

AUTOREFERAT

1. IMIĘ I NAZWISKO

dr n. med. Agnieszka Adamczyk

ubiegająca się o nadanie stopnia doktora habilitowanego

2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE – Z PODANIEM NAZWY, MIEJSCA I ROKU ICH UZYSKANIA ORAZ TYTUŁU ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

1998: MAGISTER BIOLOGII

- Praca magisterska pt.: „Interakcje komórek nowotworowych z makrofagami”
- Miejsce wykonania: Zakład Mikrobiologii i Immunologii Instytutu Biologii Molekularnej Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie
- Promotor: prof. dr hab. J. Pryjma

2001: M.SC. IN RADIATION BIOLOGY

- Praca magisterska pt.: „Influence of p53 status on radiation induced genomic instability in murine osteoblastic cell lines with different p53 background”
- Miejsce wykonania: University College London, Londyn, Wielka Brytania
- Supervisor: K.M Prise

2008: DOKTOR NAUK MEDYCZNYCH W DZIEDZINIE BIOLOGIA MEDYCZNA

- Praca doktorska pt.: „Ocena predykcyjnego znaczenia promieniowrażliwości fibroblastów zrębu nowotworu i limfocytów u chorych na raka szyjki macicy”
- Miejsce wykonania: Zakład Radiobiologii Klinicznej, Centrum Onkologii - Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Krakowie.
- Promotor: prof. dr hab. Anna Gasińska
- Stopień nadany przez Radę Naukową Centrum Onkologii – Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie, 17.12.2008

3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

Od 1998 do 2017 - Zakład Radiobiologii Klinicznej, Centrum Onkologii - Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Krakowie.

Od 2017 do chwili obecnej Zakład Patomorfologii Nowotworów, Centrum Onkologii - Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie, Oddział w Krakowie.

- od 2000 do 2009 asystent naukowo-badawczy.
- od 2009 adiunkt naukowo-badawczy.

4. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA WYNIKAJĄCEGO Z ART. 16 UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 R. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (DZ. U. 2017 r. poz. 1789)

4a): TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

Prognostyczne znaczenie wybranych parametrów biologicznych, ze szczególnym uwzględnieniem potencjalnych markerów oporności na trastuzumab, u chorych na raka piersi z nadekspresją HER2

4b) AUTOR/AUTORZY, TYTUŁ/TYTUŁY, ROK WYDANIA, NAZWA WYDAWNICTWA:

W przedstawionym poniżej opisie cyklu 6 prac cytowane są publikacje wykazane w tabeli 1. Każda z wymienionych publikacji posiada swój numer, którym oznaczona jest również każda z załączonych do wniosku prac.

Tabela 1. Cykl prac wchodzących w skład osiągnięcia

	PRACA: autorzy, tytuł, wydawca, rok wydania	Impact Factor
1	Grela-Wojewoda A, Niemiec J, Sas-Korczyńska B, Cedrych I, Domagała-Haduch M, Adamczyk A , Ambicka A, Kołacz J, Jakubowicz J. Prognostic Role of Nodal Status and Clinically Asymptomatic Valvular Insufficiency in Patients with HER2-positive Breast Cancer Treated with Chemotherapy, Radiotherapy and Trastuzumab in an Adjuvant Setting. Anticancer Res. 2015;35(7):4063-72. <i>Mój udział procentowy szacuję na 10%.</i>	1,895
2	Adamczyk A , Niemiec J, Janecka A, Harazin-Lechowska A, Ambicka A, Grela-Wojewoda A, Domagała-Haduch M, Cedrych I, Majchrzyk K, Kruczak A, Ryś J, Jakubowicz J. Prognostic value of <i>PIK3CA</i> mutation status, PTEN, androgen receptor expression for metastases free survival a in HER2 positive breast cancer patients treated with trastuzumab in adjuvant setting. Pol J Pathol 2015; 66 (2): 133-141 <i>Mój udział procentowy szacuję na 50%.</i>	1,240*

3	Adamczyk A , Niemiec J, Ambicka A, Mucha-Małecka A, Ryś J, Mituś J, Wysocki WM, Cichocka A, Jakubowicz J. Survival of breast cancer patients according to changes in expression of selected markers between primary tumor and lymph node metastases. <i>Biomark Med.</i> 2016; 10(3):219-28. <i>Mój udział procentowy szacuję na 60%.</i>	2,020*
4	Adamczyk A , Grela-Wojewoda A, Domagała-Haduch M, Ambicka A, Harazin-Lechowska A, Janecka A, Cedrych I, Majchrzyk K, Kruczak A, Ryś J, Niemiec J. Proteins Involved in HER2 Signalling Pathway, Their Relations and Influence on Metastasis-Free Survival in HER2-Positive Breast Cancer Patients Treated with Trastuzumab in Adjuvant Setting. <i>J Cancer.</i> 2017 Jan 1;8(1):131-139. <i>Mój udział procentowy szacuję na 60%.</i>	3,249
5	Niemiec J, Adamczyk A , Harazin-Lechowska A, Ambicka A, Grela-Wojewoda A, Majchrzyk K, Kruczak A, Sas-Korczyńska B, Ryś J. Podoplanin-positive Cancer-associated Stromal Fibroblasts in Primary Tumor and Synchronous Lymph Node Metastases of HER2-overexpressing Breast Carcinomas. <i>Anticancer Res.</i> 2018 Apr;38(4):1957-1965. <i>Mój udział procentowy szacuję na 20%.</i>	1,865*
6	Adamczyk A , Kruczak A, Harazin-Lechowska A, Ambicka A, Grela-Wojewoda A, Domagała-Haduch M, Janecka-Widła A, Majchrzyk K, Cichocka A, Ryś J, Niemiec J. Relationship between HER2 gene status and selected potential biological features related to trastuzumab resistance and its influence on survival of breast cancer patients undergoing trastuzumab adjuvant treatment. <i>Onco Targets Ther.</i> 2018 Aug 3;11:4525-4535. doi: 10.2147/OTT.S166983. eCollection 2018. <i>Mój udział procentowy szacuję na 60%.</i>	2,656*
SUMA:		12,925

* impact factor za rok 2017

Nagroda im. Hilarego Koprowskiego przyznawana przez Polskie Towarzystwo Onkologiczne za najlepszą polską pracę naukową w dziedzinie onkologii za rok 2016 dla zespołu, za cykl prac, wykaz dorobku IIj

Oświadczenie, dotyczące mojego udziału procentowego w powstanie poszczególnych publikacji oraz zakresu pracy znajdują się w załączniku nr 4 oraz 7. Oświadczenia pozostałych współautorów publikacji, określające ich indywidualny wkład w powstanie poszczególnych prac znajdują się w załączniku nr 7.

4c) OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO WW. PRAC I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW WRAZ Z OMÓWIENIEM ICH EWENTUALNEGO WYKORZYSTANIA

W omawianym cyklu 6 prac prezentowane są wyniki, uzyskane podczas realizacji dwóch grantów przyznanych przez: (i) Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (N N401 2344) oraz Narodowe Centrum Nauki (2013/09/B/NZ5/00764). W pierwszym z nich pełniłam funkcję kierownika, w drugim wykonawcy.

Dwie z wyżej wymienionych z publikacji wchodzi w skład 12 prac wyróżnionych Nagrodą im. Hilarego Koprowskiego przyznaną przez Polskie Towarzystwo Onkologiczne za najlepszą polską pracę naukową w dziedzinie onkologii za rok 2016. Byłam autorką/współautorką 10 z 12 nagrodzonych prac.

Wyniki, które obejmują cykl 6 publikacji były także prezentowane podczas konferencji międzynarodowych i krajowych. Wygłosiłam jeden wykład (wykaz dorobku habilitacyjnego: tabela 5, pozycja 3) i jestem autorem/współautorem 13 doniesień konferencyjnych (wykaz dorobku habilitacyjnego: tabela 6, pozycja 13, 14, 16, 19; tabela 7, pozycja 26, 29-32, 34, 35, 38, 41). Dwa z wyżej wymienionych plakatów zostały wyróżnione: (i) (Best Poster Award) podczas World Congress on Controversies in Breast Cancer (CoBRA). Melbourne, Australia, 22-24.10. 2015 oraz (ii) na XVII Zjeździe Polskiego Towarzystwa Badań Radiacyjnych. Siedlce, Polska. 27-30.09.2016 (wykaz dorobku habilitacyjnego: punkt IIj; pozycja 4, 5).

4.C.1. WSTĘP

Rak piersi jest najczęstszym złośliwym nowotworem u kobiet. Badania techniką mikromacierzy pozwoliły na opracowanie klasyfikacji podtypów molekularnych tego nowotworu. Obecnie podtypy identyfikuje się za pomocą oznaczanej immunohistochemicznie ekspresji 4 białek: receptora estrogenowego (ER) i progesteronowego (PR), receptora naskórkowego czynnika wzrostu 2 (HER2) oraz antygenu proliferacyjnego Ki-67.

Na ich podstawie wyróżnia się:

- podtyp luminalny A cechujący się ekspresją receptorów steroidowych (ER i PR) oraz niskim indeksem proliferacyjnym,
- podtyp luminalny B, w którym stwierdza się ekspresję receptorów steroidowych i nadekspresję HER2 (HER2 dodatni rak luminalny B) lub ekspresję receptorów

steroidowych, brak ekspresji HER2 i wysoki indeks proliferacyjny (HER2 ujemny rak luminalny B)

- podtyp z nadekspresją białka HER2 charakteryzujący się nadekspresją HER2 i brakiem ekspresji ER i PR
- rak potrójnie ujemny cechujący się brakiem ekspresji ER, PR i HER2.

Wykazano, że podtypy raka piersi cechują się odmiennymi parametrami biologicznymi, histologicznymi i posiadają inny profil zmian genetycznych a także charakteryzują się różną wrażliwością na leczenie a co za tym idzie różnym rokowaniem.

Nadekspresja receptora dla naskórkowego czynnika wzrostu 2 (HER2) dotyczy około 20-25% przypadków naciekającego raka piersi i jest związana ze złym rokowaniem. Badania kliniczne wykazały, że włączenie do leczenia trastuzumabu powoduje wydłużenie czasu do nawrotu choroby i całkowitego czasu przeżycia. Trastuzumab jest przeciwciałem skierowanym przeciwko IV domenie zewnątrzkomórkowej części receptora HER2. Trastuzumab wiążąc się z receptorem HER2 blokuje kaskady sygnałowe, które są uruchamiane przez receptor HER2 a także stymuluje układ immunologiczny gospodarza aktywując mechanizm cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał. W czasie, w którym była zbierana analizowana w cyklu publikacji grupa chorych (2007-2014) trastuzumab był stosowany jako standard w leczeniu uzupełniającym chorych leczonych radykalnie z powodu raka piersi z nadekspresją receptora HER-2.

Badania kliniczne, w zaawansowanym raku piersi z zastosowaniem trastuzumabu w monoterapii wykazały, że zaledwie 10-34% chorych odpowiedziało na leczenie. Może to sugerować występowanie u części pacjentek mechanizmów, które powodują zmniejszoną wrażliwość na ten lek.

Czynniki biologiczne, które mogą odpowiadać za potencjalną oporność na trastuzumab mogą być związane z:

- samym białkiem HER2 (forma HER2 Δ 16, ucięta forma p95HER2, amplifikacja genu *HER2*, domena zewnątrzkomórkowa (ECD) krążąca w krwiobiegu),
- innymi białkami błonowymi (białka rodziny EGFR: EGFR, HER3, HER4 a także IGFR, Met, MUC4),
- białkami obecnymi we wnętrzu komórki (PTEN, SRC, PI3K, p27, białka powiązane ze szlakiem przekazu sygnału receptora estrogenowego),

- czynnikami niezwiązanymi z komórką nowotworową (polimorfizm receptorów FcγRIIa i FcγRIIIa, cechy podścieliska).

Potencjalne mechanizmy, które mogą być zaangażowane w oporność na trastuzumab to:

- nadekspresja białka MUC4 wiążącego się z HER2 co skutkuje zmniejszeniem dostępności zewnątrzkomórkowej domeny białka HER2 dla trastuzumabu,
- aktywacja kaskad sygnałowych HER2 (PI3K/Akt lub/i Ras/MAPK) przez alternatywne mechanizmy: (a) receptor dla insulinopodobnego czynnika wzrostu (IGF-1R), (b) białka z rodziny EGFR (EGFR3, EGFR4, EGFR1), które heterodimeryzują z HER2, (c) receptor MET, (d) ucięta forma białka HER2 (p95HER2),
- ciągła, niezależna od HER2 aktywacja białek kaskady sygnałowej HER2: (a) dezaktywująca mutacja lub utrata białka PTEN, (b) mutacja genu *PIK3CA* (ekson 9 i 20) aktywująca białko PI3K (3-kinazę fosfatydyloinozytolu),
- zmniejszona ekspresja białka p27 (inhibitora cyklu komórkowego),
- interakcje kaskad sygnałowych uruchamianych przez HER2 i ER/PR,
- różny stopień aktywacji mechanizmu cytotoksyczności komórkowej zależnej od przeciwciał spowodowany polimorfizmem receptorów FcγRIIa i FcγRIIIa obecnych na powierzchni komórek układu immunologicznego,
- wybrane cechy podścieliska np. fenotyp fibroblastów związanych z nowotworem, zmiany w gęstości naczyń krwionośnych i limfatycznych zapewniających odpowiedni poziom perfuzji guza i, co za tym idzie, właściwą dostępność leków.

Większość badań dotyczących czynników prognostycznych skupia się na charakterystyce samych komórek nowotworowych. Jednakże badania *in vitro* i badania oparte na modelach zwierzęcych sugerują bardzo istotną rolę komórek zrębu nowotworowego w przebiegu progresji guza. Badania sugerują, że następujące parametry związane ze zrębem mogą mieć znaczenie prognostyczne: (i) stosunek guza do zrębu; (ii) skład podścieliska nowotworu (podścielisko zdominowane przez fibroblasty, kolagen lub limfocyty); (iii) obecność fibroblastów związanych z nowotworem (cancer-associated fibroblast CAF) wykazujących ekspresję podoplaniny. Sugeruje się, że CAFs mogą przyczyniać się do: inicjacji nowotworu, proliferacji, migracji i inwazyjności komórek nowotworowych, przeprogramowania metabolicznego środowiska nowotworu a także

angio- i limfangiogenezy. Jednym z najbardziej intensywnie badanych białek związanych z CAFs jest podoplanina. Co więcej, stwierdzono, że w podtypie raka piersi z nadekspresją HER2 stosunkowo często obserwuje się fibroblasty związane z nowotworem wykazujące ekspresję podoplaniny (pCAFs).

W niezaawansowanym raku piersi z nadekspresją receptora HER2, leczenie ma najczęściej charakter skojarzony i obejmuje zabieg chirurgiczny połączony z napromienianiem, leczeniem chemicznym, hormonoterapią oraz leczeniem celowanym. Leczenie dobierane jest indywidualnie, z uwzględnieniem czynników klinicznych i biologicznych. Analizowana w cyklu publikacji grupa chorych (2007-2014) leczona była zgodnie z obowiązującymi w tym czasie standardami. Po radykalnym leczeniu operacyjnym stosowano uzupełniające leczenie chemiczne, napromienianie, hormonoterapię (w zależności od wskazań) i ostatecznie trastuzumab. Obecnie leczenie trastuzumabem stosowane jest w schemacie adjuwantowym i neoadjuwantowym.

Badanie HERA (HERceptin Adjuvant) wykazało, że w grupie chorych z nadekspresją receptora HER2 leczonych trastuzumabem prawdopodobieństwo 10-letniego przeżycia bezobjawowego wynosiło 69%. W przerzutującym raku piersi w badaniu CLEOPATRA prawdopodobieństwo 4-letniego przeżycia całkowitego w ramieniu z trastuzumabem wynosiło 45,4%, natomiast przy zastosowaniu podwójnej blokady trastuzumab i pertuzumab (bloker heterodimeryzacji HER2 z EGFR, HER3 i HER4) prawdopodobieństwo wzrosło do 57,6%.

Ubocznym efektem leczenia stosowanego w przypadku raka piersi z nadekspresją HER2 są powikłania ze strony układu sercowo-naczyniowego. Zjawisko kardiotoksyczności, które po raz pierwszy zaobserwowano u osób leczonych antracyklinami, niestety często towarzyszy terapii nowotworowej.

Częstość występowania tych objawów nie jest zaskakująca jeśli weźmie się pod uwagę, że większość możliwych do wyboru składowych leczenia uzupełniającego, a więc leczenie napromienianiem, chemiczne (szczególnie antracykliny) a także leczenie celowane, mają działanie kardiotoksyczne, aczkolwiek częstość występowania, intensywność i objawy mogą się różnić w zależności od sposobu leczenia. Zarówno trastuzumab, jak i chemioterapeutyki czy napromienianie wpływają na fizjologię komórek mięśnia sercowego i komórek podścieliska. Antracykliny i napromienianie indukują wytwarzanie reaktywnych form tlenu, powodując uszkodzenie DNA komórki i promując ekspresję p53 i zatrzymanie cyklu komórkowego. Uszkodzenie śródbłónka wywołane promieniowaniem jest odpowiedzialne

za zwiększoną przepuszczalność naczyń i zapalenie, które dodatkowo aktywuje kaskady prowadzące do zwłóknienia ścian naczyń i tkanki łącznej serca, jak również uszkodzenia komórek mięśnia sercowego. Kardiotoksyczność indukowana przez antracykliny obejmuje dysfunkcję lewej komory, zaburzenia wartości LVEF (frakcji wyrzutowej lewej komory), niewydolność serca, zapalenie mięśnia sercowego i arytmie. Kardiotoksyczność związana ze stosowaniem trastuzumabu manifestuje się podobnymi objawami jakie wywołują antracykliny, jednakże uważa się, że są to procesy odwracalne. Mechanizmy kardiotoksyczności wywołanej przez trastuzumab związane są głównie z bezpośrednim wiązaniem się z receptorem HER2, który ulega ekspresji w komórkach mięśnia sercowego. Wiąże się to z zaburzeniem prawidłowego działania komórki: wzrostem, mechanizmami naprawy, regulacją funkcji mitochondriów oraz apoptozą.

Do cyklu prac włączono również pracę porównującą zmianę ekspresji szeregu białek pomiędzy guzem pierwotnym i synchronicznym przerzutem w węźle chłonnym i wpływu tej zmiany na przeżycie chorych. Praca ta dotyczyła grupy chorych leczonych chemicznie i obejmującej podtypy: luminalny A i B, z nadekspresją HER2 i potrójnie ujemny. Celem było stwierdzenie czy zmiany, szczególnie w obrębie ekspresji receptora estrogenowego, progesteronowego oraz HER2, pomiędzy guzem pierwotnym i synchronicznym przerzutem w węźle chłonnym są zależne od konkretnego podtypu molekularnego guza.

4.C.2. CEL

- I. Wyróżnienie potencjalnych markerów oporności na trastuzumab w oparciu o analizę przeżycia całkowitego, wolnego od przerzutów i bezobjawowego, w tym:
 - ocena ekspresji białek: PTEN, IGF-1R β , MUC4, HER3, HER4, EGFR, AR, Ki-67
 - ocena dwóch mutacji w genie *PIK3CA* (mutacje p.H1047R, p.E545K)
 - ocena genu *HER2* (ocena amplifikacji, stosunku *HER2/CEP17* oraz polisomi)
 - ocena obecności fibroblastów związanych z nowotworem wykazujących ekspresję podoplaniny
- II. Pogłębienie wiedzy na temat biologii raka piersi z nadekspresją receptora HER2 dzięki analizie wzajemnych korelacji pomiędzy badanymi parametrami oraz zależności pomiędzy nimi a czynnikami klinicznymi i histologicznymi.

- III. Ocena obecności fibroblastów związanych z nowotworem wykazujących ekspresję podoplaniny w guzie pierwotnym i synchronicznym przerzucie w węźle chłonnym.
- IV. Ocena zmian w ekspresji receptora estrogenowego, progesteronowego oraz HER2 pomiędzy guzem pierwotnym i synchronicznym przerzutem w węźle chłonnym.
- V. Zbadanie wpływu wczesnych i subklinicznych powikłań kardiologicznych w postaci niedomykalności zastawek o dowolnym stopniu nasilenia i zmian w LVEF (frakcji wyrzutowej lewej komory) na przeżycie wolne od przerzutów pacjentów z HER2-dodatnim rakiem piersi leczonych uzupełniająco chemicznie, napromienianiem i trastuzumabem.

4.C.3. MATERIAŁ I METODY

W publikacjach 1, 2, 4-6 analizowano grupę ($T \geq 1$, $N \geq 0$, $M0$) chorych na raka piersi z nadekspresją receptora HER2 leczonych operacyjnie z następowym leczeniem chemicznym i trastuzumabem. Radykalne leczenie operacyjne przeprowadzono w Klinice Chirurgii Onkologicznej, Centrum Onkologii, Oddział w Krakowie w latach 2007 – 2014. Następnie zastosowano uzupełniająco leczenie chemiczne, hormonoterapię, napromienianie (w zależności od wskazań) i ostatecznie trastuzumab.

Dane dotyczące ekspresji receptora estrogenowego (ER) i progesteronowego (PR) oraz HER2 ocenianych immunohistochemicznie uzyskano z historii chorób.

Tylko w przypadku barwienia immunohistochemicznego ocenianego na 2+, wykonywane jest diagnostycznie oznaczenie amplifikacji genu *HER2* metodą FISH, i możliwe było uzyskanie tej informacji z historii choroby. Dlatego też dla większości chorych (wszystkie przypadki gdy wynik barwienia IHC oceniono na 3+) dodatkowo oznaczono status genu *HER2* (amplifikacja, stosunek *HER2/CEP17*, polisomia) przy zastosowaniu metody FISH.

Ekspresję białek: EGFR, HER3, HER4, IGFR, MUC4, PTEN, podoplaniny, Ki-67, AR analizowano w oparciu o barwienia immunohistochemiczne na skrawkach parafinowych z materiału utrwalonego w formalinie.

Dodatkowo materiał nowotworowy zatopiony w parafinie posłużył do oceny mutacji *PIK3CA* (H1047R i E545K). DNA wyizolowano z tkanki nowotworowej utrwalonej w formalinie i zatopionej w parafinie a obecność mutacji oceniono metodą qPCR.

W celu oceny niedomykalności zastawek oraz zmiany frakcji wyrzutowej lewej komory (LVEF) wykonano badanie echokardiologiczne. Badania te wykonano przed, w trakcie i po zakończeniu leczenia trastuzumabem.

W publikacji nr 3 dotyczącej problemu odróżnicowania ekspresji szeregu białek w przerzucie do węzłów chłonnych w różnych podtypach molekularnych analizowano grupę chorych (T $\geq$ 1, N $\geq$ 1, M0) na raka piersi leczonych uzupełniająco chemicznie. Pacjentki nie były uprzednio leczone chemicznie ani napromienianiem. Radykalne leczenie operacyjne przeprowadzono w Klinice Chirurgii Onkologicznej, Centrum Onkologii, Oddział w Krakowie w latach 2001 – 2011. Następnie zastosowano uzupełniającą chemioterapię, hormonoterapię, radioterapię (w zależności od wskazań).

W oparciu o barwienia immunohistochemicznie na skrawkach parafinowych z materiału utrwalonego w formalinie analizowano ekspresję następujących białek: ER, PR, HER2, CK5/6, P-kadheryny, CD44, CD24, ALDH, Ki-67, EGFR, Ep-CAM. Ocenę ekspresji przeprowadzono w materiale z guza pierwotnego oraz synchronicznego przerzutu do węzłów chłonnych.

Dokładana charakterystyka analizowanych grup jest umieszczona w artykułach, wraz z opisem stosowanych procedur statystycznych.

4.C.4. WYNIKI

4.C.4.1. Obecność wybranych, potencjalnych czynników oporności na trastuzumab w komórkach raka piersi z nadekspresją HER2

W badanej grupie raków piersi z nadekspresją HER2 w około połowie przypadków nie wykryłam ekspresji receptorów estrogenowego i progesteronowego (artykuł nr 2, 4, Tabela 1). Ekspresja AR była obecna w 78,6% przypadków (artykuł nr 2, Tabela 1), EGFR w 18,0%, HER3 w 28,3%, MUC4 w 33,3% a PTEN 18,9% przypadków (artykuł nr 4, Tabela 1).

Statystycznie istotnie niższą wartość indeksu wiązania Ki-67 zaobserwowałam w guzach bez ekspresji EGFR (p=0,022), a także w nowotworach z ekspresją PTEN (p=0,035).

Wyższy poziom Ki-67LI był obecny w nowotworach w stopniu G3 i bez ekspresji ER/PR, jednak te zależności nie osiągnęły istotności statystycznej. Nowotwory charakteryzujące się brakiem ekspresji MUC4 zazwyczaj nie wykazywały także ekspresji PTEN i HER3 (artykuł nr 4, Tabela 1). Ekspresja AR wiązała się z brakiem ekspresji EGFR (artykuł nr 2, Tabela 1).

Ocena mutacji w genie *PIK3CA* wykazała obecność w 14,0% guzów mutacji H1047R i w 2,0% mutacji E545K. Nie wykryłam związku między mutacjami w genie *PIK3CA* a ekspresją badanych białek, stopniem zaawansowania nowotworu (pT), zajęciem węzłów chłonnych (pN) czy stopniem złośliwości nowotworu (artykuł nr 4, Tabela 1).

4.C.4.2. Status genu *HER2* i zależności między innymi czynnikami biologicznymi i klinicznymi

Badania dotyczące zależności pomiędzy statusem genu *HER2* (parametry ocenione metodą FISH: liczba kopii genu *HER2* na komórkę, stosunek sygnałów pochodzących od sond *HER2/CEP17*, polisomia) a parametrami biologicznymi w tym potencjalnymi markerami oporności na trastuzumab są bardzo rzadkie. Zgodnie z wiedzą autorki jest to pierwsze badanie, w którym oceniłam zależność pomiędzy statusem *HER2* i wieloma potencjalnymi czynnikami oporności na trastuzumab (ekspresja PTEN, IGF-1R, MUC4, EGFR, HER3, HER4, mutacje w genie *PIK3CA*) a także parametrami klinicznymi.

W badanej grupie na podstawie barwienia IHC, 29 guzów wykazywało ekspresję receptora *HER2* ocenioną na 2+, a 86 ocenioną jako silna (3+) (artykuł nr 6, Tabela 1). Barwienie FISH wykazało amplifikację genu *HER2* w 115 przypadkach, jednak w 2 przypadkach z silną ekspresją białka (3+) nie wykazano amplifikacji genu *HER2*. Warto nadmienić, że u obu chorych w okresie obserwacji nie wystąpiła wznowa ani przerzuty (22 i 94 miesiące obserwacji). Silna ekspresja receptora *HER2* (IHC 3+) wiązała się ze zwiększoną amplifikacją genu *HER2* ocenioną metodą FISH czyli wyższej liczbie kopii genu *HER2* na komórkę i wyższemu stosunkowi sygnałów pochodzących od sond *HER2/CEP17*.

Dodatkowo wykazałam związek między parametrami ocenianymi w FISH a markerami ocenianymi immunohistochemicznie:

- niższą amplifikację genu *HER2* (niższą liczbę kopii *HER2* na komórkę i niższy stosunek *HER2/CEP17*) obserwowałam w nowotworach z dodatnimi receptorami steroidowymi.
- wyższa amplifikacja *HER2* (liczba kopii genu *HER2*) korelowała z silną ekspresją *HER4* i słabszą ekspresją *HER3* oraz IGF-1R

Inne parametry, w tym pT, pN, mutacje w genie *PIK3CA*, ekspresja EGFR i MUC4 nie były związane ze stanem genu *HER2*.

Zaobserwowałam, że nowotwory z polisomią charakteryzowały się większą liczbą kopii genu *HER2* na komórkę, ale niższym stosunkiem *HER2/CEP17*.

4.C.4.3. Ekspresja podoplaniny w fibroblastach podścieliska nowotworu

Zjawisko obecności fibroblastów z ekspresją podoplaniny w podścielisku nowotworu (pCAFs) i ich wpływu na przeżycie chorych było już poruszane w literaturze. Natomiast, w przedstawionej pracy po raz pierwszy dokonano oceny różnic w ich występowaniu pomiędzy guzem pierwotnym a przerzutem do węzła chłonnego. Ekspresję podoplaniny w fibroblastach związanych z nowotworem wykryto w przypadku 167 z 203 badanych guzów pierwotnych i w 35 z 87 synchronicznych przerzutów w węźle chłonnym (artykuł nr 5, Tabela 1). Zaobserwowano podobny wzór barwienia podoplaniną między guzem a węzłem chłonnym ($p < 0,001$). Wśród 87 par guz-węzeł, w 52 przypadkach ekspresja podoplaniny została wykazana w obu lokalizacjach, a w 12 przypadkach w obu lokalizacjach obserwowano brak ekspresji.

W celu stwierdzenia pochodzenia pCAFs w przerzucie do węzła chłonnego, dodatkowo została zbadana ekspresja markerów specyficznych dla komórek dendrytycznych grudek chłonnych i komórek fibroblastycznych siateczki, wchodzących w skład podścieliska węzła: podoplaniny, CD21 i α SMA. Takie badanie, według wiedzy autorki nie zostało do tej pory przeprowadzone i było pierwszą taką próbą identyfikacji pochodzenia pCAFs w przerzucie. Zarówno w przypadku guza pierwotnego jak i węzła, pCAF wykazywały ekspresję α SMA i brak ekspresji CD21. Taki ich immunofenotyp sugeruje, że komórki te nie wywodzą się pierwotnie z węzła chłonnego.

4.C.4.4. Prognostyczne znaczenie analizowanych parametrów biologicznych

Wykazałam, że u chorych na przewodowego naciekającego rak piersi z nadekspresją *HER2* leczonych uzupełniająco chemicznie i trastuzumabem niekorzystnymi czynnikami rokowniczymi wpływającymi na prawdopodobieństwo przeżycia wolnego od przerzutów (artykuły nr 1-4, 6) lub bez objawów choroby (artykuł nr 5) są:

- wysoki indeks wiązania Ki-67 ($Ki-67 > 50\%$) ($p = 0,014$, $p = 0,027$) (odpowiednio artykuł nr 2, 4, Tabela 1)

- jednoczesna ekspresja AR i brak ekspresji PTEN ($p=0,007$) (artykuł nr 2, Tabela 1)
- zajęcie węzłów chłonnych w stopniu pN2+3, ($p=0,041$, $p=0,040$) (artykuł nr 1, 2, Tabela 1)
- ekspresja HER3 ($p=0,018$) (artykuł nr 6, Tabela 1)
- ekspresja HER3 jednocześnie połączona z brakiem ekspresji PTEN ($p=0,043$) (artykuł nr 4, Tabela 1),
- ekspresja HER3 jednocześnie połączona z wysokim stosunkiem sygnałów od sond *HER2/CEP17* ($p=0,001$) (artykuł nr 6, Tabela 1)
- obecność w zrębie nowotworu fibroblastów z ekspresją podoplaniny ($p=0,058$) (artykuł nr 5, Tabela 1)
- wykryta niedomykalność zastawek podczas lub po terapii trastuzumabem ($p=0,001$) (artykuł nr 1, Tabela 1)

W badanej grupie, potencjalnym czynnikiem oporności na trastuzumab najsilniej wpływającym na przeżycie chorych leczonych trastuzumabem wydaje się być ekspresja receptora HER3. Niekorzystny wpływ ekspresji HER3 na przeżycie, może tłumaczyć fakt, że heterodimer HER2/HER3 jest uważany za najsilniejszy stymulator kaskad sygnałowych prowadzących do proliferacji komórki. Badania dotyczące receptora HER3 są niejednoznaczne, aczkolwiek meta-analiza obejmująca różne typy guzów wykazała, że ekspresja HER3 wiązała się z gorszym przeżyciem.

Badalam także wpływ poziomu amplifikacji na przeżycie u chorych leczonych uzupełniająco chemicznie i trastuzumabem. Badania dotyczące tego zagadnienia należą do rzadkości. Meta-analiza, opublikowana w 2016 roku opierała się na tylko trzech badaniach. W badanej grupie wysoki stosunek sygnałów od sond *HER2/CEP17* wiązał się z gorszym przeżyciem, aczkolwiek była to zależność nieistotna statystycznie ($p=0,062$) i dopiero połączenie z ekspresją HER3 pozwoliło na stworzenie istotnej statystycznie klasyfikacji ($p=0,001$).

Zgodnie z wiedzą autorki po raz pierwszy wykazaliśmy, że wykryta niedomykalność zastawek podczas lub po terapii trastuzumabem jest związana z gorszym przeżyciem.

4.C.4.5. Porównanie immunofenotypu komórek ogniska pierwotnego nowotworu i synchronicznego przerzutu w węzle chłonnym

Wykazałam, że w ponad 90% przypadków ekspresja ER/PR, HER2, CK5/6 i EGFR utrzymywała się na takim samym poziomie w komórkach raka w ognisku pierwotnym i synchronicznym przerzucie do węzła chłonnego. W przypadku ekspresji CD44, CD24, ALDH, Ep-CAM, Ki-67 i P kadheryny wykazałam znacznie większe różnice w poziomie ekspresji pomiędzy tymi dwoma lokalizacjami (artykuł nr 3, Tabela 1).

Analiza z podziałem na podtypy molekularne: luminalny A i B, z nadekspresją HER2 oraz potrójnie ujemny ujawniła, że zmiany poziomu ekspresji HER2 miały miejsce głównie w rakach z ekspresją receptora HER2 (podtypy z nadekspresją HER2 i luminalny B) (artykuł nr 3, Tabela 1). Zmiana w ekspresji pozostałych markerów, z wyjątkiem CD24, nie była istotnie statystycznie związana z podtypem raka piersi.

4.C.4.6. Czynniki ryzyka rozwoju powikłań kardiologicznych u chorych leczonych z powodu raka piersi z nadekspresją HER2

W analizowanej grupie chorych (artykuł nr 1, Tabela 1) terapię trastuzumabem przerwano u 18,6% pacjentek, u których wystąpiły utrzymujące się powikłania kardiologiczne. Powikłania były częściej obserwowane w grupie starszych chorych ($p=0,051$) oraz pacjentek, które otrzymały wysoką dawkę antracyklin >300 mg/m² w połączeniu z docetakselem ($p=0,005$). Nie zaobserwowano wpływu hormonoterapii, radioterapii, masy ciała (indeks BMI) oraz innych współistniejących chorób na wystąpienie powikłań kardiologicznych.

Dodatkowo oznaczono wczesne i subkliniczne powikłania kardiologiczne w postaci niedomykalności zastawek o dowolnym stopniu nasilenia i zmian wartości LVEF (frakcji wyrzutowej lewej komory). Powikłania te nie wpływają na leczenie chorych, dlatego też, rzadko jest analizowany ich wpływ na przeżycie czy zależności między innymi parametrami biologicznymi i klinicznymi. Wykonana analiza jest wartościowym i rzadkim wkładem w stan wiedzy dotyczący tych subklinicznych powikłań kardiologicznych. W 31,6% przypadków nie stwierdzono rozwoju niedomykalności zastawek przed, w trakcie i po zakończeniu leczenia trastuzumabem. Bezobjawowa niedomykalność zastawki mitralnej i trójdzielnej w stopniu III lub wyższym występowała częściej u starszych chorych ($p=0,070$) oraz pacjentek, które otrzymały >300 mg/m² antracyklin z docetakselem ($p=0,005$). W całej grupie chorych zaobserwowano zmniejszenie LVEF z 68,1% przed leczeniem trastuzumabem do 66,7% po

leczeniu. Obniżenie LVEF było najbardziej wyraźne w podgrupie otrzymującej radioterapię i gdy niedomykalność zastawek stwierdzono podczas i po zakończeniu leczenia trastuzumabem ($p < 0,001$).

4.C.5. WNIOSKI, NOWATORSKI CHARAKTER UZYSKANYCH WYNIKÓW I ICH POTENCJALNE WYKORZYSTANIE

- Przedstawione przeze mnie wyniki wydają się potwierdzać tezę, że **ekspresja receptora HER3 jest najistotniejszym czynnikiem warunkującym oporność na trastuzumab**, co może być związane z faktem, że heterodimer HER2/HER3 jest najsilniejszym aktywatorem kaskad sygnałowych prowadzących do proliferacji. Rolę receptora HER3 i blokady dimeryzacji w leczeniu adjuwantowym potwierdziły wyniki badania APHINITY, w którym połączenie pertuzumabu i trastuzumabu, wiązało się z wyższym prawdopodobieństwem przeżycia wolnego od choroby. Pertuzumab wiąże się z II domeną zewnątrzkomórkowej części receptora HER2 blokując heterodimeryzację HER2 z innymi receptorami rodziny HER, w tym EGFR, HER3 i HER4. Ponieważ dotychczasowe badania nad wpływem ekspresji HER3 na przeżycie są niejednoznaczne, **przedstawione w cyklu wyniki włączają się w nurt aktualnych zagadnień i zwiększają wiedzę na temat roli HER3**. Potwierdzenie wpływu ekspresji receptora HER3 na oporność na trastuzumab i na przeżycie mogłoby sugerować celowość włączenia oznaczania ekspresji tego białka do rutynowej diagnostyki.
- Obecność dodatkowych czynników (brak ekspresji PTEN, wysoki stosunek sygnałów sond *HER2/CEP17*), które jednocześnie z ekspresją HER3 wpływają na przeżycie chorych na raka piersi sugeruje, że **oporność na trastuzumab wydaje się być zależna od szeregu czynników i końcowy obraz jest wypadkową wielu zmian zachodzących w komórce nowotworowej**. Szczególnie istotne jest podjęte przeze mnie badanie dotyczące **wpływu poziomu amplifikacji HER2 na przeżycie w chorych leczonych uzupełniająco chemicznie i trastuzumabem**. Z powodu bardzo małej liczby prac związanych z tym tematem, każde doniesienie zwiększa wiedzę na ten temat. Dodatkowo zgodnie z wiedzą autorki jest to pierwsze badanie, które oprócz wpływu na przeżycie analizuje też zależności pomiędzy statusem *HER2* i wieloma

potencjalnymi czynnikami oporności na trastuzumab (ekspresja PTEN, IGF-1R, MUC4, EGFR, HER3, HER4, mutacje w genie *PIK3CA*).

- Ekspresja podoplaniny w fibroblastach zrębu nowotworu będąca niekorzystnym czynnikiem rokowniczym potwierdza hipotezę, że **na przeżycie mogą mieć wpływ nie tylko zmiany w komórkach nowotworowych ale też samo podścielisko nowotworu.**
- Wykazałam **podobny wzór barwienia podoplaniną w fibroblastach związanych z nowotworem w guzie i przerzucie w węzle chłonnym.** Dodatkowo analiza markerów specyficznych dla wchodzących w skład podścieliska węzła komórek dendrytycznych grudek chłonnych i komórek fibroblastycznych siateczki przemawia na korzyść hipotezy sugerującej, że **fibroblasty związane z nowotworem towarzyszą przerzutującym komórkom rakowym w czasie migracji z guza pierwotnego do węzła chłonnego.** Według wiedzy autorki po raz pierwszy podjęto ocenę różnic w występowaniu pCAF pomiędzy guzem pierwotnym a przerzutem do węzła chłonnego oraz próbę odpowiedzi na pytanie czy pCAFs w przerzucie do węzła mogą pochodzić z komórek obecnych w węzle chłonnym.
- Wykazałam, że **zmiany ekspresji HER2** pomiędzy guzem pierwotnym a przerzutem do węzła chłonnego były **zależne od konkretnego podtypu molekularnego raka.** Większość zmian obserwowałam w rakach z ekspresją HER2 (podtypy z nadekspresją HER2 i luminalny B). Dla receptorów ER i PR nie wykazano zależności między odróżnicowaniem w przerzucie do węzła chłonnego a podtypem molekularnym.
- Stwierdzono, że podczas terapii trastuzumabem **wystąpienie niedomykalności zastawek jest zjawiskiem częstym** a istotne **zmniejszenie LVEF** było obserwowane tylko u kobiet **leczonych napromienianiem, u których jednocześnie wystąpiła niedomykalność zastawek podczas i po zakończeniu leczenia trastuzumabem**
- Związek między przeżyciem wolnym od przerzutów a **rozwojem niedomykalności zastawek** sugeruje, że parametr ten może być **niezwiązanym z nowotworem markerem skuteczności leczenia trastuzumabem.** Zgodnie z wiedzą autorki po raz pierwszy wykazaliśmy, że wykryta niedomykalność zastawek podczas lub po terapii trastuzumabem jest związana z gorszym przeżyciem.

4.C.6. PRZYSZŁE CELE, WYNIKAJĄCE Z DOTYCHCZASOWYCH BADAŃ

1. Potwierdzenie uzyskanych wyników w bardziej licznych grupach chorych.
2. Ocena dalszych potencjalnych parametrów oporności na trastuzumab
3. Porównanie ekspresji ER, PR, HER2 oraz statusu genu *HER2* w tkance guza pierwotnego i synchronicznego przerzutu w węzłach chłonnych u chorych na raka piersi z nadekspresją HER2.

5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

Oprócz 6 prac, które wchodziły w skład cyklu publikacji omówionego powyżej (IF=12,925) jestem autorem/współautorem **27 prac** opublikowanych w krajowych i zagranicznych czasopismach naukowych o łącznym **IF = 44,188**. Dodatkowo jestem autorem/współautorem 4 prac oryginalnych, 4 prac poglądowych i 3 popularno-naukowych opublikowanych w krajowych i zagranicznych czasopismach naukowych nie posiadających IF.

Mój sumaryczny IF wynosi 56,824 (57,113 z pracą w suplemencie czasopisma)

Punktacja KBN/MNiSW = 675.

Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science (WOS) to 192

Indeks Hirscha według bazy Web of Science (WOS) wynosi 9.

Jestem autorem/współautorem **68 doniesień konferencyjnych** w tym 27 międzynarodowych i 41 krajowych (streszczenia dostępne odpowiednio dla 24 i 38 konferencji). Spośród wymienionych wyżej doniesień, 21 streszczeń opublikowano w czasopismach naukowych a 41 streszczenia w materiałach zjazdowych.

5.1. GRANTY I PROJEKTY BADAWCZE

Brałam udział jako wykonawca w trzech grantach badawczych (w tym grant promotorski) oraz byłam kierownikiem jednego grantu badawczego (dokładne dane wykaz dorobku punkt III).

1. Grant badawczy Nr PBZ-KBN-091/P05/50 pt.: „Ocena wpływu wybranych czynników biologicznych raka odbytnicy na skojarzone leczenie chirurgiczne i napromieniowaniem.” Charakter udziału: wykonawca.
2. Grant promotorski – projekt badawczy nr: 2 P05A 014 29 pt. „Ocena predykcyjnego znaczenia promieniowrażliwości limfocytów u chorych na raka szyki macicy leczonych napromienianiem lub napromienianiem i chemioterapią”, charakter udziału: wykonawca
3. Grant badawczy Nr NN 401 096 137, pt.: „Porównanie immunofenotypu komórek guza pierwotnego z immunofenotypem komórek przerzutów w węzłach chłonnych oraz próba wyróżnienia komórek macierzystych i ocena ich biologicznego znaczenia w podtypach raka piersi różniących się immunofenotypowo”, **charakter udziału: KIEROWNIK**
4. Aktywny udział w przygotowaniu wniosku do Funduszu Nauki i Technologii Polskiej pt.: „Wyposażenie Pracowni Biologii Molekularnej w Zakładzie Radiobiologii Klinicznej w zestawy do analizy materiału biologicznego od chorych na nowotwory złośliwe metodami: PCR z detekcją w czasie rzeczywistym, PCR z odwrotną transkrypcją, PCR in situ”, realizowanego w latach 2010 do 2011 (umowa nr. 564/FniTP/674/2010).
5. Grant badawczy Nr 2013/09/B/NZ5/00764 pt.: „Próba wyróżnienia biologicznych czynników determinujących obniżoną wrażliwość na trastuzumab u chorych na raka piersi z nadekspresją białka HER2”, charakter udziału: wykonawca.

5.2. NAGRODY ZA DZIAŁALNOŚĆ NAUKOWĄ

Byłam autorem/współautorem 10 z cyklu 12 prac, który został wyróżniony Nagrodą im. Hilarego Koprowskiego przyznaną przez Polskie Towarzystwo Onkologiczne za najlepszą polską pracę naukową w dziedzinie onkologii za rok 2016 dla zespołu (2 prace wchodzi w skład cyklu 6 prac stanowiących osiągnięcie).

Byłam współautorem pracy, której przyznano Nagrodę Dyrektora Centrum Onkologii-Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie za rok 2013 za najlepsze prace oryginalne i przeglądowe opublikowane przez pracowników CO-I w piśmie *Nowotwory Journal of Oncology* - Gasińska A., Janecka A., Adamczyk A., Słonina D. Jak oddychają komórki nowotworowe? *Nowotwory*; 2013, 63, 2:124-13

Byłam autorem/współautorem 4 wyróżnionych plakatów. Plakaty, wyróżnione podczas konferencji CoBRA w Melbourne oraz na XVII Zjeździe Polskiego Towarzystwa Badań Radiacyjnych, prezentowały wyniki badań przedstawionych w cyklu publikacji stanowiących osiągnięcie.

1. A. Adamczyk, M. Klimek. Ocena promieniowrażliwości limfocytów na podstawie testu kometowego i ilości aberracji chromosomowych u chorych na raka szyjki macicy" wyróżnienie na XIV Zjeździe Polskiego Towarzystwa Badań Radiacyjnych. Kielce, Polska. 24-26.09.2007
2. Niemiec J, Adamczyk A, Majchrzyk M, Małecki K, Ryś J. Prognostic significance of proliferation index (MIB-1 LI) and other biological parameters in subtypes of invasive ductal breast cancer. (Prognostyczne znaczenie potencjału proliferacyjnego (IW MIB-1) oraz innych parametrów biologicznych w podtypach przewodowego naciekającego raka piersi), nagroda przyznana podczas IV Kongresu Współczesnej Onkologii Poznań, 8-9 marca 2012
3. (Best Poster Award) Ambicka A, Adamczyk A, Niemiec JA, Janecka A, Harazin-Lechowska A, Grela-Wojewoda A, Domagała-Haduch M, Cedrach I, Cichocka A, Kruczak A, Rys J, Jakubowicz J. Potential biological markers of trastuzumab resistance in HER2-overexpressing breast cancer patients, przyznana podczas World Congress on Controversies in Breast Cancer (CoBRA). Melbourne, Australia, 22-24.10. 2015
4. A. Grela-Wojewoda, B. Sas-Korczyńska, A. Adamczyk, J. Niemiec, I. Cedrych, M. Domagała-Haduch, A. Ambicka, Z. Stasik, J. Kołacz. „Radioterapia jako jeden z czynników ryzyka rozwoju powikłań kardiologicznych u chorych leczonych z powodu raka piersi z nadekspresją HER2” na XVII Zjeździe Polskiego Towarzystwa Badań Radiacyjnych. Siedlce, Polska. 27-30.09.2016

5.3. DZIAŁALNOŚĆ BADAWCZA

Moje zainteresowania badawcze skupiają się głównie na poszukiwaniu biologicznych markerów o znaczeniu prognostycznym (wskazujących na wynik leczenia) i predykcyjnym (pozwalających na wybór optymalnego leczenia) dla terapii stosowanych we współczesnej onkologii.

Przed uzyskaniem stopnia doktora nauk medycznych zajmowałam się badaniami nad nowotworami mózgowia, raka odbytu, raka szyjki macicy oraz wpływem napromieniania na cykl komórkowy, proliferację i apoptozę fibroblastów.

Celem pracy doktorskiej była ocena promieniowrażliwości fibroblastów zrębu nowotworu i limfocytów u chorych na raka szyjki macicy oraz zbadanie korelacji pomiędzy ocenioną *in vitro* promieniowrażliwością komórek a odczynami popromiennymi u chorych leczonych napromienianiem lub napromienianiem i chemicznie.

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych, byłam zaangażowana w badania dotyczące głównie raka piersi i jasnokomórkowego raka nerki.

Poniżej zostały przedstawione główne nurty badań naukowych, w które byłam lub nadal jestem zaangażowana.

5.3.1. Prognostyczne znaczenie tempa proliferacji komórek w nowotworach mózgowia

Przed stopnia doktora nauk medycznych, uczestniczyłam w badaniach dotyczących prognostycznego znaczenia tempa proliferacji komórek w nowotworach mózgowia (glejakach), oznaczanego na podstawie IW Ki-67, IW BrdUrd i liczby AgNOR/jądro komórkowe.

Badania te zostały opublikowane w 3 artykułach (wykaz dorobku habilitacyjnego, tabela 2, pozycje 1, 5; tabela 3, pozycja 1) oraz zaprezentowane na 4 konferencjach (wykaz dorobku habilitacyjnego, tabela 7, pozycje 2, 3, 9, 10).

5.3.2. Prognostyczne markery biologiczne w raku odbytnicy leczonych chirurgicznie i napromienianiem

W latach 2003-2006 byłam zaangażowana (jako wykonawca) w realizację grantu badawczego zamawianego przez Ministerstwo Nauki i Informatyzacji, Nr PBZ-KBN-091/P05/50 pt.: „Ocena wpływu wybranych czynników biologicznych raka odbytnicy na skojarzone leczenie chirurgiczne i napromienianiem”, którego kierownikiem była prof. dr hab. Anna Gasińska.

Celem była ocena znaczenia markerów biologicznych dla wczesnej reakcji raka na przedoperacyjne napromienianie u chorych na niezaawansowanego raka odbytnicy, leczonych dwoma schematami różniącymi się przerwą pomiędzy radioterapią (RT) a operacją: (i) krótkie napromienianie (RT, 5Gy/frakcję/5 dni), przeprowadzone ok. 1

tygodnia przed zabiegiem chirurgicznym oraz (ii) schemat, gdzie przerwa pomiędzy napromienianiem a leczeniem chirurgicznym wynosiła 4-5 tygodni. Oceniano tempo proliferacji (indeks wiązania bromodeoksyurydyny (IW BrdUrd), odsetek komórek w fazie S cyklu komórkowego oraz indeks wiązania MIB-1) oraz ekspresję szeregu białek: CD34, GLUT-1, Ku70, BCL-2, P53.

Wyniki uzyskane w badaniu dają wgląd w biologię popromiennej reakcji raka odbytu, która jest istotnym czynnikiem warunkującym powodzenie przedoperacyjnej radioterapii nowotworów tej lokalizacji i zostały przedstawione w 4 publikacjach (wykaz dorobku habilitacyjnego, tabela 2, pozycja 6, 13; tabela 3, pozycja 2, 3) oraz w 8 doniesieniach konferencyjnych (wykaz dorobku habilitacyjnego, tabela 6, pozycja 3-5, ; tabela 7, pozycja 6, 8, 11, 21, 23).

5.3.3. Czynniki prognostyczne oraz promieniowrażliwość fibroblastów zrębu nowotworu i limfocytów u chorych na raka szyjki macicy

Przed rozpoczęciem badań związanych z doktoratem zajmowałam się wpływem unaczynienia na przeżycie chorych raka na szyjki macicy oraz znaczeniem fibroblastów izolowanych ze zrębu nowotworu a w szczególności możliwością wykorzystania ocenianej *in vitro* promieniowrażliwości do przewidzenia wystąpienia odczynów popromiennych u chorych na raka szyjki macicy. Rozwinięciem tego tematu były badania przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej. W latach 2005-2008 byłam wykonawcą grantu promotorskiego pt. „Ocena predykcyjnego znaczenia promieniowrażliwości limfocytów u chorych na raka szyjki macicy leczonych napromienianiem lub napromienianiem i chemioterapią”, którego kierownikiem była prof. dr hab. Anna Gasińska. Celem pracy doktorskiej była ocena promieniowrażliwości fibroblastów zrębu nowotworu i limfocytów u chorych na raka szyjki macicy oraz zbadanie korelacji pomiędzy ocenioną *in vitro* promieniowrażliwością komórek a odczynami popromiennymi u chorych leczonych napromienianiem lub napromienianiem i chemicznie. W celu oceny promieniowrażliwości fibroblastów zrębu nowotworu, oznaczano za pomocą cytometru przepływowego indeks wiązania bromodeoksyurydyny, zmiany w rozmieszczeniu komórek w cyklu komórkowym oraz poziom apoptozy po wcześniejszym napromienianiu. Promieniowrażliwość limfocytów była oceniana trzema testami: testem kometowym (oceniający poziom uszkodzeń DNA), testem G0 (oceniający poziom aberracji chromosomowych) i G2 (oceniający poziom uszkodzeń chromatydowych). Dodatkowo cytofluorymetrycznie oznaczono subpopulacje limfocytów T (CD4+, CD8+ i CD4+/CD8+).

Wyniki wyżej wymienionych badań wskazujące między innymi na niekorzystny wpływ małej liczby naczyń krwionośnych na przeżycie oraz brak użyteczności ocenianej *in vitro* promieniowrażliwości fibroblastów i limfocytów zostały przedstawione w 3 publikacjach (wykaz dorobku habilitacyjnego, tabela 2, pozycja 2, 3, 27) oraz w 12 doniesieniach konferencyjnych (wykaz dorobku habilitacyjnego, tabela 4, pozycja 1; tabela 6, pozycja 1, 2, 6; tabela 7, pozycja 4, 5, 12(plakat wyróżniony)-15, 27, 43).

5.3.4. Prognostyczne znaczenie markerów komórek nowotworowych i komórek podścieliska u chorych na przewodowego naciekającego raka piersi nieleczonych chemicznie lub leczonych antracyklinami lub/i taksanami

W trakcie badań będących tematem pracy doktorskiej a także po uzyskaniu stopnia doktora nauk medycznych zaangażowałam się w badania dotyczące charakterystyki immunofenotypu komórek nowotworowych oraz komórek podścieliska nowotworu w raku piersi oraz wpływu tych cech na przeżycie u chorych nieleczonych chemicznie lub leczonych antracyklinami lub/i taksanami. Część tych zagadnień była realizowana w ramach grantu pt.: „Porównanie immunofenotypu komórek guza pierwotnego z immunofenotypem komórek przerzutów w węzłach chłonnych oraz próba wyróżnienia komórek macierzystych i ocena ich biologicznego znaczenia w podtypach raka piersi różniących się immunofenotypowo”, realizowanym w latach 2009-2012, którego byłam kierownikiem. Dodatkowo zajęto się problemem występowania błonowego barwienia przy zastosowaniu przeciwciała MIB-1 w ocenie ekspresji białka Ki-67. Problem ten jest bardzo istotny, ponieważ błonowy wzór barwienia może wpływać na wynik oznaczenia tempa proliferacji w raku piersi.

Wyniki tych badań zostały opublikowane w 9 artykułach (wykaz dorobku habilitacyjnego, tabela 2, pozycja 7-12, 14, 16, 24) a także zostały zaprezentowane w 16 doniesieniach konferencyjnych (wykaz dorobku habilitacyjnego, tabela 4, pozycja 2; tabela 6, pozycja 7-10; tabela 7, pozycja 16(plakat nagrodzony)-20, 22, 24, 25, 28, 39, 40).

5.3.5. Rak piersi u mężczyzn

Badania nad biologią raka piersi u kobiet pozwoliło mi też włączyć się do badań nad rakiem piersi występującym u mężczyzn. Jest to rzadka odmiana tego raka, która stanowi 0,5 – 1% wszystkich diagnozowanych raków piersi. Badaniem objęto mężczyzn chorych na raka piersi, leczonych w latach 1976-2010 w Krakowskim Oddziale Centrum Onkologii. Oceniano w komórkach nowotworowych ekspresję receptorów steroidowych (ER, PR, AR) a także

HER2, EGFR, Ki-67, cytokeratyn 5/6, wimentyny, P-kadheryny i SMA a w podścielisku guza gęstość unaczynienia krwionośnego i limfatycznego.

Analiza tego rzadkiego nowotworu doprowadziła do powstania 3 publikacji (wykaz dorobku habilitacyjnego, tabela 2, pozycja 15, 18, 20) i 1 doniesienia konferencyjnego (wykaz dorobku habilitacyjnego, tabela 6, pozycja 17).

5.3.6. Parametry mammografii spektralnej i ich związek z cechami klinicznymi i biologicznymi

Mammografia spektralna jest połączeniem badania rentgenowskiego piersi, jakim jest mammografia, z dożylnym podaniem środka kontrastowego. W badaniach zapoczątkowanych i prowadzonych we współpracy z dr hab. med. Elżbietą Łuczyńską kierownikiem Zakładu Radiologii i Diagnostyki Obrazowej, analizowano między innymi związek pomiędzy parametrami mammografii spektralnej a ocenianą na podstawie barwień immunohistochemicznych gęstością unaczynienia krwionośnego i limfatycznego, obecnością fibroblastów z ekspresją podoplaniny w podścielisku guza czy charakterystyką histologiczną nowotworu.

Wyniki zostały opublikowane w 4 artykułach (wykaz dorobku habilitacyjnego, tabela 2, pozycja 19, 21, 23, 25) i w 3 doniesieniach konferencyjnych (wykaz dorobku habilitacyjnego, tabela 7, pozycja 33, 37, 42).

5.3.7. Markery przejścia epitelialno-mezenchymalnego w jasnokomórkowym raku nerki

Ostatnim tematem, w który jestem zaangażowana są badania nad oceną markerów przejścia epitelialno-mezenchymalnego w raku jaskokomórkowym nerki. Celem badań była ocena zależności między tymi markerami a cechami klinicznymi oraz ich wpływem na potencjał do przerzutowania. W ramach projektu oceniano immunohistochemicznie ekspresję ZEB2, wimentyny, N- i E- kadheryny, PTEN, GLUT-1 surwiwiny i Ki-65 oraz za pomocą qPCR status mutacji w genach *KRAS* i *PIK3CA*.

Dotychczasowe wyniki zostały zaprezentowane w 1 publikacji (wykaz dorobku habilitacyjnego, tabela 2, pozycja 26) i w 1 doniesieniu konferencyjnym (wykaz dorobku habilitacyjnego, tabela 6, pozycja 11).

5.4. DZIAŁANOŚĆ DYDAKTYCZNA

- Byłam promotorem pomocniczym w jednym przewodzie doktorskim (Centrum Onkologii - Instytutu im. Marii Skłodowskiej-Curie)
- Byłam promotorem 6 prac magisterskich (2017 – 2018, Górnośląska Wyższa Szkoła Handlowa im. Wojciecha Korfatego w Katowicach, Wydział Turystyki i Promocji Zdrowia, Kierunek Kosmetologia)
- Prowadzenie zajęć dydaktycznych:
 - a) Kosmetologia, Wydział Turystyki i Promocji Zdrowia, Górnośląska Wyższa Szkoła Handlowa im. Wojciecha Korfatego w Katowicach:
 - o od 2018 roku, przedmiot „Biologia z genetyką” dla studentów I roku;
 - o od 2017 do chwili obecnej prowadzenie seminariów magisterskich
 - o od 2016– przedmiot „Immunologia” dla studentów III roku
 - b) wykłady podczas kursów CMKP dla lekarzy specjalizujących się w radioterapii onkologicznej „Radiobiologia doświadczalna i kliniczna, sposoby frakcjonowania dawki promieniowania” w latach: 2011-2015,
 - c) wykłady podczas kursów dla fizyków medycznych w latach: 2011, 2014, 2015

5.5. INNE

Jestem członkiem następujących towarzystw:

- Polskie Towarzystwo Badań Radiacyjnych (od 1999)
 - o Członek komisji Rewizyjnej Oddziału Krakowskiego PTBR (2011-2013)
 - o Sekretarz Oddziału Krakowskiego PTBR (od 2013-)
 - o Członek Zarządu Głównego PTBR (od 2016-)
- Polskie Towarzystwo Onkologiczne (od 2013-)
- Polskie Towarzystwo Cytochemików i Histochemików (od 2012-)

W latach 2013-2017 recenzowałam 9 prac w czasopismach międzynarodowych

Brałam aktywny udział (sekretarz Komitetu Naukowego) w organizacji czterech edycji Konkursu Prezentacji Naukowych, skierowanego do młodych naukowców bez stopnia doktora, organizowanego w głównej mierze przez Krakowskie Oddziały Polskiego

Towarzystwa Badań Radiacyjnych i Polskiego Towarzystwa Onkologicznego w latach 2014, 2015, 2017 i 2018.

PODSUMOWANIE DOROBKU NAUKOWEGO

Liczba oryginalnych publikacji w czasopismach posiadających Impact Factor: 32

Liczba oryginalnych publikacji w czasopismach bez Impact Factor: 4

Łączna punktacja IF= 56,824 (57,113 z pracą w suplemencie)
KBN/MNiSW = 675

Prace poglądowe w czasopismach bez Impact Factor : 4

Prace popularnonaukowe - 3

Opublikowane streszczenia ze zjazdów międzynarodowych: 24

Opublikowane streszczenia ze zjazdów krajowych: 38

Liczba oryginalnych publikacji w suplementach czasopism posiadających Impact Factor : 1

Liczba cytowań na dzień 18.02.2019:

Web of Science: **192**

Scopus: **219**

Indeks Hirscha na dzień 18.02.2019:

Web of Science: **9**

Scopus: **10**

