¹, Zygmunt Pojda¹

¹ Department of Regenerative Medicine, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology

² Department of Clinical Immunology, Medical University of Warsaw

Introduction

In a living organism, cancer cells function in a specific microenvironment in which they exchange numerous physical and biochemical signals with other cells. A proper understanding of this phenomenon is essential for the development of more effective cancer therapies. However, classical 2D cell culture systems are not able to sufficiently reproduce the dynamic nature and complexity of the tumor microenvironment to be satisfactorily used for comprehensive in vitro studies. This problem can be solved by the 3D bioprinting strategy, thanks to which it is possible to generate very detailed structures consisting of many types of cells and biomaterials serving as models for the tumor microenvironment. In the current work, we evaluated the chemotactic secretions of glioblastoma multiforme (GBM) cell lines in 3D bioprinted co-cultures together with mesenchymal stromal cells (MSCs).

Materials and methods

U251 and DK-MG cell lines were bioprinted (BIO X Cellink) alone or together with primary human MSCs and cultured for 7 days in 21% O₂ (normoxia) or 1 % O₂ (hypoxia). The culture supernatants were then collected and assessed for the presence of chemokines by the Proteome Profiler.

Results

Under normoxic conditions, U251 cells secreted mainly CXCL8 and CXCL16, while DK-MG cells secreted CXCL12. MSC cultured alone secreted a greater number of chemokines in normoxia (CCL5, CXCL8, CXCL16, CXCL12, chemerin, CXCL1, MIP-1). Under the influence of hypoxia, the concentrations of secreted chemokines decreased significantly, however, in both types of conditions, we observed an increased effect of chemokine secretion in GBM-MSC co-cultures, with a very pronounced induction of secretion of CXCL8, fractalin and CCL28.

Conclusions

The results of our work indicate that the use of the 3D bioprinting method to create model co-cultures of cancer cells and stromal cells can significantly bring in vitro models closer to real conditions, and thus increase the precision of the assessment of human tumor biology in laboratory conditions.

20 lat terapii celowanej w nowotworach GIST – opis przypadku

Małgorzata Lenarcik¹, Michał Wągradzki², Monika Prochorec-Sobieszek²,
Andrzej Tysarowski³, Iwona K. Rzepecka³

¹ *Katedra i Klinika Gastroenterologii, Hepatologii i Onkologii Klinicznej CMKP*

² *Zakład Patomorfologii Nowotworów, Narodowy Instytut Onkologii
im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowy Instytut Badawczy*

³ *Zakład Diagnostyki Genetycznej i Molekularnej Nowotworów, Narodowy Instytut Onkologii
im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowy Instytut Badawczy*

Wstęp

Nowotwory podścieliskowe przewodu pokarmowego (GIST), w większości posiadające mutacje KIT i PDGFRA, stanowią modelowy przykład leczenia celowanego w onkologii, począwszy od zarejestrowania w 2002 r. imatynibu, przez inhibitory wielokinazowe sunitynib i sorafenib, po nową generację leku - avapritinib.

Materiał i metody

Rozpoznanie GIST postawiono na podstawie oceny patomorfologicznej oraz oceny immunohistochemicznej barwień CD117 i CD34 materiału pobranego z resekcji zmiany pierwotnej z żołądka. Analizę mutacji KIT i PDGFRA wykonano na materiale FFPE za pomocą sekwencjonowania bezpośredniego metodą Sanger.

Wyniki

U mężczyzny w wieku 64 lat przeprowadzono w 2001 r. resekcję zmiany pierwotnej o wymiarach 11,5cm x 8cm zlokalizowanej w żołądku.

W 2003 r. pacjent zgłosił się ponownie do szpitala z powodu zmian przerzutowych w wątrobie i otrzewnej. Potwierdzono rozpoznanie GIST, HG, CD117 (+) i CD34 (+) i chirurgicznie usunięto zmiany przerzutowe. W październiku 2003 r. wprowadzono leczenie celowane imatynibem, które kontynuowano do kwietnia 2016 r. Miejscowa progresja choroby wpłynęła na decyzję o zwiększeniu dawki imatynibu do 2 x 400 mg na dzień, którą stosowano do września 2018 r.

Leczenie zmieniono na sunitynib z powodu progresji, który stosowano od września do listopada 2018 r., a następnie na sorafenib, który odstawiono w styczniu 2019 r. z powodu nowych zmian przerzutowych. Powrócono do terapii imatynibem, którą kontynuowano do lutego 2019 r.

Wykonane w 2019 r. badanie genów KIT i PDGFRA wykazało obecność mutacji PDGFRA p.(D842V), związanej ze znaczną opornością na imatynib. Pacjenta w marcu 2019 r. włączono w ramach badania klinicznego do terapii avapritinibem, wykazującym skuteczność w leczeniu GIST z tą mutacją. W listopadzie 2020 r. pacjent z licznymi przerzutami do wątroby zakończył udział w badaniu.

Obecnie, w marcu 2023 r., 85-letni pacjent leczony jest teluxem w celu spowolnienia choroby. Pacjent czuje się dość dobrze.

Wnioski

W ciągu ostatnich 20 lat poczyniono znaczące postępy w terapii nowotworów GIST. Wzrosła też rola diagnostyki patomorfologicznej i molekularnej, która ma kluczowy wpływ na wybór odpowiedniego leku celowanego, indywidualizację terapii i wyniki leczenia.

Does PD-L1 signaling effect the epigenetic alteration in classic Hodgkin lymphoma?

Hummaira Sadaf¹, Elzbieta Sarnowska¹, Ryszard Konopinski¹, Tomasz Jacek Sarnowski³, Jan Walewski², Hafiza BiBi Ayisha⁴, Małgorzata Stachowiak¹, Monika Swiatek¹, Damian Garbicz¹, Ewa Paszkiewicz-Kozik², Sergiusz Markowicz¹

¹ *Department of Experimental Immunotherapy, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology Warsaw, Poland*

² *Department of Lymphoid Malignancies, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology Warsaw, Poland*

³ *Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences Warsaw, Poland*

⁴ *Liaquat College of Medicine and Dentistry (Darul Sehat Hospital) Karachi, Pakistan*

Classical Hodgkin lymphoma is a type of malignancy originating from abnormal B-lymphocytes characterized by bi and multi-nucleated Hodgkin and Reed-Sternberg (HRS) cells. An important hallmark of HRS cells is overexpression of CD30 and PD-L1 (Programmed cell death protein 1 ligand) on the cell surface. Overexpression of PD-L1 plays an important role in proliferation and metabolism of tumor cells. The modern immunotherapy using anti-PD1/PDL1 antibodies enhances the response of T cell to cancer cells and ultimately blocks the proliferation of HRS cells.

For our study we used the certified HRS cell lines: KM-H2, L-1236, L-428. After 3-5 days cells from all harvested lines subjected for Western blot analysis with antibodies: anti PD-L1, EZH2 and SWI/SNF subunits to verify in which line the PD-L1 was overexpressed. The immunoprecipitation was performed on L-1236 HRS cells followed by mass spectrometry analysis. The data obtained from this analysis will be further confirmed by Yeast two hybrid system. Furthermore, we performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) on L-1236 cHL line using antibodies: anti SWI/SNF (BAF 155), PRC2 complex (EZH2), PD-L1 as well as methylated and acetylated Histone H3 on CD274 promoter region.

We investigated the PD-L1 translocation into cell nuclei and identified its potential nuclear partners in L-1236 cell line. After the mass spectrometry analysis we found PD-L1 may interact in the nucleus with the splicing machinery and thus regulate the RNA posttranscriptional alternative processing. Noteworthy, we subsequently found that the subunits of SWI/SNF (BAF 155), PRC2 complex (EZH2), PD-L1 and methylated and acetylated H3 are located at the same position i.e. (-606) on the promoter region of CD274 gene that encodes PD-L1 protein. Collectively, our findings may provide a clue about the involvement of both EZH2 and SWI/SNF complexes together with PD-L1 itself in regulation of the PD-L1 expression in HRS cells.

Inhibitory effects of epidrugs on salivary gland adenoid cystic carcinoma (SACC) cells through regulating BRM expression

Apisara Saensuwanna ^{1*}, Jakkapong Kluebsoongnoen ¹, Maryam Jozghorbani ¹, Elzbieta Sarnowska ², Tomasz J. Sarnowski ¹

¹ *Institute of Biochemistry and Biophysics Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland*

² *Department of Experimental Immunotherapy, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology, Warsaw, Poland*

* asaensuwanna@ibb.waw.pl

Introduction

Salivary gland adenoid cystic carcinoma (SACC) is a rare cancer type with a high rate of distant metastasis and recurrence. The current standard treatments can offer only surgery, radiotherapy, and/or chemotherapy, with no available systemic treatment so far. Recent studies have reported that an overexpression of SMARCA2 gene encoding BRM, a core subunit of the SWI/SNF complex, was observed in ACC tumors. In addition, the upregulation of SMARCA2 was correlated with altered expression of genes related to drug resistance, proliferation and epigenetic regulation. Therefore, this study aims to evaluate the impact of inhibitory compounds related to chromatin modification, including histone deacetylase inhibitors (HDACi), and DNA methyltransferase inhibitor (DNMTi) on an ACC cell line by modulating the BRM expression.

Materials and methods

The human ACC cell line, UM-HACC-2A, was treated with two classes of inhibitors, including 5-Azacytidine (5-AzaC), a DNA methyltransferases inhibitor (DNMTi), and three histone deacetylase inhibitors (HDACis): Panobinostat, Trichostatin A, and Vorinostat (SAHA). The cell growth was evaluated, and the effect on molecular profile of BRM, including gene and protein level was determined.

Results

Our results showed that Panobinostat and Trichostatin A have the most potential to inhibit cell growth in the HDACis class. Additionally, the expression of both BRM encoding gene and protein level that were assessed by qRT-PCR and Western blot analysis, appeared downregulated in a dose-dependent manner. Similarly, for the DNMTi class, 5-AzaC effectively reduced cell growth in a dose-dependent manner likely by suppressing BRM expression.

Conclusions

Our findings suggest that epidrugs like Panobinostat, Trichostatin A, and 5-AzaC could serve as promising approach for the development of future ACC treatments based on the BRM regulation.

Funding

The project was funded by the National Science Center grant No. 2020/39/B/NZ5/02116

Modulacja splicingu RNA jako potencjalny cel terapeutyczny w złośliwym guzie rabdoidalnym

Paweł Sobczuk^{1,2}, Igor Odintsov², Zebing Liu², Daisuke Kubota², Romel Somwar², Neerav Shukla³, Marc Ladanyi²

¹ *Klinika Nowotworów Tkanek Miękkich Kości i Czerniaków, Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie – Państwowy Instytut Badawczy w Warszawie, Warszawa, Polska*

² *Zakład Patologii, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, Nowy Jork, USA*

³ *Klinika Pediatrii, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, Nowy Jork, USA*

Wstęp

Złośliwy guz rabdoidalny (malignant rhabdoid tumor, MRT) jest rzadkim nowotworem mezenchymalnym charakteryzujący się utratą ekspresji SMARCB1 i występującym głównie w populacji pediatrycznej. Rokowanie w MRT jest bardzo złe, a tylko ok 10% pacjentów przeżywa ponad 5 lat. Opcje leczenia systemowego są bardzo ograniczone co wskazuje na konieczność poszukiwania nowych terapii dla pacjentów z MRT.

Materiał i metody

Przeprowadziliśmy przesiewowe badanie efektywności 5998 cząsteczek, w tym 880 inhibitorów kinaz, na 2 liniach komórkowych MRT (A204 i G401). Wybrane cząsteczki zostały ocenione w szerszym panelu linii komórkowych (A204, G401, TTC549, TM87-16, KYM-1, JMURTK2) pod kątem wpływu na żywotność, cykl komórkowy i apoptozę. Ponadto, przeprowadzono analizę transkryptomu.

Wyniki

Spośród 880 inhibitorów kinaz, 62 zostały wskazane jako aktywne (B-score ≤ -3 dla stężenia 4 μM) w liniach A204 i G401. W tej grupie zaobserwowaliśmy nadreprezentację inhibitorów kinaz zaangażowanych w splicing RNA. Do kolejnych badań wybraliśmy cząsteczkę SM09419 - inhibitor splicingu RNA (dokładnie inhibitor kinaz DYRK i CLK) będący w fazie badań klinicznych w innych wskazaniach. SM09419 hamowało wzrost 6 linii komórkowych MRT z IC₅₀ w zakresie 30-170nM (mediana 44,5nM) oraz hamowało tworzenie kolonii w liniach A204 i G401. Ponadto, SM09419 w liniach A204 i TTC549 prowadziło do wyższej ekspresji inhibitorów cyklu komórkowego – p21 i p27, zatrzymania cyklu w fazie G₀/G₁, zwiększonej ekspresji białek proapoptotycznych PUMA, BIM i cleaved-PARP, oraz aktywacji kaspazy-3/7. Gdy SM09419 stosowaliśmy razem z doksorubicyną, oba leki wykazywały działanie synergistyczne. Analiza transkryptomu wykazała istotne różnice w ekspresji m.in. genów szlaku WNT, a analiza PCR potwierdziła alternatywny splicing wybranych genów szlaku WNT (retencja intronów w mRNA dla DVL2 i TCF7).

Wnioski

Nasze badania wskazują, że splicing RNA może być atrakcyjnym celem w terapii MRT opornego na leczenie. Dalsze badania przedkliniczne, w tym in vivo są niezbędne do określenia możliwości translacji tych wyników do dalszych faz badań klinicznych.

Preoperative radiotherapy with hyperthermia in recurrent and radiation-induced sarcomas: results of a phase 2 clinical trial

Mateusz Spalek^{1,2}, Aneta Borkowska¹, Michał Wągrodzki³, Patricia Castaneda-Wysocka⁴, Piotr Rutkowski¹

¹ Department of Soft Tissue/Bone Sarcoma and Melanoma, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology, Warsaw, Poland

² Department of Radiotherapy 1, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology, Warsaw, Poland

³ Department of Pathology and Laboratory Diagnostics, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology, Warsaw, Poland

⁴ Department of Radiology, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology, Warsaw, Poland

Introduction

The role of perioperative treatment in radiation-induced and in-field recurrent sarcomas (RIS/IFRS) is unknown. Re-irradiation may be associated with a risk of significant late toxicity and is therefore rarely used. We hypothesized that the combination of preoperative or definitive 12x 3 Gy radiotherapy (RT) with or without integrated 3.5 Gy to 42 Gy boost combined with twice-weekly regional hyperthermia would not result in significant late toxicity in patients with RIS/IFRS.

Patients and methods

We conducted a prospective, single-arm, phase 2 clinical trial. We enrolled patients with locally advanced or oligometastatic RIS/IFRS. Treatment consisted of three weeks of radiotherapy, four fractions per week, 3 or 3.5 Gy per fraction, combined with regional hyperthermia, followed by surgery or observation. The choice of boost or no-boost regimen was based on resectability as assessed by two oncological surgeons. The procedure would be considered tolerable if significant RT-related late adverse events (grade 3+ CTCAE 5.0) occurred in less than 20% of patients at 18 months after RT. We planned to enroll 20 patients based on Wilson's method for calculating confidence intervals.

Results

We recruited 20 patients. Eight of them had RIS while twelve were diagnosed with IFRS.

Median follow-up was 24 months. Mild or moderate radiation dermatitis was observed in 14 patients. One patient experienced grade 2 gastrointestinal toxicity. Late toxicities included limited limb mobility in two patients (grade 1 and 2), grade 1 skin fibrosis in four patients, and chronic skin ulceration (grade 2) in two patients. None of the patients available for evaluation developed grade 3 or higher late toxicity.

Seven patients who received the no-boost regimen experienced local failure. None of the patients who received the boost regimen developed local progression. Eight patients developed distant metastases. Four patients died.

Conclusions

Our results provide hypothesis-generating data suggesting that preoperative re-irradiation with hyperthermia is a safe treatment for RIS/IFRS. However, the local efficacy without dose escalation is unsatisfactory, suggesting its importance in the design of further clinical trials.

The evaluation of molecular changes in renal clear cell carcinoma

G. Stawarz ¹, M. Łuba ², P. Wiechno ³, N. Rusetska ², E. Sarnowska ²

¹ *Interforest Memorial Hospital in Warsaw, Department of Urology*

² *Department of Experimental Immunotherapy, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology, Warsaw, Poland*

³ *Department of Uro-oncology, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology, Warsaw, Poland*

Introduction

Clear cell renal cell carcinoma is the most common kidney cancer, accounting for about 3% of all cancers in adults. Currently used methods of treatment based mainly on surgical treatment and systemic treatment including targeted therapy and immunotherapy using monoclonal antibodies. However, despite the advances in ccRCC therapy, it is a cancer that is highly resistant to classical treatment and has an unfavorable prognosis. ccRCC is one of a highly immune dependent cancers, with high level of tumor infiltrating lymphocytes (TILs). Research data suggest that this neoplasm is characterized by a high percentage of TILs with a predominance of CD4 + lymphocytes over cytotoxic lymphocytes deepening on stage (see poster Łuba M). However, T lymphocytes present in the tumor environment seem to be exhausted and do not fulfill their function. Moreover, it has been suggested that oncostatin M and its receptor OSMR are factors involved in ccRCC pathogenesis. Oncostatin M (OSM) is a protein derived from the IL-6 family. As suggested OSM in many cancers acts as a stimulator of the immune system, but sometimes it mediates immunosuppression and is responsible for tumor progression. The studies conducted in our department indicated that OSMR may be involved in CD4 T cell exhaustion, similarly like TMPRSS2 protein, which is regulated by androgens. Its high expression is closely related to the development of prostate cancer where it causes cell invasion, tumor growth and leads to distant metastases. TMPRSS2 is also highly expressed in kidney cancer and correlates with lymphocytic infiltration. The presented research focuses on the analysis of the number of TILs which may be exhausted using novel potential biomarker like TMPRSS2 and OSMR. Additionally, we evaluated the level of well known immunosuppressive gene IDO1 in ccRCC samples.

Materials and methods

The tumor tissue was obtained from Marie Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center and Institute of Oncology in Warsaw. 160 tumor samples were subjected to this study. Each sample has been TNM staged. The immunohistochemistry (IHC) staining was performed on tumor sections with anti –anti – OSMR, anti-TMPRSS2 and anti-IDO1 antibodies.

Results

Preliminary results of the conducted studies have shown that ccRCC is characterized by high number of TILs in tumor microenvironment. Moreover, OSMR protein was present not only on the surface of tumor cells, but also on TILs and OSMR level increased in TILs in metastatic ccRCC. In addition, the number of T cells with the presence of OSMR correlates with the infiltration of TILs. The IDO1 expression was detected in cytoplasm in proximal tubes in healthy kidney although in cancer the ectopic expression was observed. The TMPRSS2 was present in TILs in some cases but did not correlate with TILs and progression of ccRCC.

Conclusions

The OSMR is present not only in cancer cells but predominantly in TILs. The OSMR level in TILs strongly correlates with stage of the disease and may serve as CD4+ T cell exhaustion marker, although its prognostic function in immunotherapy response will be evaluated in the future. Additionally, the OSMR may serve as novel receptor which could be directly involved in CD4+ T cell exhaustion. The TMPRSS2 level was similar in all examined ccRCC patients groups.

The evaluation of molecular changes in Adenoid Cystic Carcinoma (ACC) in salivary gland

K. Stawarz ¹, N. Rusetska ², M. Durzynska ³, A. Galazka ¹, E. Sarnowska ²

¹ *Head and Neck Cancer Department, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology, Warsaw, Poland*

² *Department of Experimental Immunotherapy, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology, Warsaw, Poland*

³ *Department of Pathology, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology, Warsaw, Poland*

Introduction

Adenoid cystic carcinoma of a salivary gland is a rare neoplasm characterized by slow growth and a tendency to frequent local recurrences and distant metastases, even many years after the end of treatment. ACC is characterized by low immunogenicity and a low percentage of T lymphocytes infiltrating the tumor environment. It seems that currently used methods of treatment are ineffective because 15-year survival of patients with adenoid cystic carcinoma is estimated at approx. 40 %. Based on the available literature, ACC is still a poorly understood cancer. Therefore, the discovery of the foundations of the pathogenesis of this cancer and the molecular changes that occur in it is crucial for the development of new therapeutic schemes. Disorders of epigenetic processes such as RNA methylation, splicing or a change in the chromatin structure may be involved in the formation of many types of cancer, including adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. Moreover, the dysregulation of these processes not only directly affects the pathogenesis of cancer, but also the immune system's response to ongoing carcinogenesis. The presented study focuses on the analysis of the number and type of T lymphocytes infiltrating the ACC environment and the evaluation of the expression of proteins, which are subunits of the chromatin remodeling complex and complexes responsible for RNA methylation and splicing.

Materials and methods

The tumor tissue was obtained from Marie Skłodowska-Curie Memorial Cancer Center and Institute of Oncology in Warsaw. 54 tumor samples were subjected to this study. Each sample has been TNM staged. The immunohistochemistry (IHC) staining was performed on tumor sections with anti -METTL-3, METTL-14, WTAP, BRM, RRM2, PrP19, CDC5L, PRL1 antibodies.

Outcomes

Our findings suggest that the ACC, of the salivary glands is characterized by disturbances in the expression of proteins constituting subunits of the chromatin remodeling complex - BRM. BRM protein overexpression correlates with an unfavorable prognosis. Moreover, disturbances in the expression of proteins responsible for RNA methylation not only contribute to tumor development, but also affect the process of T lymphocyte differentiation. The performed statistical analyzes show that a high level of WTAP protein correlates with an unfavorable prognosis of patients, as does the solid tumor subtype and the T3 / T4 stage.

Conclusions

The presented analyzes suggest that disturbances in the subunits of the SWI / SNF chromatin remodeling complexes, as well as disturbances in RNA methylation and splicing, may lead to the development of adenoid cystic salivary gland carcinoma and correlate with the low infiltration of cytotoxic T lymphocytes in the tumor environment. Moreover, it appears that blocking the overexpressed proteins could be a target for the development of immunotherapeutic regimens. Detailed evaluation of the mechanisms influencing the number and type of T lymphocytes infiltrating the tumor environment requires further studies on a larger group of patients.

Funding

The project was funded by the National Science Center grant No. 2020/39/B/NZ5/02116.

The role of BRCA1 and RNR subunits in ccRCC

Joanna Szarkowska ¹, Elżbieta Sarnowska ¹

¹ *The Department of Experimental Immunotherapy, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology*

Introduction

Kidney cancers represent approximately 3% of all human cancers. Around 75% of RCC cases show the clear cell phenotype (ccRCC). In ccRCC mutation of the VHL and loss of chromosome 3p that harbors tumor suppressor genes like PBRM1, BAP1 are observed frequently. BRCA1 maintains genome stability and interacts with BAP1. BRCA1 is most well-characterized for its functions in DNA damage response as it plays a key role in the homologous recombination pathway. dNTP pool alterations have been linked to multiple human diseases. As ribonucleotide reductase (RNR) is essential for balance pools of dNTPs, variations in the RNR lead to replication stress and genomic instability. During this study, we verified the level of BRCA1 in ccRCC as well as the impact of olaparib and everolimus on ccRCC cancer cell lines. Moreover, an understanding of the cooperative functions between RNR and BAF180 (PBRM1) may uncover opportunities for new drug targets in ccRCC.

Materials and Methods

Western blot and RT-qPCR analysis were performed using cancer cell lines and tissues samples from patients with ccRCC diagnosed. ccRCC cancer cell lines were treated using various doses of olaparib, everolimus, doxorubicin and mitomycin C. MTT, colony formation, soft agar assay were performed.

Results

BRCA1 level decrease in ccRCC samples. The analysis of GEO Database and SurvExpress TCGA KIRC shows that BRCA1 increase while FG is getting higher. The metastatic line CAKI-1 that has the lowest BRCA1 level responses to the olaparib doses. Olaparib has ability to inhibit colony formation and cells proliferation and combine treatment with everolimus can enhance these effects. In tumor the level of RRM1 and 2 rise independently of tumor stage or patients' gender, but RRM2B level is higher in FG1-2. Also, RNR subunits expression is related to PBRM1 gene. Absence or mutation in PBRM1 correlates with lower expression of RRM1 and 2.

Conclusions

BRCA1 level decrease in patients with ccRCC diagnosed. A higher BRCA1 level correlates with a poor prognosis. CAKI-1 cancer cell line responses to olaparib doses, which suggests that olaparib might be an alternative drug for metastatic ccRCC. Administration of both olaparib and everolimus results in a decrease in BRCA1 level. The increase of RRM2 level is observed in tumors with higher FG what will correlate with shorter survival. . Probably in the future combined treatment with inhibitors of RRM2, olaparib and mTOR will be used on patients with advanced ccRCC.

SATB2, CKAE1/AE3 i synaptofizyna jako rekomendowany panel immunohistochemiczny do wykrywania przerzutów raka z komórek Merkla do węzłów chłonnych

Anna Szumera-Ciećkiewicz ¹, Daniela Massi ², Angelo Cassisa ³, Mateusz Krzyziński ⁴, Monika Dudzisz-Śledź ⁵, Przemysław Biecek ⁴, Piotr Rutkowski ⁵, Andrzej Marszałek ⁶, Mai P. Hoang ⁷, Piotr Donizy ⁸

¹ Department of Pathology, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology, Warsaw, Poland

² Section of Pathological Anatomy, Department of Health Sciences, University of Florence, Florence, Italy

³ Section of Pathology, Department of Oncology, San Giovanni di Dio Hospital, USL Centro Toscana, Florence, Italy

⁴ Faculty of Mathematics and Information Science, Warsaw University of Technology, Warsaw, Poland

⁵ Department of Soft Tissue/Bone Sarcoma and Melanoma, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology, Warsaw, Poland

⁶ Department of Pathology, Poznan University Medical Sciences and Greater Poland Cancer Center, Poznan, Poland

⁷ Department of Pathology, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston, USA

⁸ Department of Clinical and Experimental Pathology, Wrocław Medical University, Wrocław, Poland; Department of Pathology and Clinical Cytology, Jan Mikulicz-Radecki University Hospital, Wrocław, Poland

Wstęp

Badanie to przeprowadzono w celu określenia najbardziej czułego panelu immunohistochemicznego dla wykrywania przerzutów do węzłów chłonnych u pacjentów z rakiem z komórek Merkla (MCC).

Materiał i Metody

Przebadano 102 przerzutowe węzły chłonne MCC z wykorzystaniem 7 przeciwciał, w tym cytokeratyny (CKAE1/AE3), CK20, chromograniny A, synaptofizyny, INSM1, SATB2 i neurofilamentu (NF). Dla analizowanych markerów zastosowano 5-poziomowy system punktacji (0: 0% pozytywnych komórek MCC; 1: <25%; 2: 25-74%; 3: 75-99%; 4: 100% komórek MCC o reaktywności umiarkowanej do silnej).

Wyniki

SATB2, CKAE1/AE3 i synaptofizyna stanowiły trzy najskuteczniejsze markery o najwyższym skumulowanym procencie pozytywnej reakcji immunohistochemicznej. 91/102 (89,2%) węzłów przerzutowych charakteryzowało się umiarkowaną do silnej ekspresji SATB2 w $\leq 75\%$ komórek nowotworowych; 85/102 (83,3%) i 80/102 (78,4%) odpowiednio dla CKAE1/AE3 i synaptofizyny. Nie było całkowicie negatywnych przypadków na SATB2 i CKAE1/AE3; dodatkowo przeciwciała te miały najwyższy wskaźnik 100% reaktywności. Co istotne, SATB2 i CKAE1/AE3 wykazywały znaczący addytywny wpływ na wykrywanie przerzutów MCC. Analiza statystyczna wykazała podobny rozkład SATB2, CKAE1/AE3 i synaptofizyny niezależnie od statusu MCPyV.

Wnioski

Jednoczesna ocena SATB2, CKAE1/AE3 i synaptofizyny pozwala na efektywne wykrycie przerzutów MCC do węzłów chłonnych; odczyny te charakteryzuje najwyższa czułość diagnostyczna, niezależnie od statusu MCPyV. Proponujemy włączenia ich do rutynowego protokołu oceny histopatologicznej biopsji/limfadenektomii węzła wartowniczego MCC.

The impact of changes in the chromatin remodeling machinery in clear cell renal cell carcinoma

Jakub Szurmak ¹, Magdalena Wilga ¹, Paweł Ćwiek ¹, Szymon Kubala ¹, Małgorzata Stachowiak ², Elżbieta Sarnowska ², Tomasz J. Sarnowski ¹

¹ *Institute of Biochemistry and Biophysics Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland*

² *Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology, Warsaw, Poland*

Introduction

Renal cell carcinoma (RCC) is one of the most common urological malignancies. The most common type of RCC (more than 80% of all cases), is clear cell renal cell carcinoma (ccRCC). ccRCC is characterized by changes in cellular metabolism resulting in glycogen and lipids accumulation in tumor cells. The disease is frequently detected at the metastatic stage and is resistant to chemotherapy and radiotherapy. In a previous study, we have shown the presence of a novel missense mutation in the gene coding for the SMAD4 protein in ccRCC. We hypothesized that this alteration might affect the SMAD4 function and its interactions with the SWI/SNF chromatin remodeling complex (CRC). Here we aimed to better understand the ccRCC-specific disruption of regulatory processes focusing on mechanisms controlling transcription.

Materials and methods

We used the 4C technique to identify long-range chromatin interactions and phage display methods: biopanning and ELISA to identify VHHs binding specifically to given protein targets.

Results

Analysis of the TCGA database indicated that in primary ccRCC tumors, genes encoding BAF60 subunits of the SWI/SNF CRC are partially inactive, whereas their expression is upregulated in metastases. The sequences encoding BAF60 and mutSMAD4 were cloned and the proteins were overexpressed. Subsequently, we identified anti-BAF60A and BAF60B VHHs, although identifying anti-mutSMAD4 VHHs is ongoing. In addition, long-range chromatin interactions with the promoter regions of PBRM1, ARID1A, ARID1B, SMARCA4, and SMARCD2 genes were detected.

Conclusions

The results indicate that the function of the chromatin remodeling machinery may be disrupted at different levels in ccRCC, and these changes may depend on the stage of the disease.

Funding

Polpharma Scientific Foundation 5/XVII/18 and National Science Center (Poland) grant No. 2018/30/M/NZ1/00180 for TJS.

Glycoprotein S from SARS-CoV-2 acts like superantigen and alters expression in human immune cells

M. Świątek ¹, M. Stachowiak ¹, Sz. Kubala ², P. Ćwiek ², J. Szurmak ², A. Świć ¹, K. Błachnio ⁴, J. Walewski ³, S. Markowicz ¹, T.J. Sarnowski ² [^], E. Sarnowska ¹ [^]

¹ *Department of Experimental Immunotherapy, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology, Warsaw, Poland*

² *Laboratory of Gene Expression Regulation, Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland*

³ *Department of Lymphoid Malignancies, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology, Warsaw, Poland*

⁴ *Department of Pathology and Clinical Pathology, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology, Warsaw, Poland*

[^] *Equal contribution*

Introduction

Outbreak of the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) pandemic resulted in urgent need for efficient treatment courses and ways to prevent new infections. The genome of this virus comprises of a single-stranded positive-sense RNA. Besides structural proteins (S, E, M and N), SARS-CoV-2 is built of sixteen non-structural proteins of distinct functions. The virus's entry into host cells is enabled by glycoprotein S (Spike), making it one of the most important SARS-CoV-2 structural proteins.

Materials and Methods

The Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMNC) were purified from buffy coats obtained from Blood Donation Center in Warsaw. Approximately $2,5 \times 10^7$ cells per milliliter were seeded in T25 cell culture bottles. Cells were treated with 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of SPIKE protein. Whole protein lysates were used for Western blot analysis. Total RNA was isolated and reverse transcribed. Subsequently, RT-qPCR analysis of expression was conducted. Additionally, cells were stained and analyzed with flow cytometry.

Results

Both RT-qPCR and Western blot unambiguously showed increase in proinflammatory cytokines levels. Indications of T-lymphocyte activation could be observed. The accumulation of cytokines progressively increased in time of cell culture. Our results seem to be in agreement with observation that in patients with severe COVID-19, occurs acute inflammation with hypercytokinemia. Additionally, we observed increase in PD-L1 gene expression. Furthermore, administration of protein S fragments leads to increase in TGF β 1 and TGF β 2 transcripts level. Interestingly, all observed alterations seem to be inter-individually variable.

Conclusions

- S1 fragment of SARS-CoV-2 Spike protein is highly immunogenic and may act as a superantigen,
- the accumulation of proinflammatory cytokines progressively increases in time of cell culture,
- the ability of Spike glycoprotein to regulate cytokines secretion affects inflammation and cytokine storm in COVID-19 patients,
- S glycoprotein fragments administration affects TGF β 1 and TGF β 2 expression,
- extensive lymphocyte exhaustion is observed.

Persistently activated CD4+ T cells induce the expression of PD-L1 and the expression of metastasis markers in HER-2-positive breast cancer cells

Agnieszka Świć¹, Małgorzata Stachowiak¹, Monika Świątek¹, Joanna Szarkowska¹, Katarzyna Błachnio², Karolina Miącz³, Sergiusz Markowicz¹, Natalia Rusetska¹, Elżbieta A. Sarnowska¹

¹ *Department of Experimental Immunotherapy, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology, Warsaw, Poland*

² *Department of Pathology, Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology, Warsaw, Poland*

³ *Department of Breast Cancer and Reconstructive Surgery, Maria Skłodowska-Curie National Institute of Oncology, National Research Institute in Warsaw, Poland*

Background

CD4+ effector T cells are capable to kill cancer cells, but undergo exhaustion due to the direct contact with cancer cells as well as via paracrine signaling from cancer cells. Immunotherapeutic strategies that target immune checkpoints pathways such as PD-1/PD-L1 enhances the response of immune cells to cancer cells. HER-2 positive breast cancer SK-BR-3 cells cultured in the absence of T-cells do not express the PD-L1 on their surface. Therefore we investigated if such PD-L1-negative cancer cells are capable to accelerate exhaustion of activated CD4+ T-cells.

Aims

Investigation of the ability of HER-2-positive SK-BR-3 human breast cancer cells to induce exhaustion of persistently activated CD4+ T-cells.

Methodology

Human CD4+ T-cells obtained from healthy donor were stimulated polyclonally with anti-CD3/CD28/CD2 mAb-coated stimulatory beads and IL-2 (10U/ml) for 12 days. On day 12, CD4+ T-cells were restimulated polyclonally without or in the presence SK-BR-3 cells. The co-culture of SK-BR-3 cells with activated CD4+ T-cells was carried out for 3 days.

Results

The co-culture of CD4+ T-cells and SK-BR-3 cells led to the induction of the expression of PD-L1 both on exhausted T-cells and cancer cells. Additionally, in the cancer cells that survived after co-culture with persistently activated CD4+ T-cells, the increase in the expression of invasiveness-associated markers was found, i.e.: Vimentin, CXCR4 receptor, VEGFA growth factor. Moreover, SK-BR-3 cells after co-culture with CD4+ T-cells downregulated the expression of HER-2 receptor on the mRNA level as well as on the protein level.

Conclusions

Our data suggest that downregulation of HER-2 expression by breast cancer cells, resulting from their interaction with activated CD4+ T cells, may be responsible for the acquired resistance to HER-2 targeting therapy and for development of HER-2-negative metastases derived from HER-2-positive primary tumor. Upregulation of the expression of metastasis markers induced in breast cancer cells due to the interaction with persistently activated T cells undergoing exhaustion may contribute to the increased metastatic potential of such cancer cells.

The role of alterations of epigenetic machineries on the development and progression of clear cell renal cell carcinoma

Magdalena Wilga¹, Anna Maassen¹, Weronika Gajewska¹, Natalia Rusetska², Szymon Kubala¹, Joanna Szarkowska², Janusz A. Siedlecki², Elżbieta Sarnowska², Tomasz J. Sarnowski¹

¹ *Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland*

² *Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology, Warsaw, Poland*

Introduction

The SWI/SNF chromatin remodeling complexes play essential role in processes relevant to cancer development. About 20% of human cancers demonstrate SWI/SNF aberrations. In 40% of clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) cases the mutation in PBRM1 gene, encoding SWI/SNF subunit, was found. Modification in composition of SWI/SNF subunits may cause loss of correct or gaining improper function, leading to de-regulation of important cellular processes. ccRCC is featured by numerous epigenetic changes, suggesting that they may play a role in regulation of the development and progression of ccRCC.

Materials and methods

This study was performed using A498, 786-O (primary), CAKI-1 (metastasis) ccRCC cell lines, and RPTEC line - as a non-cancer control. Expression of SWI/SNF subunits was assessed using RT-qPCR and Western Blot methods. Alterations of epigenetic modifications were studied using ChIP-qPCR, treatment cells with inhibitor of DNA methyltransferases and bioinformatic analysis of databases of DNA methylation. Immunohistochemistry staining of clinical samples was performed.

Results

We observed changes in expression profiles of genes encoding subunits of the SWI/SNF complex, including upregulation of SMARCD1 and SMARCD2 in the CAKI-1 metastatic line compared to the A498 primary tumor cell line. Presence of the BAF60B subunit in the cytoplasm was notified, which intensification seems to be correlated to recurrence of tumor. Differences in the presence of epigenetic factors on promoters of genes encoding subunits of the SWI/SNF complex were observed.

Conclusions

We postulate that SWI/SNF may play a novel role in ccRCC progression. Overexpression of SWI/SNF subunits in metastasis may become a target for new therapy. Increased presence of BAF60B in cytoplasm associated with cancer recurrence may be considered as potential new biomarker of higher risk of cancer recurrence.

Funding

Polpharma Scientific Foundation grant No. 5/XVII/18

Ocena zmian genetycznych w chrzestniakomięsakach ocenianych celowanym panelem genetycznym

Agnieszka E. Zając¹, Jakub Piątkowski², Paweł Golik^{2,3}, Anna Szumera-Ciećkiewicz^{4,5}, Paweł Teterycz¹, Andrzej Tysarowski⁶, Anna M. Czarnecka^{1,7}, Piotr Rutkowski¹

¹ Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie Państwowy Instytut Badawczy, Klinika Nowotworów Tkanek Miękkich, Kości i Czerniaków

² Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii, Instytut Genetyki i Biotechnologii

³ Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk

⁴ Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Patologii i Diagnostyki Laboratoryjnej

⁵ Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Zakład Diagnostyki Hematologicznej

⁶ Narodowy Instytut Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie Państwowy Instytut Badawczy, Samodzielna Pracownia Diagnostyki Genetycznej i Molekularnej Nowotworów

⁷ Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk, Zakład Farmakologii Doświadczalnej

Wstęp

Chrzestniakomięsak (ChS) jest drugim co do częstości pierwotnym złośliwym nowotworem kości, należącym do mięsaków kości. Leczenie ChS ogranicza się głównie do wycięcia chirurgicznego, a inne opcje terapeutyczne są niedostępne z uwagi na oporność tych nowotworów na chemio- i radioterapię. Genetyka ChS oraz udział poszczególnych mutacji w progresji ChS są mało poznane. Do najczęstszych zmian należą mutacje w genach IDH1/IDH2, TP53, COL2A1, EXT/EXT2, MDM2 oraz CDKN2A. Celem badania była identyfikacja potencjalnie patogennych mutacji w różnych podtypach ChS, mogących mieć udział w rozwoju tych nowotworów.

Materiały i metody

Do badania włączono 58 pacjentów z pierwotnym rozpoznaniem ChS w latach 2011-2019 (analizowane podtypy: 22 G1, 25 G2, 11 G3). Pacjenci byli leczeni radykalnie operacyjnie. DNA do badania wyizolowano z bloczków parafinowych pochodzących z guza pierwotnego. W celu analizy profilu mutacyjnego oraz obciążenia mutacyjnego (ang. tumor mutational burden, TMB) przeprowadzono sekwencjonowanie następnej generacji z wykorzystaniem celowanego panelu 409 genów (OncoPrint™ Tumor Mutation Load Assay). Oceny niestabilności mikrosatelitarnej (ang. microsatellite instability, MSI) dokonano z użyciem zestawu Idylla™ MSI Test.

Wyniki i wnioski

Średni poziom TMB w badanej grupie pacjentów był niski i wynosił 3,67 mutacji/Mb, u żadnego z pacjentów nie zaobserwowano MSI. Zidentyfikowano w sumie 450 potencjalnie patogennych wariantów genetycznych u 58 pacjentów. Wśród genów najczęściej zmutowanych były IDH1/IDH2, zidentyfikowane u 31% pacjentów, a także inne geny zaangażowane w procesy remodelingu chromatyny oraz uczestniczące w szlakach sygnałowych (m.in. ATRX, LRP1B, GPR124, KDM5C oraz ARID1A). Obecność genów supresorowych TP53 i RB1 u 12% pacjentów z podtypami G2 i G3, może sugerować udział szlaku p53 w progresji ChS. Warianty liczby kopii zidentyfikowano u 17% pacjentów, z czego amplifikacje były przeważającym typem mutacji w stosunku do delecji i dotyczyły w sumie 66 różnych genów. Amplifikacje obserwowano głównie w podtypach o wyższym stopniu złośliwości - G2, G3, co może sugerować udział tego typu zmian w patogenezie bardziej agresywnych podtypów ChS.

Molecular characteristics of sarcomas diagnosed in Maria Skłodowska-Curie National Research Institute Of Oncology Using Targeted Sequencing

Agnieszka E. Zając ¹, Katarzyna A. Seliga ², Andrzej Tysarowski ², Michał Wągradzki ³, Anna Szumera-Ciećkiewicz ^{3 4}, Piotr Wiśniewski ³, Anna M. Czarnecka ^{1 5}, Piotr Rutkowski ¹

¹ *Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology, Department of Soft Tissue/Bone Sarcoma and Melanoma*

² *Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology, Department of Cancer Molecular and Genetic Diagnostics*

³ *Maria Skłodowska-Curie National Research Institute of Oncology, Department of Pathology and Laboratory Diagnostics*

⁴ *Institute of Hematology and Transfusion Medicine, Department of Diagnostic Hematology*

⁵ *Medical Research Centre Polish Academy of Science, Department of Experimental Pharmacology*

Introduction

Sarcomas are a rare and heterogeneous group of malignant tumors. They constitute around 1% of all adult neoplasms. Treatment of sarcomas is complex and depends on specific subtype, therefore the proper diagnose is essential to implement appropriate treatment. Chromosomal translocation are common among sarcomas (approximately 20%) and for that reason are widely used in diagnostics. The aim of these study was to characterize molecular changes among different subtypes of sarcomas and evaluate their role in proper diagnosis.

Materials and methods

In the study, 56 patients with diagnosed sarcoma between 2016-2022 with detected genetic aberration were enrolled. Analyzed cases included 23 Ewing sarcomas, 5 solitary fibrous tumors, 4 CIC-rearranged sarcomas, 3 synovial sarcomas, 3 chondrosarcomas, 2 sclerosing epithelioid fibrosarcoma, 2 perivascular epithelioid cell sarcoma, 2 dermatofibrosarcoma protuberans, 2 undifferentiated pleomorphic sarcoma, 1 not otherwise specified (NOS) sarcoma, and 9 others. RNA for the analysis was isolated from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue. Genetic aberrations or gene fusions detection was performed by next generation sequencing (NGS), using Archer™ FusionPlex™ Sarcoma Panel of 26 genes related to sarcomas.

Results and conclusions

We identified 25 different gene fusions. FLI1-EWSR1, DUX4-CIC, NAB2-STAT6, and SSX2-SS18 fusions were the most frequently observed. Identified fusions were typical for particular subtype, however some uncommon fusions were also observed - MAP2K1-SPARC in undifferentiated pleomorphic sarcoma, SMPDL3B-NTRK3 in NOS, and DBET-CIC and CASP10-NRG1 in Ewing sarcoma. NGS confirmed primary diagnosis in 15/56 (26.8%) of patients, whereas it allowed to change diagnosis in almost 24/56 (42.9%) of cases. In 6 of those 24 (25%) patients, previous FISH analysis was false positive or negative. Presented result showed that NGS analysis is essential in diagnosis and should always be considered as additional diagnostic method. In case of unclassified sarcomas or sarcomas with uncommon genetic aberrations, NGS may allow consideration of available targeted treatment.



Narodowy Instytut Onkologii

im. Marii Skłodowskiej-Curie
Państwowy Instytut Badawczy



*filles qu'au
de sentir le
sont venter beau
dehors lui he
mes les cou
et, se pro
sente de son
longueurs
ait souf
de l'Le*

*à l'arr
jours et
laisier. Tu d
à dénomé Eve
ras fachée de la
bien que son ar
comme conséquena
priver de son man
l'était très commode
ta lui diras aussi
armis se portent
t lui souhaitent*

*avons un te
e, ce qui
Mais j'aimera
avoir moi
de brune
mais en*

*15. Vendr
ta vas être
dans un jo
à l'Arconest
ours et cela me
air. Tu diras a
dénomé Eve que
fachée de la
bien que son arriv
une conséquena fai
priver de son man
l'était très commode
de lui diras aussi
armis se portent
lui souhaitent*