



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ, ΤΟΜΕΑΣ ΠΑΘΟΛΟΓΙΑΣ
Διευθυντής: Καθηγητής Βασίλης Γεωργούλιας

Διδακτορική Διατριβή

**«Φαρμακογενωμική στα αδενοκαρκινώματα πνεύμονα:
Μελέτη των RRM1,RRM2,BRCA1 σαν προβλεπτικοί παράγοντες
απάντησης στη θεραπεία πρώτης γραμμής με
docetaxel/gemcitabine. Κλινική αξιολόγηση της
αποτελεσματικότητας της ανωτέρω θεραπείας στους
ηλικιωμένους.»**

Ιωάννης Μπουκοβίνας
Παθολόγος-Ογκολόγος

Δεκέμβριος 2010

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Με το πέρας της διδακτορικής διατριβής, θα επιθυμούσα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες προς τον καθηγητή Β. Γεωργούλια και τον λέκτορα Γ.Σουγκλάκο. Η αφοσίωση τους στην επιστημονική μεθοδικότητα, ο αφουγκρασμός του νέου κόσμου που έρχεται, και η παραχώρηση αρμοδιοτήτων με οδήγησε όλα αυτά τα χρόνια. Ελπίζω να έχω την χαρά να συνεργαζόμαστε εσσεί.

Οι ευχαριστίες μου δεν θα μπορούσαν να μην συμπεριλάβουν από το εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης ,την Χαρά Παπαδάκη για την εργαστηριακή της συνδρομή και την ανιδιοτελή της υποστήριξη ,την Μαρία Τρυπάκη που έκανε τα microdissection καθώς και τον παθολογοανατόμο Τάσο Κουτσόπουλο που επέβλεψε την επάρκεια του παθολογοανατομικού υλικού.Βέβαια, το πρώτο φίλτρο για το υλικό από τη Θεσσαλονίκη, έγινε στο Θεαγένειο από την παθολογοανατόμο κ.Αναστασία Κιζιρίδου την οποία ευχαριστώ ιδιαίτερως, όπως και την παθολογοανατόμο Φρίντα Πατακιούτα για τη συναίνεση της για τη λήψη του υλικού.

Ευχαριστώ επίσης τον Rafael Rosell και τον Pedro Mendez για την προθυμία τους να διεξαχθεί ένα μέρος του ερευνητικού προγράμματος στο εργαστήριο τους στη Βαρκελώνη καθώς και για την αγάπη και προσήνεια που μας υποδέχθησαν.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τους συναδέλφους μου παθολόγους – ογκολόγους που μοιράστηκαν μαζί μου τη χαρά της ερευνητικής προσπάθειας με τη συμμετοχή τους στο κλινικό μέρος της μελέτης, είθε να τους το ανταποδώσω.

Αν μπόρεσε να φθάσει στο τέλος της αυτή η ερευνητική περιπέτεια ήταν γιατί είχα την τύχη να περιβάλλομαι στην κλινική μου από ξεχωριστούς ανθρώπους που με εμπιστεύτηκαν, με στήριξαν, μου

έδωσαν χώρο να δημιουργήσω, πολλές φορές με τίμημα την δική τους ανεξαρτησία. Πριν ακόμα γίνει περικοπή και στα συναισθήματα, να εκφράσω την αγάπη μου και ευχαριστίες στους Κωνσταντίνο Δημητριάδη, Γιάννη Στεργίου, Παύλο Παπακοτούλα. Διατηρώ έως σήμερα αμείωτη την έκπληκτη αμηχανία μου, και για το πιο μικρό ακόμα φυλλαράκι συμπάθειας που μου προσφέρεται, επειδή συνεχώς με επιτηρεί η συνετή επίγνωση ότι δεν έκανα τίποτε άλλο, παρά να βιδώσω σφιχτά την αφοσίωση μου επάνω σε αυτό το ελάχιστο που από τη φύση μου προσφέρθηκε.

Και για τους νέους γιατρούς που με βοήθησαν με τον τρόπο τους, και τους ευχαριστώ θερμά, ελπίζω να μπόρεσα να τους μεταδώσω κάτι από τη μαγεία της επιστήμης. Να διέχουσα στη φρέσκια απορροφητική τους άγνοια, την πληροφορία ότι υπάρχει επιστημονική έρευνα και στην Ελλάδα και έτσι σιγα σιγά να ασκηθεί ακόμα ο άπειρος αποπροσανατόλιστος ακόμα νους τους, στο να αναγνωρίζει από μακριά τον ήχο και να προσδοκά το πλησίασμα της.

Αν προέκυψε-η προκύψει στο μέλλον- τελικά κάποιο σημαντικό συμπέρασμα από την εργασία αυτή, θα είναι το αντίδωρο στη δωρεά σώματος και ψυχής που μου εμπιστεύθηκαν οι ασθενείς μου. Όπου η καταπιεσμένη και βομβαρδισμένη μοναξιά του καθενός σηκωνόταν αίφνης, και πήγαινε να καθίσει παράμερα, νοσταλγώντας τον εαυτό της και ζητώντας το όνειρο.

Για τους αγαπημένους μου ανθρώπους να ζητήσω συγχώρεση για όσα τους στέρησα. Η επιείκεια και η υπομονή που έδειξαν, οι σιωπές τους που στεφάνωσαν μια δεκαετία ολόκληρη, ο ενθουσιασμός και η εμπάθυνση τους, το απλόχερο μοίρασμα ας κρατήσουν για πάντα, ακόμα και όταν είναι δυσδιάκριτα σε ένα αχνά εκλεπτυσμένα φωτισμένο μισοσκόταδο.

Στη πατέρα μου Πέτρο που ανεπαίσθητα μου πέρασε την αγάπη για την Ιατρική και τους ανήμπορους, στη μητέρα μου Αικατερίνη που ήταν ο βράχος μου όταν πνιγόμουν!

Περιεχόμενα:

| | |
|---|--------|
| I. ΠΕΡΙΛΗΨΗ | 6-17 |
| II. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ | 18-79 |
| α. ΓΕΝΙΚΑ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΓΙΑ ΤΟ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ (ΚΠ) | 18-22 |
| β. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΓΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΠ | 21-23 |
| γ. ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΚΑΙ ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ ΣΤΟΝ ΚΠ | 24-29 |
| δ. ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥ ΜΗ-ΜΙΚΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΠ (ΜΜΚΠ) | 29-39 |
| ε. ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟΙ ΥΠΟΤΥΠΟΙ ΤΟΥ ΚΠ - ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ | 40-63 |
| στ. ΦΑΡΜΑΚΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΚΑΙ ΚΠ | 64-78 |
| III. ΣΚΟΠΟΙ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ | 79-81 |
| Α. ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ: Στόχος 1 | |
| Β. ΦΑΡΜΑΚΟΓΕΝΩΜΙΚΗ-ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ: | |
| Στόχος 2: | |
| • Στόχος 2α | |
| • Στόχος 2β | |
| IV. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ | 82-158 |
| Α. ΚΛΙΝΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ (ΣΤΟΧΟΣ 1) | |
| 1. ΑΣΘΕΝΕΙΣ-ΜΕΘΟΔΟΙ | 82-88 |
| 2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | 89-95 |
| Β. ΦΑΡΜΑΚΟΓΕΝΩΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ (ΣΤΟΧΟΣ 2) | |

| | |
|---|---------|
| • Στόχος 2α | 96-102 |
| • Στόχος 2β | 103-116 |
| • ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ -ΤΕΧΝΙΚΕΣ | 117-144 |
| 1. ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΣΘΕΝΩΝ | |
| 2. ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΧΡΩΣΗ ΑΙΜΑΤΟΞΥΛΙΝΗΣ- ΗΩΣΙΝΗΣ | |
| 3. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ | |
| 4. ΑΠΟΠΑΡΑΦΙΝΟΠΟΙΗΣΗ | |
| 5. ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΥΣΗ-ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΠΕΨΗ | |
| 6. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ RNA | |
| 7. ΦΩΤΟΜΕΤΡΗΣΗ | |
| 8. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)- ΠΟΣΟΤΙΚΗ RT-PCR | |
| 9. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ | |
| Γ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ | 145-158 |
| V. ΕΠΙΛΟΓΟΣ | 159-163 |
| VI. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ: | 164-167 |
| ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΤΟΥ ΥΠΟΨΗΦΙΟΥ ΔΙΔΑΚΤΟΡΑ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ ΚΑΙ ΣΥΝΑΦΩΝ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΩΝ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΩΝ | |
| VII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ | 168-191 |

I. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η χημειοθεραπεία βασισμένη στη πλατίνα αποτελεί τη βασική θεραπευτική επιλογή μεταξύ των ασθενών με μεταστατικό ή τοπικά εκτεταμένο μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (ΜΜΚΠ). Ωστόσο και μη-πλατινούχοι συνδυασμοί με gemcitabine και docetaxel ή paclitaxel έχει βρεθεί ότι έχουν παρόμοια αποτελεσματικότητα αναφορικά με την επιβίωση, συγκρινόμενοι με διάφορους συνδυασμούς πλατίνας ενώ παράλληλα συνδυάζονται με καλύτερο προφίλ τοξικότητας. Έτσι, οι διάφορες κατευθυντήριες οδηγίες δεν συστήνουν ένα συγκεκριμένο συνδυασμό σε αυτό το στάδιο της νόσου. Εν τούτοις, εάν υπήρχε μία εξατομικευμένη θεραπεία βασισμένη σε στοιχεία του όγκου (και ενδεχόμενα του ασθενούς) θα μπορούσε να αναμένει κανείς τη βελτίωση της παρεχόμενης θεραπείας πολύ περισσότερο από το να εφαρμόζεται η ίδια κλασσική γενικευμένη προσέγγιση για όλους τους ασθενείς με ΜΜΚΠ.

Με δεδομένα τα κενά έρευνας στο χώρο της φαρμακογενωμικής στα μη-μικροκυτταρικά καρκινώματα του πνεύμονα και την ανάγκη στοχοποίησης νέων δεικτών για τη κλινική πρόβλεψη της απάντησης στη χημειοθεραπεία (Χ/Θ) πρώτης γραμμής με μη-πλατινούχους συνδυασμούς, όπως ο συνδυασμός docetaxel και gemcitabine, καθώς επίσης και για τη κλινική αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της ανωτέρω θεραπείας στους ηλικιωμένους, η παρούσα διατριβή αποτέλεσε

μια σφαιρική κλινικο-εργαστηριακή ερευνητική προσπάθεια διεκπεραίωσης των παρακάτω τριών ειδικών στόχων:

Στόχος 1 (Κλινική προσέγγιση): Να διεξαχθεί μια πολυκεντρική μελέτη φάσης II και να η αξιολογηθεί κλινικά η αποτελεσματικότητα του χημειοθεραπευτικού συνδυασμού docetaxel και gemcitabine ως πρώτης γραμμής Χ/Θ σε ηλικιωμένους ασθενείς με αδenoκαρκίνωμα πνεύμονα.

Συγκεκριμένα, προκειμένου να διερευνηθεί η κλινική αποτελεσματικότητα του χημειοθεραπευτικού συνδυασμού docetaxel/gemcitabine, σχεδιάστηκε μία πολυκεντρική μελέτη φάσης II ηλικιωμένων ασθενών με αδenoκαρκίνωμα πνεύμονα. Σύμφωνα με το σχεδιασμό της μελέτης, οι ασθενείς θα πρέπει να λάβουν σαν 1^{ης} γραμμής χημειοθεραπεία τον συνδυασμό docetaxel/gemcitabine. Το πρωταρχικό κλινικό ερώτημα που τέθηκε στα πλαίσια αυτής της διατριβής ήταν αν και κατά πόσο οι ηλικιωμένοι ασθενείς με αδenoκαρκίνωμα πνεύμονα ανταποκρίνονται στο συνδυασμό docetaxel/gemcitabine όταν αυτός χορηγείται σαν χημειοθεραπεία 1^{ης} γραμμής. Τα προηγούμενα κλινικά δεδομένα ήταν πολύ λίγα καθώς η ομάδα αυτή δεν εκπροσωπούσαν επαρκώς στις διάφορες κλινικές μελέτες, καθώς λιγότερο από το 25% των ασθενών ήταν >65 ετών και μόνο 8-13% >70 ετών. Έτσι, τα αποτελέσματα των μελετών σε νεότερους ασθενείς μπορεί να μην είναι πλήρως εφαρμόσιμα στην αντιμετώπιση των ηλικιωμένων ασθενών λόγω γήρανσης των λειτουργιών, συνυπαρχουσών παθήσεων,

φαρμακοκινητικών διαταραχών, αλληλεπιδράσεων φαρμάκων, νεφρικής και ηπατικής δυσλειτουργίας, ελαττωμένης θρέψης και αντίληψης και τέλος ελαττωμένης υποστήριξης από το περιβάλλον.

Για τον σκοπό αυτό, 77 ασθενείς >70 ετών εντάχθηκαν στη μελέτη. Μόνο ένας ασθενής εμφάνισε πλήρη ανταπόκριση (1.3%) και 23 ασθενείς (29.9%) εμφάνισαν μερική ανταπόκριση [OR: 0.31 (95%CI: 0.21-0.42)], ενώ έλεγχος της νόσου (DCR) επιτεύχθηκε στο 53.3% των ασθενών. Το διάμεσο διάστημα ελεύθερο προόδου νόσου (Time to progression-TTP) ήταν 4.1 μήνες, η διάμεση επιβίωση 9.4 μήνες και η μονοετής και διετής επιβίωση 37.9% και 10.7%, αντίστοιχα. Διαπιστώθηκε βαθμού 3-4 ουδετεροπενία στο 18.2% των ασθενών και εμπύρετος ουδετεροπενία στο 3.9%. Η μη-αιματολογική τοξικότητα ήταν ήπια με grade 2-3 κόπωση στο 22.1% των ασθενών. Η προοπτική αυτή μελέτη έδειξε ότι η χημειοθεραπεία 1^{ης} γραμμής με docetaxel/gemcitabine είναι αποτελεσματική στους ηλικιωμένους ασθενείς με μεταστατικό ή τοπικά προχωρημένο αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα.

Στόχος 2α: Να αξιολογηθούν τα επίπεδα έκφρασης mRNA των υποομάδων RRM1 και RRM2 της ριβονουκλεοτιδικής ρεντουκτάσης από τα κακοήθη κύτταρα και να συσχετιστούν τα επίπεδα αυτών με τα κλινικά αποτελέσματα σε ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα που θεραπεύονται με το συνδυασμό docetaxel και gemcitabine ως X/Θ 1^{ης} γραμμής.

Από βιοψίες ασθενών με αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα προσπαθήσαμε να μελετήσουμε διάφορους προγνωστικούς κυτταρικούς παράγοντες-δείκτες που μπορούν να επηρεάζουν τη πρόγνωση μετά από Χ/Θ. Σαν τέτοιους επιλέξαμε τις υπομονάδες της ριβονουκλεϊκής ρεδουκτάσης, RRM1 και RRM2. Η gemcitabine είναι ένα ανάλογο της deoxycytidine η οποία ενσωματώνεται στο DNA και αναστέλλει τη σύνθεση του. Η ριβονουκλεϊκή ρεδουκτάση (Ribonucleotide Reductase-RR) είναι ένζυμο κεντρικής σημασίας στη σύνθεση του DNA και αποτελείται από δύο υπομονάδες, την M1(RRM1) και την M2(RRM2), η δε ολοενζυματική του δράση καθορίζεται από τα επίπεδα της RRM2. Η έκφραση της RRM1 μετρημένη με ποσοτική RT-PCR σχετίζεται σημαντικά με το TTP και την επιβίωση σε ασθενείς με στάδιο IV MMΚΠ που έλαβαν cisplatin/gemcitabine. Δύο επιπλέον μελέτες επιβεβαίωσαν ότι τα επίπεδα της RRM1 είναι ικανά στο να διακρίνουν τους ασθενείς του σταδίου IV που θα έχουν καλή ή όχι επιβίωση όταν τους χορηγηθεί το σχήμα cisplatin/gemcitabine. Ωστόσο, υπήρχε περιορισμένη γνώση για τη σχέση ενδο-ογκικής έκφρασης RRM2 και της απάντησης στη gemcitabine σε ανθρώπινους όγκους του πνεύμονα.

Για να μελετήσουμε την έκφραση των γονιδίων RRM1 και RRM2 στον περιγραφέντα πληθυσμό ασθενών με αδενοκαρκίνωμα σε σχέση με την απάντηση στον εφαρμοζόμενο χημειοθεραπευτικό συνδυασμό με docetaxel/gemcitabine απομονώθηκε RNA από το υλικό του όγκου μετά από μικροτεμαχισμό με laser. Όλα τα δείγματα εκτιμήθηκαν από

ανεξάρτητο παθολογοανατόμο για να διασφαλισθεί η εγκυρότητα της διάγνωσης καθώς και να καθοριστεί η καλύτερη περιοχή του όγκου για τον μικροτεμαχισμό. Η ποσοτικοποίηση του εξαγόμενου RNA έγινε με RT-PCR, με εκκινητές (primers) και ιχνηλάτες (probes) που σχεδιάστηκαν ειδικά, και για τη σχετική RNA έκφραση εφαρμόστηκε η συγκριτική Ct μέθοδος που χρησιμοποίησε β-actin σαν ενδογενή έλεγχο (housekeeping gene) και εμπορικά kit ελέγχου RNA σαν εξισωτές (calibrators). Τα τελικά αποτελέσματα εκτιμήθηκαν ως εξής: $2^{-(\Delta C_t \text{ δείγματος} - \Delta C_t \text{ εξισωτή})}$, όπου οι ΔC_T τιμές του εξισωτή και του δείγματος ορίζονται με την αφαίρεση της C_T τιμής του γονιδίου στόχου από τη τιμή του housekeeping γονιδίου, β-actin. Όλες οι μετρήσεις επαναλήφθηκαν τρεις φορές και έγιναν αποδεκτές μόνο αν σε όλες υπήρχε μία απόκλιση (Standard Deviation) από την C_T τιμή <0.20 . Ακόμη, επιμολύνσεις από γενωμικό DNA αποκλείστηκαν με non-reverse transcript RNA για κάθε δείγμα που εξετάστηκε.

Ως πρωταρχική έκβαση της μελέτης θεωρήθηκε η συνολική απάντηση στη Χ/Θ. Όλοι οι δείκτες αποτελεσματικότητας και τοξικότητας εκτιμήθηκαν για όλους τους ασθενείς της μελέτης. Οι ποσοτικές αναλύσεις με RT-PCR έδωσαν τιμές που εκφράστηκαν σαν σχέσεις μεταξύ 2 απόλυτων μετρήσεων (gene of interest: internal reference gene). Τα σημεία-κατώφλια υπολογίσθηκαν ανάλογα με τη διάμεση τιμή για την έκφραση του mRNA κάθε γονιδίου. Δείγματα με τιμές mRNA μεγαλύτερες ή ίσες της διάμεσης θεωρούνταν σαν υψηλές εκφράσεις, ενώ εκείνες με μικρότερες της διάμεσης σαν δείγματα με μικρή έκφραση. Επιπρόσθετα,

τα επίπεδα έκφρασης του mRNA κατανεμήθηκαν σε τεταρτημόρια (Q1 [κατώτερα επίπεδα]-Q4 [ανώτερα επίπεδα]). Ασθενείς στα μεσαία τεταρτημόρια θεωρήθηκαν σαν μία ομάδα (Q2+Q3), και οι συγκρίσεις έγιναν ανάμεσα και στις τρεις ομάδες (Q1, Q2+3, Q4).

Στη μελέτη εντάχθηκαν 53 ασθενείς, αλλά μόνο από τους 42 (79%) κατέστη δυνατό να ληφθεί επαρκές RNA και να ενισχυθεί με επιτυχία. Τα υπόλοιπα είτε δεν περιείχαν επαρκή ποσότητα όγκου, είτε το μεγαλύτερο μέρος τους ήταν νεκρωμένο. Τα κλινικά δεδομένα αναλύθηκαν και συσχετίστηκαν με τη mRNA έκφραση των RRM1 και RRM2. Υψηλές τιμές έκφρασης RRM1 mRNA παρατηρήθηκαν σε 25 (59.5%) και χαμηλές σε 17 (40.5%) ασθενείς, ενώ υψηλές τιμές έκφρασης RRM2 mRNA σε 22 (52.4%) και χαμηλές σε 20 (47.6%) ασθενείς. Όταν χωρίστηκαν σε εκείνους με χαμηλές έναντι εκείνων με υψηλές εκφράσεις RRM1 και RRM2 δεν βρέθηκε κάποια συσχέτιση κλινικής έκβασης με την έκφραση RRM1. Όμως, οι 20 ασθενείς με χαμηλή έκφραση RRM2 είχαν στατιστικά σημαντικότερες απαντήσεις από τους 22 ασθενείς με υψηλές εκφράσεις RRM2 (54.5% vs 9%; $p=0.002$). Δεν υπήρχε αξιοσημείωτη σχέση μεταξύ RRM2 έκφρασης και της επιβίωσης και του TTP. Όταν οι ασθενείς χωρίστηκαν σε τεταρτημόρια ανάλογα με την έκφραση των RRM1 και RRM2, οι 11 ασθενείς στο κατώτερο τεταρτημόριο της έκφρασης του RRM1 είχαν μακρύτερο TTP (7.1 vs 1.7 μήνες; $p=0.04$) και ολική επιβίωση (10.6 vs 1.6 μήνες; $p=0.02$) απ' ότι οι 11 ασθενείς του ανώτερου τεταρτημορίου. Επιπλέον, υπήρχε μία τάση για υψηλότερες

αναποκρίσεις που δεν ήταν όμως στατιστικά σημαντική (45.5% vs 20%; $p=0.062$). Οι 11 ασθενείς στο κατώτερο τεταρτημόριο της έκφρασης του RRM2 είχαν στατιστικά σημαντικότερες απαντήσεις απ' ότι οι 11 ασθενείς στο ανώτερο τεταρτημόριο (45.5% vs 0%; $p=0.016$), αλλά αυτό δεν μεταφράστηκε σε στατιστικά σημαντικό όφελος στο TTP ή την επιβίωση.

Όταν οι ασθενείς ταξινομήθηκαν ανάλογα με την έκφραση των δύο υπομονάδων της ριβονουκλικής ρεδοουκτάσης, RRM1 και RRM2, οι 10 ασθενείς με χαμηλά επίπεδα των RRM1 και RRM2 είχαν υψηλότερες απαντήσεις, TTP και συνολική επιβίωση συγκριτικά με τους 7 ασθενείς με υψηλά επίπεδα και των δύο γονιδίων (απαντήσεις: 60% vs 14.2%, $p=0.049$; time to progression: 9.9 vs 2.3 μήνες, $p=0.003$; συνολική επιβίωση: 15.4 vs 3.6 μήνες, $p=0.031$). Η πολυπαραγοντική ανάλυση έδειξε ότι τα υψηλά επίπεδα έκφρασης RRM2 – αλλά όχι της RRM1 – σχετίζονταν σημαντικά με πτωχή απάντηση (OR:0.315; $p=0.002$).

Η μελέτη αυτή έδειξε για πρώτη φορά μία θετική σχέση μεταξύ της ενδο-ογκικής έκφρασης mRNA της RRM2 και της απάντησης σε συνδυασμό βασισμένο στη gemcitabine σε ασθενείς με αδenoκαρκίνωμα του πνεύμονα. Έχοντας πάντα υπ' όψη τον μικρό αριθμό των ασθενών, η μελέτη μας επισημαίνει ότι το μοριακό προφίλ του όγκου μπορεί να χρησιμεύσει σαν δείκτης απάντησης στη θεραπεία και, κατά συνέπεια, της κλινικής έκβασης σε ασθενείς με αδenoκαρκίνωμα πνεύμονα που λαμβάνουν σαν χημιοθεραπεία τον συνδυασμό docetaxel/gemcitabine.

Στόχος 2β: Να αξιολογηθούν τα επίπεδα έκφρασης mRNA των BRCA1, RRM1 και RRM2 από τα κακοήθη κύτταρα και να συσχετιστούν τα επίπεδα αυτών με τη κλινική απάντηση σε Χ/Θ 1^{ης} γραμμής με docetaxel και gemcitabine σε ασθενείς με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα.

Τα συμπεράσματα της προηγούμενης μελέτης δεν ήταν ξεκάθαρο αν μπορούν να επεκταθούν γενικότερα σε ασθενείς με ΜΜΚΠ. Αυτό μαζί με το μικρό σχετικά αριθμό ασθενών μας οδήγησε στο να προσπαθήσουμε αναδρομικά να επαληθεύσουμε τα ευρήματα μας για τις υπομονάδες της ριβονουκλεϊκής ρεδουκτάσης RRM1 και RRM2 καθώς και να διευρύνουμε το προφίλ των μοριακών δεικτών, συμπεριλαμβάνοντας και το BRCA1 που σχετίζεται με την ευαισθησία στις ταξάνες, εξετάζοντας μία σειρά δειγμάτων από ασθενείς με προχωρημένο ΜΜΚΠ που έλαβαν χημειοθεραπεία με docetaxel/gemcitabine σε προηγούμενη τυχαιοποιημένη μελέτη φάσης III που υλοποιήθηκε από την Ελληνική Ογκολογική Ερευνητική Ομάδα (EOEO).

Διαπιστώθηκε η ύπαρξη στενής σχέσης μεταξύ των επιπέδων έκφρασης των RRM1 και BRCA1 ενώ η απώλεια της let-7 υπερεκφράζει το BRCA1 καθώς και τα RRM1 και RRM2. Επιπλέον, και τα δύο, BRCA1 και RRM1 υπερρυθμίζονται στη SV40 T/t-antigen υπογραφή. Τα επίπεδα του BRCA1 συντελούν σε διαφορετική χημειοευαισθησία σε καρκινικές κυτταρικές σειρές. Ασθενείς με καρκίνο των ωοθηκών στα κατώτερα τεταρτημόρια της έκφρασης του BRCA1 επέδειξαν ευαισθησία στη cisplatin και αντίσταση στις paclitaxel και docetaxel, ενώ εκείνοι στα

ανώτερα τεταρτημόρια αντίσταση στη cisplatin και ευαισθησία στις paclitaxel και docetaxel. Χαμηλά επίπεδα BRCA1 έχουν επίσης σχετισθεί με αυξημένη επιβίωση σε ασθενείς με ΜΜΚΠ που έλαβαν gemcitabine/cisplatin.

Δείγματα όγκων συλλέχθηκαν από τους ασθενείς που συμμετείχαν στο ερευνητικό σκέλος της τυχαιοποιημένης μελέτης της ΕΟΕΟ από Απρίλιο 1999 έως Σεπτέμβριο 2002. Η μεθοδολογία κατεργασίας των δειγμάτων είναι όμοια με τη περιγραφείσα ανωτέρω. Εκτός από την ανάλυση έκφρασης του κάθε γονιδίου σαν συνεχής μεταβλητή, κατηγοριοποιήθηκαν και σε τεταρτημόρια για να διερευνήσουμε τη τάση κινδύνου των γονιδιακών μεταβλητών καθώς και για να προσδιορίσουμε ομάδες γονιδιακής έκφρασης με διαφορετικό κίνδυνο.

Στην αρχική μελέτη 209 ασθενείς είχαν λάβει χημειοθεραπεία με docetaxel/gemcitabine. Από 107 δεν είχαμε δείγματα ιστού. Κλινικά δεδομένα και δείγματα είχαμε από 102 και εξαγωγή RNA για τα γονίδια BRCA1, RRM1 και RRM2 επιτεύχθηκε στα 96 δείγματα. 81 ήταν αδενοκαρκινώματα, 10 πλακώδη και 5 μεγαλοκυτταρικά καρκινώματα. Για να προβλέψουμε απάντηση στη θεραπεία, ένα λογιστικό μοντέλο regression τέθηκε για την έκφραση κάθε γονιδίου ξεχωριστά σαν συνεχής μεταβλητή. Όσο τα επίπεδα του BRCA1 αυξάνονται, η πιθανότητα απάντησης αυξάνεται σημαντικά (OR=1.09, 95%CI:1.02-1.16; p=0.01). Αντίθετα όσο τα επίπεδα του RRM2 αυξάνονται, η πιθανότητα απάντησης ελαττώνεται σημαντικά (OR=0.94; 95%CI, 0.91-0.97;

$p=0.0001$). Μία παρόμοια τάση, όχι όμως στατιστικά σημαντική παρατηρήθηκε για τα επίπεδα του RRM1 (OR=0.97, 95%CI:0.77-1.23; $p=0.82$).

Όταν οι ασθενείς που ανταποκρίθηκαν στη Χ/Θ ταξινομήθηκαν σε τεταρτημόρια, η πλειονότητα τους είχαν υψηλά επίπεδα BRCA1 και χαμηλά επίπεδα RRM2: 58.6% στο ανώτερο τεταρτημόριο BRCA1 ($p=0.002$) και 72.4% στο κατώτερο τεταρτημόριο RRM2 ($p=0.0001$). Η μονοπαραγοντική ανάλυση έδειξε ότι τα χαμηλά επίπεδα RRM2, ECOG PS2 και υψηλά επίπεδα BRCA1 mRNA σχετίζονται σημαντικά με τη πιθανότητα απάντησης. Στη πολυπαραγοντική ανάλυση αυτών των μεταβλητών μαζί με το στάδιο νόσου και τα επίπεδα του RRM1 mRNA, η χαμηλή έκφραση RRM2 mRNA αναδύθηκε σαν ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για την απάντηση. Ένα πολυπαραγοντικό μοντέλο τέθηκε για τις γονιδιακές μεταβλητές σε σχέση με τον χρόνο προόδου της νόσου (TTP). Αυτό έδειξε ότι μόνο τα επίπεδα του BRCA1 και RRM1 mRNA ήταν σημαντικά ($p=0.02$). Τότε το μοντέλο διαστρωματώθηκε ανάλογα με το RRM1 mRNA και χωρίς το στάδιο νόσου. Σε αυτό, οι ασθενείς στο κατώτερο τεταρτημόριο του RRM2 συνέχιζαν να έχουν τον χαμηλότερο κίνδυνο προόδου νόσου, άρα μεγαλύτερο TTP, ανεξάρτητα από τα επίπεδα του RRM1 mRNA.

Οι ασθενείς ταξινομήθηκαν σε 3 ομάδες ανάλογα με τον κίνδυνο προόδου νόσου (όπως αυτός προσδιορίζεται από το μειωμένο TTP), βασισμένοι στην αλληλεπίδραση των επιπέδων BRCA1 και RRM1 mRNA.

24 ασθενείς ήταν στη χαμηλού κινδύνου ομάδα (ενδιάμεσο BRCA1 + χαμηλό RRM1; υψηλό BRCA1 + χαμηλό RRM1; υψηλό BRCA1 + ενδιάμεσο RRM1), 42 ασθενείς στην ενδιάμεσου κινδύνου ομάδα (χαμηλό BRCA1 + χαμηλό RRM1; ενδιάμεσο BRCA1 + υψηλό RRM1; υψηλό BRCA1 + υψηλό RRM1), και 30 ασθενείς στην υψηλού κινδύνου ομάδα (χαμηλό BRCA1 + ενδιάμεσο RRM1; ενδιάμεσο BRCA1 + ενδιάμεσο RRM1; χαμηλό BRCA1 + υψηλό RRM1). Το διάμεσο TTP ήταν 10.13 μήνες (7.65-12.62) για τους ασθενείς χαμηλού κινδύνου, 4.17 μήνες (72.90-5.44) για τους ασθενείς ενδιάμεσου κινδύνου και 2.3 μήνες (1.76-2.84) για τους ασθενείς υψηλού κινδύνου ($p=0.001$). Όσον αφορά την επιβίωση, στη πολυπαραγοντική ανάλυση μόνο το PS ήταν σημαντικός παράγοντας.

Η μελέτη αυτή επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα της προηγούμενης που έγινε σε ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα που αντιμετωπίστηκε με X/Θ docetaxel/gemcitabine, δηλαδή ασθενείς με χαμηλά επίπεδα mRNA RRM2 εμφάνισαν μεγαλύτερες πιθανότητες απάντησης στη θεραπεία με docetaxel/gemcitabine καθώς και στο TTP. Επιπρόσθετα, τα επίπεδα mRNA RRM2 είναι ανεξάρτητος προβλεπτικός παράγοντας για απάντηση στη θεραπεία. Η σημαντική συσχέτιση μεταξύ του ανώτερου τεταρτημορίου έκφρασης mRNA BRCA1 και απάντησης στη θεραπεία που παρατηρήθηκε προσθέτει στην ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία ότι το BRCA1 είναι ένας ουσιαστικός μεσολαβητής στην επιδιόρθωση του βλαμμένου DNA. Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής

υποδεικνύουν ότι η αποτελεσματικότητα της θεραπείας με τον συνδυασμό docetaxel/gemcitabine μπορεί να βελτιωθεί όταν την εξατομικεύσουμε ανάλογα με την έκφραση mRNA των BRCA1, RRM1 και RRM2.

Γενικότερα, η ύπαρξη του πολύπλοκου γενετικού υπόβαθρου κάθε μεμονωμένου ασθενή και η διαθεσιμότητα διαφόρων αποτελεσματικών θεραπευτικών προσεγγίσεων στο πεδίο της Χ/Θ του ΜΜΚΠ προτείνουν μια πιο εξατομικευμένη διαχείριση των συγκεκριμένων ασθενών. Είναι ουσιαστικό να προσδιοριστούν κατάλληλα προσωπικά και κυτταρικά χαρακτηριστικά για την επιλογή κατάλληλου συνδυασμού Χ/Θ ή για την αλλαγή σχημάτων σε ασθενείς που η Χ/Θ δεν είναι αποτελεσματική. Παράλληλα, υπάρχει η ανάγκη περισσότερο από ποτέ για γενετικό διαχωρισμό κατάλληλων υποσυνόλων ασθενών που μπορεί να ωφελούνται περισσότερο από μια συγκεκριμένη θεραπεία όπως ο υπό εξέταση συνδυασμός docetaxel με gemcitabine από άλλα υποσύνολα ασθενών που μπορεί να ωφελούνται από διάφορα άλλα χημειοθεραπευτικά σχήματα, θέτοντας νέους φαρμακογενετικούς κανόνες στην εκλογή της Χ/Θ στο ΜΜΚΠ.

II. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

α. ΓΕΝΙΚΑ ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ (ΚΠ)

Ο καρκίνος του πνεύμονα (ΚΠ) αποτελεί τη κυρίαρχη αιτία θανάτου από καρκίνο παγκόσμια και μόνο στις ΗΠΑ καταμετρήθηκαν 161.840 θάνατοι το 2008. Εστιάζοντας σε μερικά ενδιαφέροντα επιδημιολογικά δεδομένα που δημοσιεύτηκαν στις αρχές αυτής της δεκαετίας, είναι αξιοσημείωτο ότι το 2002, διαγνώσθηκαν με ΚΠ 1.350.000 άνθρωποι (**Parkin et al., 2002**) (12% όλων των διηθητικών καρκίνων), με μια αύξηση κατά 110.000 σε σχέση με τον αριθμό του ΚΠ που διαγνώσθηκε το 2000 (**Parkin, 2001**). Ο εκτιμώμενος αριθμός ΚΠ αυξήθηκε κατά 51% παγκοσμίως μεταξύ 1985 και 2002, με τη μεγαλύτερη αύξηση να καταγράφεται στις γυναίκες (76%) σε σχέση με τους άνδρες (44%). Μετά από προσαρμογή της πληθυσμιακής αύξησης και γήρανσης του πληθυσμού, οι προσαρμοσμένες στην ηλικία τιμές (age-standardized rates) ελαττώθηκαν (-3%) μεταξύ των ανδρών σε αυτή τη περίοδο, ενώ αυξήθηκαν (22%) μεταξύ των γυναικών. Περίπου 71% (ή 960.000) ήταν άνδρες και αναλογικά αντιστοιχούν 40 και 13 νέες περιπτώσεις ανά 100.000 πληθυσμό για άνδρες και γυναίκες αντίστοιχα (**IARC CancerBase, 2004**).

Επίπτωση ανά ηλικία

Το 5% των περιπτώσεων με ΚΠ διαγνώσθηκαν σε ηλικία μεταξύ 0-44 ετών, ενώ το 14% ανήκε στην ομάδα 45-54 έτη, το 25% ήταν μεταξύ 55-64 ετών και το 55% σε ηλικιωμένους άνω των 65 ετών. Αυτές οι αναλογίες ήταν ομοιόμορφα κατανομημένες και στα δύο φύλα (**IARC CancerBase, 2004**).

Επίπτωση ανά ιστολογικό τύπο

Ο ΚΠ διακρίνεται σε δύο κυρίως τύπους: μικροκυτταρικός ΚΠ (ΜΚΠ) και μη-μικροκυτταρικός ΚΠ (ΜΜΚΠ). Σχεδόν το 95% των ασθενών που διαγιγνώσκονται με ΜΚΠ είναι νυν ή πρώην καπνιστές (**Jackman et al., 2005**). Ο ΜΜΚΠ είναι μια ετερογενής ομάδα της οποίας οι κύριοι υπότυποι είναι τα αδενοκαρκινώματα (40-50%) και οι όγκοι από πλακώδη κύτταρα (30-35%) και σπανιότερη υποκατηγορία οι μεγαλοκυτταρικοί όγκοι (5-10%). Ιστορικά, η διάκριση αυτή δεν θεωρήθηκε ότι είχε κλινική εφαρμογή, το οποίο οδήγησε σε μία κοινή αντιμετώπιση ανεξάρτητα από τον ιστολογικό υπότυπο. Όμως νέα ερευνητικά δεδομένα έδειξαν ότι ο ιστολογικός υπότυπος είναι ένας σημαντικός παράγοντας ικανός να αλλάξει τη θεραπευτική πρακτική στον προχωρημένο ΜΜΚΠ, ώστε να διαμορφωθούν νέοι αλγόριθμοι βασισμένοι στην ιστολογία. Αν και η άποψη αυτή αναδείχθηκε πρόσφατα, παλαιότερη έρευνα το είχε φέρει στο προσκήνιο σαν ένα δυνητικά σημαντικό θέμα.

Ειδικότερα, το πλακώδες καρκίνωμα συνδέεται κατά κύριο λόγο με το κάπνισμα (**Sakurai et al., 2004**). Αυτοί οι όγκοι συνήθως έχουν τη τάση να εμφανίζονται στα κεντρικά τμήματα του πνεύμονα και να παρουσιάζονται σαν μεγάλοι όγκοι (**Beadsmoore et al., 2003**). Αντίθετα το αδενοκαρκίνωμα συνήθως εντοπίζεται στη περιφέρεια του πνεύμονα. Αν και πρόκειται για τον συνηθέστερο τύπο καρκίνου του πνεύμονα που εμφανίζεται σε μη καπνιστές (**Subramanian et al., 2007**), το κάπνισμα ολοένα και περισσότερο τα τελευταία χρόνια ενοχοποιείται και σαν αιτία του αδενοκαρκινώματος (**Yang et al., 2002, IARC, 2002**). Το πλακώδες καρκίνωμα αποτελεί το μεγαλύτερο ποσοστό διαγνωσμένου ΚΠ στους άνδρες, ενώ το αδενοκαρκίνωμα στις γυναίκες. Μεταξύ των ανδρών, το πλακώδες καρκίνωμα ήταν ο συνηθέστερος ιστολογικός τύπος ΚΠ στη Κορέα (46%), στη Γαλλία (41%), στο Ηνωμένο Βασίλειο (40%), ενώ το αδενοκαρκίνωμα στις ΗΠΑ (31%), στον Καναδά (31%), στη Σουηδία (30%) και στην Αυστραλία (29%). Με την εξαίρεση του Ηνωμένου Βασιλείου (όπου 28% των περιπτώσεων ΚΠ στις γυναίκες ήταν εκ πλακωδών κυττάρων), τα αδενοκαρκινώματα αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό μεταξύ των γυναικών σε όλες τις χώρες (από το 38% στις ΗΠΑ έως 69% στην Ιαπωνία). Το ΜΚΠ αντιστοιχεί μεταξύ 14% (Αυστραλία και Ιαπωνία) έως 17% (Κορέα και Ηνωμένο Βασίλειο) στους άνδρες και μεταξύ 9% (Ιαπωνία) έως 22% (Ηνωμένο Βασίλειο) στις γυναίκες.

Επίπτωση ανά στάδιο

Στις ΗΠΑ μεταξύ 1996-2003, μόνον 16% των περιπτώσεων ΚΠ ήταν εντοπισμένοι όταν διαγνώσθηκαν (συγκρινόμενοι με το 91% του καρκίνου του προστάτη, 80% για το μελάνωμα και 61% για τον καρκίνο του μαστού), 35% ήταν τοπικο-περιοχικοί και 41% με απομακρυσμένες μεταστάσεις, ενώ 8% ήταν ασταδιοποίητοι (**Ries et al., 2007**). Οι γυναίκες είχαν ελαφρώς μεγαλύτερη πιθανότητα να διαγνωσθούν με εντοπισμένο ΚΠ σε σχέση με τους άνδρες (18% και 15% αντίστοιχα), ενώ μεγαλύτερο ποσοστό ανδρών είχαν απομακρυσμένες μεταστάσεις στη διάγνωση (43% άνδρες, 30% γυναίκες).

β. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΓΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΠ

Ο σπουδαιότερος παράγοντας κινδύνου για τον ΚΠ είναι το κάπνισμα. Η σχέση μεταξύ τσιγάρου και ΚΠ είναι ένα από τα πλέον ενδεδειγμένα μελετηθέντα θέματα στη βιοϊατρική έρευνα (**Alberg & Samet, 2003**) και ισχυρές ενδείξεις για το κάπνισμα ως κυρίαρχος αιτιολογικός παράγοντας για ΚΠ δημοσιεύτηκαν από τα μέσα του 20ου αιώνα (**Thun et al., 2002, Haussmann, 2007, Sasco et al., 2004**). Ένας μεγάλος αριθμός μελετών βρήκε ότι οι καπνιστές έχουν 15-30 φορές αυξημένο κίνδυνο να αναπτύξουν ΚΠ σε σχέση με τους μη καπνιστές (**Sasco et al., 2004**). Υπάρχουν ακόμη αρκετές ενδείξεις για να τεκμηριώσουν την έκθεση στο παθητικό κάπνισμα σαν αιτία ΚΠ (**IARC, 2002**).

Όμως όλοι οι ΚΠ δεν οφείλονται στο κάπνισμα και είναι πιθανόν ότι η μερίδα των ασθενών που θα αναπτύξουν ΚΠ και δεν είναι καπνιστές θα αυξηθεί στο μέλλον (**Wakelee et al., 2007, Sun et al., 2007**). Έκθεση στο ραδόνιο μέσα σε εσωτερικούς χώρους θεωρείται σαν ο δεύτερος σπουδαιότερος περιβαλλοντικός παράγοντας κινδύνου για ΚΠ στις ΗΠΑ (**Alberg et al., 2007**) και πρόσφατα υπολογίσθηκε να είναι υπεύθυνος για το 9% όλων των θανάτων από ΚΠ στην Ευρώπη (**Darby et al., 2005**). Ένα οικογενειακό ιστορικό ΚΠ έχει σαν αποτέλεσμα να διπλασιάσει τη πιθανότητα ΚΠ ανεξάρτητα από το κάπνισμα (**Nitadori et al., 2006, Matakidou et al., 2005**). Μόλυνση της ατμόσφαιρας, προϋπάρχουσες παθήσεις των πνευμόνων, όπως φυματίωση ή πνευμονία, υψηλές δόσεις ακτινοβολίας και έκθεση σε βιομηχανικά ή χημικά καρκινογόνα όπως η άσβεστος, το πυρίτιο και το αρσενικό έχουν συνδεθεί με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΚΠ (**Subramanian et al., 2007, Alberg & Samet, 2003, Wakelee et al., 2007, Bilello et al., 2002**). Παράγοντες όπως ενδοοικιακή μόλυνση του αέρα από μαγειρικούς ή θερμαντικούς καπνούς πιθανά να παίζουν έναν μεγαλύτερο ρόλο στην αιτιολογία του ΚΠ στους μη καπνιστές στις λιγότερο ανεπτυγμένες χώρες, ειδικά μεταξύ των γυναικών (**Lam et al., 2004, Boffetta, 2004, Lam, 2005**).

Οι τάσεις στην επίπτωση και θνητότητα του ΚΠ αντανακλούν τις καπνιστικές συνήθειες προ 20-30 ετών, λόγω της χαρακτηριστικά μεγάλης συσχέτισης έναρξης του καπνίσματος και της διάγνωσης ή του θανάτου από ΚΠ (**Alberg et al., 2005, Peace, 1985, Weiss, 1997**). Η σχέση

μεταξύ των τάσεων του ΚΠ και καπνιστικής συνήθειας αναδεικνύεται ακόμη περισσότερο από τις αλλαγές στη κατανομή των ιστολογικών υπότυπων του ΚΠ στη διάρκεια του χρόνου.

Τροποποιήσεις στο σχεδιασμό του τσιγάρου (ειδικότερα η αλλαγή στα τσιγάρα με φίλτρο τις δεκαετίες του 1960 και 1970), η σύνθεση των τσιγάρων και η καπνιστική συμπεριφορά πιστεύεται ότι αποτελούν τους κύριους λόγους πίσω από τη σχετική αύξηση της συχνότητας του αδενοκαρκινώματος συγκριτικά με άλλους τύπους ΚΠ (**Alberg et al., 2005, Peace, 1985, Weiss, 1997, Brooks et al., 2005**). Ο καπνός από τσιγάρα με χαμηλότερα ποσοστά πίσσας, νικοτίνης και με φίλτρο εισπνέεται βαθύτερα, οδηγώντας σε υψηλότερη συγκέντρωση καρκινογόνων στις εξωτερικές περιοχές των πνευμόνων όπου τα αδενοκαρκινώματα τείνουν να σχηματίζονται. Επιπροσθέτως τα χαρμάνια του καπνού που χρησιμοποιούνται στη παρασκευή των τσιγάρων άλλαξαν και περιέχουν υψηλότερα ποσοστά νιτρικών που επίσης έχουν συσχετισθεί με την ανάπτυξη αδενοκαρκινώματος. Η ταχεία αύξηση των αδενοκαρκινωμάτων σημαίνει ότι τώρα είναι πλέον ο συχνότερος τύπος και στους άνδρες σε αρκετές χώρες και συνεχίζει να είναι ο κυρίαρχος τύπος ΚΠ στις γυναίκες (**Thun et al., 1997, Gabrielson, 2006, Gray, 2006**).

γ. ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΚΑΙ ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ ΣΤΟΝ ΚΠ

Παγκοσμίως, η πρόγνωση των ασθενών με ΚΠ παραμένει φτωχή με 5ετή επιβίωση να κυμαίνεται μεταξύ 6-14% στους άνδρες και 7-18% στις γυναίκες.

Ένας λόγος για αυτή την επιβίωση είναι η διάγνωση σε προχωρημένο στάδιο όταν οι θεραπευτικές επιλογές είναι περιορισμένες (Koyi et al., 2002, Salomaa et al., 2005). Ένας άλλος λόγος είναι οι επιπτώσεις του καπνίσματος, όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις ή η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια που έχουν αρνητική επίδραση στην επιβίωση (Tammemagi et al., 2004, Ryu & Lee, 2006). Υπάρχουν ακόμη κάποιες ενδείξεις ότι η προηγούμενη ή νυν χρήση καπνού ελατώνει την αποτελεσματικότητα της ακτινοθεραπείας ή χημειοθεραπείας στην αντιμετώπιση του ΚΠ (Tsao et al., 2006, Videtic et al., 2003).

Η επιβίωση στον ΚΠ είναι γενικά, όχι όμως πάντοτε, καλύτερη στις γυναίκες και σε νεότερους ασθενείς (Blanchon et al., 2006, Ramalingam et al., 1998, Paesmans et al., 2000, Visbal et al., 2004, Brundage et al., 2002, Bremnes et al., 2003). Αν και ο ακριβής μηχανισμός για δυνητικές διαφορές στην επιβίωση ανάλογα με το φύλο και την ηλικία παραμένει σκοτεινός, πιθανές εξηγήσεις περιλαμβάνουν τις διαφορές στη βιολογία του όγκου που σχετίζεται με το φύλο και ορμονικούς παράγοντες (Neugut & Jacobson, 2006, Cerfolio et al., 2006), ενώ κάποιιοι προτείνουν ότι το

όφελος στην επιβίωση που παρατηρείται στους νεότερους ασθενείς οφείλεται στην επιθετικότερη θεραπεία σε σχέση με τους ηλικιωμένους.

Εάν υπάρχει κάποια βελτίωση στην επιβίωση των ασθενών με ΚΠ τις 2-3 τελευταίες δεκαετίες αυτή είναι πολύ μικρή έως οριακή λαμβάνοντας υπόψη όλους τους ΚΠ αλλά και μέσα σε εξατομικευμένες ιστολογικές ομάδες (**Jemal et al., 2004, Govindan et al., 2006, Brooks et al., 2007**). Αναμένεται όμως ότι με τη χρήση νεότερων χημειοθεραπευτικών και βιολογικών παραγόντων σε συνδυασμό με τη καλύτερη κατανόηση της βιολογίας του ΚΠ, ότι τόσο η επιβίωση όσο και η ίδια η ζωή των ασθενών με ΜΜΚΠ και ΜΚΠ θα βελτιωθεί στο άμεσο μέλλον (**Manegold, 2007, El Maalouf et al., 2007**).

Τα αποτελέσματα πρόσφατων μεγάλων μελετών δείχνουν ότι οι μη καπνιστές που αναπτύσσουν ΚΠ έχουν καλύτερη πρόγνωση σε σχέση με τους καπνιστές, αφού λάβουμε υπόψη άλλους παράγοντες όπως δημογραφικά χαρακτηριστικά και συνυπάρχουσες παθήσεις (**Nordquist et al., 2004**). Αυτό πιθανώς αντανακλά μια διαφορετική βιολογική συμπεριφορά στη καρκινογένεση (πιθανά σαν αποτέλεσμα όψιμων μεταλλάξεων, ανοσοκαταστολής ή οξειδωτικών βλαβών) του ΚΠ που σχετίζεται με το κάπνισμα και άλλων μορφών ΚΠ .

Θνησιμότητα

Ο ΚΠ αποτελεί τη πρώτη αιτία θανάτου από καρκίνο παγκόσμια. Το 2002 καταγράφηκαν 1.180.000 θάνατοι από ΚΠ (**Parkin et al., 2002**), μία

αύξηση κατά 70.000 σε σχέση με το 2000. Οι θάνατοι από ΚΠ αποτελούν σχεδόν το 18% της θνησιμότητας από όλους τους καρκίνους (**Parkin et al., 2002, Manegold, 2007**) και περίπου το 2% όλων των αιτιών θανάτου παγκόσμια. Σχεδόν το 70% των θανάτων από ΚΠ συνέβη στους άνδρες, ισοδυναμώντας με 35 θανάτους/100.000 για τους άνδρες σε σχέση με 11 θανάτους /100.000 για τις γυναίκες (**IARC CancerBase, 2004**). Είναι η πρώτη αιτία θανάτου από καρκίνο στους άνδρες ακολουθούμενη από τον καρκίνο του στομάχου και τον ηπατοκυτταρικό και η 2η αιτία στις γυναίκες πίσω από τον καρκίνο του μαστού. Για χώρες όμως όπως οι ΗΠΑ, το Ηνωμένο Βασίλειο, η Σουηδία, η Δανία ο ΚΠ υπερτερεί πλέον και του καρκίνου του μαστού στη θνησιμότητα (**Mathers & Loncar, 2006, Jemal et al., 2007**).

Είναι κοινή παραδοχή ότι σχεδόν όλοι οι ασθενείς που διαγιγνώσκονται με ΚΠ πεθαίνουν από ΚΠ. Όμως μεταξύ 20-40% των ασθενών με πρώιμο ΚΠ πεθαίνουν από άλλες αιτίες (**Ferlay et al., 2007**), που συχνότερες είναι η στεφανιαία νόσος ή αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο (**Battafarano et al., 2002**). Λόγω της φτωχής πρόγνωσης των ασθενών με ΚΠ το κύριο πρόβλημα στον ΚΠ οφείλεται στη πρόωρη θνησιμότητα παρά στη μακρόχρονη νόσο. Υπολογισμοί από το Global Burden of Disease Study (**WHO, 2002**) αποκαλύπτουν ότι το 2002 ο ΚΠ προξένησε απώλεια 11.000.000 ετών ζωής και 223.000 ετών λόγω αναπηρίας.

Από τα στοιχεία της Ευρωπαϊκής Ένωσης και Β. Αμερικής φαίνεται ότι οι τιμές θνησιμότητας έχουν μειωθεί στους άνδρες κάτω των 65 ετών και είτε έχουν φθάσει ένα επίπεδο ή αρχίζουν να μειώνονται στους περισσότερο ηλικιωμένους (**Bray et al., 2004, Shibuya et al., 2005**). Η θνησιμότητα στις γυναίκες γενικά αυξήθηκε σε όλες τις ηλικίες στην Ευρώπη, αλλά σταθεροποιήθηκε ή αρχίζει να μειώνεται στις γυναίκες κάτω των 65 ετών στο Ηνωμένο Βασίλειο, την Ιρλανδία, τον Καναδά και τις ΗΠΑ. Κάποιες ενδείξεις αρχίζουν να διαφαίνονται ότι οι δείκτες θνησιμότητας μπορεί να αρχίζουν να μειώνονται στις νεότερες γυναίκες (20-44 ετών) σε μερικές Ευρωπαϊκές χώρες (**Bosetti et al., 2005**).

Παρά τις πτωτικές ή σταθεροποιητικές τάσεις στον ΚΠ σε μερικές χώρες, οι ειδικοί προβλέπουν ότι ο ΚΠ θα συνεχίσει να είναι η κύρια αιτία θανάτου σε όλο τον κόσμο στο προσεχές μέλλον σαν συνέπεια της γήρανσης του πληθυσμού. Εκτιμάται ότι έως το 2030 ο ΚΠ θα αποτελεί την 6η αιτία θανάτου από την 9η θέση που βρίσκεται τώρα. Η στροφή σε μεγαλύτερο αριθμό κρουσμάτων ΚΠ στις αναπτυσσόμενες χώρες θα συνεχίσει να συμβαίνει. Πιστεύεται ότι έως το 2025, 85% των παγκόσμιων καπνιστών θα ζουν σε λιγότερο ανεπτυγμένες χώρες και έως το 2030 αναμένεται ότι περίπου 70% όλων των θανάτων που σχετίζονται με το κάπνισμα (συμπεριλαμβανομένων και του καρκίνου του πνεύμονα) θα συμβαίνουν στις πτωχότερες και μεσαίου εισοδήματος χώρες, συγκρινόμενο με το ισχύον 50%.

Το καπνιστικό μοντέλο της Κίνας είναι πιθανό να επηρεάσει το παγκόσμιο φορτίο ΚΠ στα επόμενα 10-20 έτη. Η Κίνα σήμερα καταναλώνει 1 στα 3 τσιγάρα που παράγονται παγκόσμια (**Yang et al., 2003**), λόγω του τεράστιου πληθυσμού της και της υψηλής συχνότητας του καπνίσματος στους Κινέζους άνδρες (67%). Οι δείκτες θνησιμότητας αυξάνονται και στα δύο φύλα, σε όλες τις ηλικίες, και στη πόλη και στον αγροτικό πληθυσμό. Εάν συνεχισθεί αυτό το μοντέλο, προβλέπεται μια μαζική αύξηση των θανάτων που σχετίζονται με το κάπνισμα στην Κίνα. Η επίπτωση του καπνίσματος στους νέους ανθρώπους αποτελεί ακόμη ένα παγκόσμιο πρόβλημα και ειδικότερα η αυξημένη χρήση παραγώγων καπνού στα νέα κορίτσια σε πολλές χώρες (**Tyczynski et al., 2004**). Η American Cancer Society αναφέρει ότι σχεδόν 100.000 παιδιά και έφηβοι εθίζονται καθημερινά στον καπνό παγκόσμια (**Mackay et al., 2006**) και πρόσφατα στοιχεία από το Global Youth Tobacco Survey δείχνουν ότι περίπου 1 στους 6 (17%) μαθητές σχολείου μεταξύ 13-15 ετών έχει καπνίσει τσιγάρο και/ή άλλα παράγωγα καπνού (**Warren et al., 2006**). Αυτά τα θέματα υπογραμμίζουν την αυξημένη ανάγκη για έλεγχο της χρήσης του καπνού σαν μια προσπάθεια να περιορισθεί η παγκόσμια εξάπλωση του ΚΠ (**Boyle & Dresler, 2005**), ειδικότερα στις λιγότερο ανεπτυγμένες χώρες. Τα προγράμματα ελέγχου του καπνού έχουν αποδειχθεί χρήσιμα στην ελάττωση του καπνίσματος σε χώρες όπως οι ΗΠΑ και η Αυστραλία, αν και αναζητούνται νέα για ανθρώπους με κοινωνικο-οικονομικά προβλήματα και παγιωμένες αντιλήψεις.

Η ΠΟΥ πρόσφατα εξέδωσε μια αναφορά που προωθεί έξι στρατηγικές αντικαπνιστικής εκστρατείας (**WHO, 2008**). Αυτές είναι, ο έλεγχος της χρήσης καπνού και προληπτικές πολιτικές, προστασία των ανθρώπων από τον καπνό του τσιγάρου, προσφορά βοήθειας για διακοπή του καπνίσματος, προειδοποίηση για τους κινδύνους του καπνού, απαγόρευση στη διαφήμιση, προώθηση, χορηγίες και αύξηση των φόρων στο καπνό.

δ. ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΟΥ ΜΗ-ΜΙΚΡΟΚΥΤΤΑΡΙΚΟΥ ΚΠ (ΜΜΚΠ)

Ο προχωρημένος ΜΜΚΠ περιλαμβάνει τον μεταστατικό (στάδιο IV) και τον τοπικά προχωρημένο που δεν επιδέχεται θεραπεία με σκοπό την ίαση (στάδιο III_{Bwet} ή λόγω συνυπαρχουσών παθήσεων του ασθενούς). Η πρόγνωση για αυτούς τους ασθενείς είναι φτωχή.

Πρόσφατες, μεγάλες τυχαιοποιημένες μελέτες φάσης III έδειξαν ότι η Χ/Θ βασισμένη στη πλατίνα δίνει μια διάμεση επιβίωση μεταξύ 8-11 μηνών, επιβίωση ενός έτους περί το 30-45% και 2-ετή επιβίωση 10-20% (**Fossella et al., 2003, Belani et al., 2005, Martoni et al., 2005, Rudd et al., 2005, Sederholm et al., 2005**). Είναι γνωστή από το 1995 η πρωτοποριακή μετα-ανάλυση βασισμένη σε ατομικά στοιχεία φακέλων ασθενών (Individual patient data, IPD) από 9000 ασθενείς από περισσότερες από 50 μελέτες που κατέδειξε ότι η χρήση της Χ/Θ σε ασθενείς με προχωρημένο ΜΜΚΠ, συγκρινόμενη με τη βέλτιστη

υποστηρικτική αγωγή επιτυγχάνει ένα όφελος της τάξης του 10% στην επιβίωση στο ένα έτος, 2 μηνών στη διάμεση επιβίωση και 5% στη 5-ετή επιβίωση (**NSCLCCG, 1995**). Αν και τα αποτελέσματα ήταν στατιστικά σημαντικά, το μέγεθος αυτού του οφέλους θεωρείται μέτριο.

Η ίδια ομάδα, NSCLC Collaborative Group, πρόσφατα (**NSCLCCG Meta-Analyses, 2008**) αναθεώρησε τα αποτελέσματα της, περιλαμβάνοντας τις πρόσθετες μελέτες από 1995 μέχρι σήμερα που συνέκριναν Χ/Θ με βέλτιστη υποστηρικτική αγωγή. Έτσι με 65% περισσότερα στοιχεία από ότι το 1995, η νέα μετα-ανάλυση έχει περισσότερη ισχύ για να εξετάσει τη δράση της Χ/Θ σε διαφορετικές ομάδες ασθενών. Τα αποτελέσματα δείχνουν ένα στατιστικά σημαντικό όφελος της Χ/Θ [$p \leq 0.0001$ και HR: 0,77], ισοδύναμα με μια απόλυτη αύξηση της επιβίωσης κατά 9% στους 12 μήνες και διάμεσης επιβίωσης κατά 1,5 μήνα (από 4.5 σε 6 μήνες). Τα οφέλη ήταν παρόμοια σε όλες τις υπο-ομάδες των ασθενών ανεξαρτήτως ηλικίας, ιστολογίας και κατάστασης υγείας (PS). Δεν υπήρχε διαφορά στα αποτελέσματα ανάλογα με τον τύπο του συνδυασμού ($p=0.63$) ή ανάλογα αν χορηγήθηκε συνδυασμός φαρμάκων ή μονοθεραπεία ($p=0.40$).

Το 1998, μία μετα-ανάλυση (**Lilenbaum et al., 2004**) συνέκρινε τη μονοθεραπεία έναντι της συνδυασμένης Χ/Θ και βρήκε ότι, ενώ τα ποσοστά των αντικειμενικών ανταποκρίσεων ήταν μεγαλύτερα στους ασθενείς που έλαβαν συνδυασμένη Χ/Θ, η συνολική επιβίωση δεν ήταν στατιστικά σημαντικά καλύτερη. Ακόμη η τοξικότητα ήταν αυξημένη στο

σκέλος της συνδυασμένης Χ/Θ. Δύο άλλες, βασισμένες στη βιβλιογραφία, μετα-αναλύσεις (**Hotta et al., 2004, Delbado et al., 2004**) ανέφεραν ότι τα δύο φάρμακα ήταν περισσότερο ωφέλιμα απ' ότι το ένα, αλλά ότι τα τρία δεν ήταν καλύτερα των δύο. Είναι σημαντικό να έχουμε υπόψη μας όμως, ότι αυτές οι παρατηρήσεις βασίζονται σε έμμεσες συγκρίσεις και η ισχύς για ανίχνευση τυχόν διαφορών είναι περιορισμένη. Έτσι τα συμπεράσματα θα πρέπει να ερμηνεύονται προσεκτικά.

Το ASCO αναβάθμισε τις κατευθυντήριες οδηγίες για την αντιμετώπιση του προχωρημένου ΜΜΚΠ το 2009 (**Azzoli et al., 2009**) και το National Comprehensive Cancer Network (NCCN) επίσης αναθεώρησε τις δικές του το 2009 (**NCCN, 2009**). Σε αυτές, αλλά και σε πολλές αντίστοιχες εθνικές κατευθυντήριες γραμμές, το standard of care θεωρείται ο συνδυασμός της πλατίνας με ένα από τα νεότερα χημειοθεραπευτικά (Taxanes, gemcitabine, vinorelbine, pemetrexate).

Πολλαπλές μελέτες συνέκριναν διάφορους συνδυασμούς πλατίνας και οι περισσότερες κατέληξαν στο ότι όλα τα σχήματα έχουν συγκρίσιμη κλινική δραστηριότητα (**Scagliotti et al., 2002, Schiller et al., 2002, Kelly et al., 2001, Fossella et al., 2003**).

Επιπλέον, τα τελευταία χρόνια υπάρχουν αρκετές μελέτες που συγκρίνουν μη-πλατινούχα σχήματα με πλατινούχα και δείχνουν ισοδύναμη αποτελεσματικότητα (**Georgoulas et al., 2001, Kosmidis et al., 2002**) και το ASCO δέχεται τη χρήση τους στην 1^η γραμμή όπου υπάρχουν αντενδείξεις χορήγησης πλατίνας (**Azzoli et al., 2009**). Οι

Georgoulis et al, στη μελέτη (**Georgoulis et al., 2001**) που ήταν και η αφορμή να ξεκινήσει η παρούσα διατριβή, τυχαιοποίησαν 441 ασθενείς σε docetaxel + gemcitabine έναντι docetaxel + cisplatin στις συνήθεις δόσεις. Οι ανταποκρίσεις και στα δύο σκέλη ήταν παρόμοιες (35% vs. 33% αντίστοιχα) χωρίς να υπάρξουν διαφορές στη διάρκεια ανταπόκρισης, στο TTP ή στην επιβίωση (διάμεση επιβίωση 10 vs 9.5 μήνες αντίστοιχα). Οι ασθενείς όμως που έλαβαν τον μη-πλατινούχο συνδυασμό είχαν λιγότερη μη αιματολογική τοξικότητα, όπως ναυτία, έμετο και διάρροια. Σε παρόμοια μελέτη φάσης III (n=509) σύγκρισης gemcitabine + paclitaxel versus carboplatin + paclitaxel δεν υπήρχαν διαφορές στην επιβίωση (10,4 vs. 9,8 μήνες) με συγκρίσιμη τοξικότητα (**Kosmidis et al., 2002**).

Οι περισσότεροι ασθενείς που λαμβάνουν 1^{ης} γραμμής Χ/Θ θα υποτροπιάσουν σε 3-6 μήνες από την έναρξή της και η διάμεση επιβίωση θα κυμανθεί μεταξύ 8 και 10 μηνών. Δεύτερη, τρίτη και τέταρτη γραμμή θεραπείας τώρα μπορούν να χορηγηθούν στους ασθενείς, ειδικά σε εκείνους που συνεχίζουν να είναι σε καλή γενική κατάσταση και δεν επιδεινώθηκαν αρχικά με τον πλατινούχο Χ/Θκο συνδυασμό (**Shepherd et al., 2000, Hanna et al., 2004**). Δυστυχώς ακόμη μια φορά οι διαφορές στην επιβίωση είναι σχετικά μικρές, συνήθως 6-8 εβδομάδες, σχετικά με το σκέλος ελέγχου. Το erlotinib εγκρίθηκε σαν θεραπεία 2^{ης} και 3^{ης} γραμμής και η δράση του είναι περισσότερο σεσημασμένη στους μη καπνιστές, στους οποίους διπλασιάζει τον χρόνο της διάμεσης επιβίωσης

σε σχέση με τη βέλτιστη υποστηρικτική αγωγή (12,2 vs. 5,6 μήνες αντίστοιχα) (**Shepherd et al., 2005**).

Πρόσφατες μελέτες φάσης III έδειξαν βελτίωση στη συνολική επιβίωση με τη προσθήκη στοχευτικών παραγόντων έναντι του VEGF και EGFR στη πλατινούχα χημειοθεραπεία έναντι χημειοθεραπείας μόνον (**Sandler et al., 2006, Pirker et al., 2009**). Και στις δύο μελέτες, οι στοχευτικοί παράγοντες συνεχίστηκαν και μετά την ολοκλήρωση της πλατινούχου Χ/Θ σαν θεραπεία «συντήρησης». Δεν είναι ξεκάθαρο ποια είναι η καλύτερη μέθοδος ενσωμάτωσης αυτών των παραγόντων στις ισχύουσες θεραπείες δεύτερης γραμμής.

Διάφορες μελέτες ερεύνησαν μια συντομότερη έναντι μακρόχρονης χορήγησης πλατινούχων θεραπειών σαν 1^η γραμμή (**Socinski et al., 2002, von Plessen et al., 2006**). Τα στοιχεία από τέσσερις μελέτες υποστηρίζουν μια διάρκεια θεραπείας 3-4 κύκλων καθότι μεγαλύτερης διάρκειας θεραπείες δεν οδήγησαν σε βελτίωση της συνολικής επιβίωσης ή ποιότητα ζωής.

Τα πρόδρομα αποτελέσματα από τους Barata et al (**Barata et al., 2007**) υποστηρίζουν τη συνέχιση της θεραπείας έως τους έξι κύκλους γιατί υπάρχει βελτίωση στη διάμεση επιβίωση χωρίς αυξημένη τοξικότητα. Η απόλυτη βελτίωση στη επιβίωση (5μήνες) είναι στατιστικά σημαντική και είναι μεγαλύτερη από τη διαφορά που παρατηρήθηκε με τη προσθήκη τρίτου στοχευτικού παράγοντα στις πρόσφατες μελέτες φάσης III (**Sandler et al., 2006, Pirker et al., 2009**).

Πολύ πρόσφατα, μια μετα-ανάλυση (**Soon et al., 2009**), βασισμένη στη βιβλιογραφία, όλων των μελετών που αφορούν τη διάρκεια της Χ/Θ έδειξε ότι η παρατεταμένη Χ/Θ βελτιώνει ουσιαστικά το PFS (HR: 0.75, $p < 0.00001$) και μέτρια την ολική επιβίωση (overall survival-OS) (HR: 0.92, $p = 0.03$). Ανάλυση υποομάδων έδειξε ότι το αποτέλεσμα στο PFS ήταν ισχυρότερο με τα σχήματα τρίτης γενιάς συγκριτικά με τα παλιότερα σχήματα ($p = 0.003$). Η παρατεταμένη Χ/Θ συνοδεύτηκε από αυξημένη τοξικότητα και συνεπώς δεν είχε αποτέλεσμα στη βελτίωση της ποιότητας ζωής.

Δύο μελέτες προσπάθησαν να απαντήσουν στο ερώτημα της επιλογής του χρόνου για χορήγηση Χ/Θ 2^{ης} γραμμής (**Fidias et al., 2009**, **Ciuleanu et al., 2008**). Σε αυτές οι ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν στο ερευνητικό σκέλος να λάβουν μια προκαθορισμένη Χ/Θ 2^{ης} γραμμής αμέσως μετά την ολοκλήρωση της πρώτης γραμμής και στο σταθερό σκέλος έναρξης Χ/Θ 2^{ης} γραμμής με την επιδείνωση της νόσου. Οι Fidias et al (**Fidias et al., 2009**), αφού τυχαιοποίησαν 566 ασθενείς και επέλεξαν τη docetaxel σαν 2^{ης} γραμμής Χ/Θ, κατέληξαν ότι η πρώιμη χορήγηση docetaxel βελτιώνει στατιστικά σημαντικά το PFS έναντι της όψιμης (5.7 vs. 2.7 μήνες αντίστοιχα, $p = 0.0001$), ενώ στη συνολική επιβίωση δεν υπήρξε στατιστικό όφελος (12.3 μήνες έναντι 9.7 μήνες, $p = 0.0853$). Η ποιότητα ζωής δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των δύο ομάδων. Οι Ciuleanu et al (**Ciuleanu et al., 2008**) επέλεξαν τη pemetrexed vs placebo σαν θεραπεία σταθεροποίησης. Αν και οι διαφορές στην επιβίωση δεν

έφθασαν πάλι το στατιστικά σημαντικό όφελος (13 vs. 10,2 μήνες αντίστοιχα, $p = 0.060$), υπήρχε σχεδόν μία 5μηνη βελτίωση στην επιβίωση για το μη-πλακώδες καρκίνωμα. Και στις δύο μελέτες ένα μεγάλο ποσοστό ασθενών (37-50%) που δεν τυχαιοποιήθηκαν στην άμεση θεραπεία δεν έλαβαν τελικά θεραπεία λόγω επιδείνωσής της γενικής τους κατάστασης.

Αυτές οι δύο μελέτες δείχνουν επίσης ότι η κατάλληλη επιλογή του πρωτεύοντος στόχου για μελέτες είναι προβληματική και δεν έχει ακόμη ξεκαθαρισθεί π.χ. η μελέτη των Fidias et al είχε σαν πρωτεύοντα στόχο την συνολική επιβίωση (OS) και λογίζεται σαν «αρνητική» μελέτη, ενώ η μελέτη των Ciuleanu et al που στόχευε πρωτευόντως στο PFS θεωρείται ως θετική μελέτη, παρόλη τη παρόμοια απόλυτη βελτίωση στο PFS και OS που παρατηρήθηκαν και στις δύο μελέτες. Και το PFS και η OS σαν καταληκτικοί στόχοι έχουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Τα πλεονεκτήματα του PFS σαν καταληκτικού στόχου περιλαμβάνουν πρωϊμότερη εκτίμηση του οφέλους συγκριτικά με την OS και ότι δεν επηρεάζεται από επόμενες γραμμές θεραπειών. Η πρόοδος της νόσου συχνά σχετίζεται με την επιδείνωση των συμπτωμάτων του ασθενούς και υποβάθμιση της ποιότητας ζωής. Το δυνητικό μειονέκτημα του PFS είναι ότι μια μέτρια διαφορά στο PFS μπορεί να μην αντιστοιχεί σε βελτίωση της ποιότητας ζωής ή να οδηγήσει σε καλύτερη OS. Η χρήση της OS σαν καταληκτικού στόχου θεωρείται σαν περισσότερο καθοριστική. Όμως, μπορεί να υπάρχει σημαντική διαφορετικότητα στις διαθέσιμες επόμενες

θεραπείες, τους τρόπους άσκησης της ογκολογίας και θεραπείες σαν το erlotinib και gefitinib μπορεί να έχουν διαφορετικές επιπτώσεις στη πορεία της νόσου ανάλογα με τη γεωγραφική περιοχή. Έτσι, στην εποχή των πολλαπλών γραμμών θεραπείας, η OS σαν καταληκτικός στόχος δεν είναι τόσο απόλυτος όπως στο παρελθόν. Μία εκτίμηση της ποιότητας ζωής μπορεί να δώσει πρόσθετες πληροφορίες για να υποστηρίξει ένα προσδοκόμενο κλινικό όφελος.

Θεραπεία συντήρησης

Αυτή τη στιγμή υπάρχουν τέσσερις θετικές αναφορές για χορήγηση θεραπείας συντήρησης και αφορούν το bevacizumab, το cetuximab, τη remetrexed και το erlotinib.

Δύο μελέτες φάσης III που εξέτασαν τη προσθήκη bevacizumab ή cetuximab σε πλατινούχο Χ/Θ έδειξαν μια βελτίωση στην OS (**Sandler et al., 2006, Pirker et al., 2009**)

Μία δεύτερη μελέτη φάσης III με bevacizumab (AVAIL) αποκάλυψε βελτίωση στο PFS αλλά όχι στην OS (**Reck et al., 2009**) και μία δεύτερη φάσης III μελέτη με το cetuximab έδειξε βελτίωση στο PFS αλλά όχι στην OS (**Lynch et al., 2007**). Και στις τέσσερις μελέτες ο βιολογικά στοχεύων παράγοντας συνεχιζόταν και μετά την ολοκλήρωση της θεραπείας εφόδου με το συνδυασμό Χ/Θ βιολογικού παράγοντα. Η υπόθεση ήταν ότι η συνεχής χορήγησή του θα καθυστερήσει την εξέλιξη της νόσου και θα βελτιώσει την επιβίωση, επιπλέον δε θα ήταν καλά ανεκτός. Η μελέτη της

ECOG 4599 (**Sandler et al., 2006**) έδειξε μία βελτίωση στην OS με τη προσθήκη του bevacizumab στη carboplatin και paclitaxel. Από τους 407 ασθενείς που έλαβαν το συνδυασμό 215 (53%) συνέχισαν με bevacizumab και από αυτούς 107 (50%) το έλαβαν για περισσότερο από πέντε κύκλους θεραπείας.

Στη μελέτη FLEX η προσθήκη του cetuximab στη cisplatin και vinorelbine βελτίωσε οριακά αλλά στατιστικά σημαντικά την OS: 241 από τους 548 ασθενείς δεν επιδεινώθηκαν και ήταν κατάλληλοι για θεραπεία συντήρησης και 80% από αυτούς έλαβαν cetuximab σαν μονοθεραπεία (**Pirker et al., 2009**). Η διάμεση διάρκεια θεραπείας ήταν 18 μήνες. Τα στοιχεία από αυτές τις μελέτες δείχνουν ότι μία τέτοια προσέγγιση είναι εφικτή, αλλά δεν παρέχουν στοιχεία για το αυξημένο όφελος από τη συνεχιζόμενη χορήγηση του στοχευτικού παράγοντα πέραν της ολοκλήρωσης της αρχικής θεραπείας. Η μονοθεραπεία με bevacizumab και cetuximab έχει μικρή δραστηριότητα στον ΜΜΚΠ (**Hanna et al., 2006, Johnson et al., 2004**) ενώ υπάρχουν αρκετοί ενδοιασμοί για τις οξείες και δυνητικά αθροιστικές τοξικότητες καθώς και για το οικονομικό κόστος, ώστε να αμφισβητείται μια παρόμοια πρακτική. Για την ορθή εκτίμηση του κινδύνου και του οφέλους από τη χορήγηση cetuximab ή bevacizumab σαν θεραπεία συντήρησης απαιτούνται καλά σχεδιασμένες μελέτες φάσης III που θα εξετάσουν αυτό το κλινικό ερώτημα. Μέχρι τότε, η τρέχουσα κλινική πρακτική υποδηλώνει τη συνέχιση χορήγησης bevacizumab μέχρι προόδου νόσου ή μη αποδεκτής τοξικότητας βασισμένη στο παράδειγμα

της θεραπείας της ECOG 4594. Ανάλογη πρακτική θα μπορούσε να εφαρμοσθεί και για το Cetuximab εφόσον εγκριθεί η χορήγηση του από τις ρυθμιστικές αρχές .

Η remetrexed είναι η πρώτη θεραπεία συντήρησης για το πλακώδες ΜΜΚΠ που εγκρίθηκε τον Ιούλιο του 2009 από το FDA. Σε μελέτη φάσης III που παρουσιάστηκε στο ASCO 2009 (**Belani et al., 2009**), οι ασθενείς με ΜΜΚΠ, που δεν επιδεινώθηκαν με την ολοκλήρωση τεσσάρων κύκλων της αρχικής πλατινούχου Χ/Θ, έλαβαν σαν θεραπεία συντήρησης είτε remetrexed (n=441), είτε placebo (n=222) μαζί με τη βέλτιστη υποστηρικτική αγωγή. Για όλους τους ασθενείς, η ομάδα της remetrexed είχε OS 13.4 μήνες συγκρινόμενη με τους 10.6 μήνες της ομάδας placebo. Για την υποομάδα όμως του μη-πλακώδους ΜΜΚΠ η OS ήταν 15.5 μήνες και 10.3 μήνες αντίστοιχα. Η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική (p=0.002).

Η μελέτη δεν ήταν σχεδιασμένη για να συγκρίνει το όφελος της θεραπείας συντήρησης συγκριτικά με την όψιμη έναρξη remetrexed στη χρονική στιγμή της προόδου νόσου. Μόνο 19 ασθενείς που τυχαιοποιήθηκαν στο σκέλος του placebo έλαβαν remetrexed σαν 2^{ης} γραμμής θεραπεία, κυρίως γιατί το φάρμακο δεν ήταν διαθέσιμο σε όλα τα κέντρα που συμμετείχαν στη μελέτη. Έτσι ναι μεν το φάρμακο βελτιώνει την επιβίωση, αλλά δεν γνωρίζουμε αν πρέπει να χορηγείται πρώιμα ή όψιμα.

Στο 13^ο Παγκόσμιο Συνέδριο του ΚΠ που έγινε τον Αύγουστο του 2009, ανακοινώθηκαν τα αποτελέσματα της μελέτης φάσης III SATURN (**Cappuzzo et al., 2009**), που έδειξαν ότι το erlotinib βελτιώνει στατιστικά σημαντικά την επιβίωση στο ΜΜΚΠ σαν θεραπεία συντήρησης. Η μελέτη περιέλαβε 889 ασθενείς που δεν είχαν παρουσιάσει πρόοδο νόσου μετά από τέσσερεις κύκλους πλατινούχου Χ/Θ. Η συντήρηση με erlotinib οδήγησε στην ελάττωση του κινδύνου υποτροπής κατά 41% συγκριτικά με το placebo (HR:0.71, $p < 0.0001$). Όλοι οι ασθενείς ανεξαρτήτως του ιστολογικού τύπου, του καπνίσματος ή του φύλου είχαν όφελος στην επιβίωση. Επιπλέον, οι ασθενείς με μεταλλαγμένο EGFR είχαν ακόμη μεγαλύτερο όφελος σε σχέση με τους ασθενείς wild-type EGFR (HR, 0.10 vs. 0.78, $p < 0.0001$ vs. $P < 0.0185$, αντίστοιχα).

Στη μελέτη ATLAS που ανακοινώθηκε στο ASCO 2009 (**Miller et al., 2009**) ελέγχθηκε ο συνδυασμός erlotinib και bevacizumab σαν θεραπεία συντήρησης μετά την ολοκλήρωση τεσσάρων κύκλων Χ/Θ (πλατινούχοι συνδυασμοί) με bevacizumab. Αυτοί που δεν επιδεινώθηκαν τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν bevacizumab μόνο ή τον συνδυασμό erlotinib με bevacizumab. Τα αποτελέσματα έδειξαν μία στατιστικά σημαντική αύξηση στο διάμεσο PFS, από 3.7 μήνες για το bevacizumab μόνον στους 4.8 μήνες για τον συνδυασμό (HR:0.722, $p = 0.0012$). Περισσότερο ενδιαφέρον κλινικά ήταν η παρατήρηση ότι το PFS στους 3 μήνες ήταν 67.7% για τον συνδυασμό έναντι 53.4% για την μονοθεραπεία και στους 6 μήνες αντίστοιχα ήταν 40.3% vs. 28.4%.

ε. ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟΙ ΥΠΟΤΥΠΟΙ ΤΟΥ ΚΠ - ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ

Μέχρι τώρα σαν προγνωστικοί παράγοντες στον ΜΜΚΠ ήταν γνωστοί το στάδιο της νόσου, η κατάσταση του ασθενούς (performance status), ο βαθμός απώλειας βάρους και το φύλο, ενώ η επιλογή της θεραπείας στηριζόταν στη κλινική εικόνα. Όμως, γίνονται καθημερινά σημαντικές πρόοδοι στη βιολογία του ΜΜΚΠ, που τελικά θα οδηγήσουν στην εξατομικευμένη θεραπεία βασισμένη περισσότερο στα μοριακά χαρακτηριστικά του όγκου του και λιγότερο στα κλινικά.

Ιστορικά, ο ιστολογικός υπότυπος δεν έδινε προγνωστικές πληροφορίες στο ΜΜΚΠ (**Azzoli et al., 2009, Socinski et al., 2003, ASCO, 1997**). Αν και περιγραφόταν στις μελέτες, αναλύσεις που να ερευνούσαν τη δυνητική συσχέτιση μεταξύ ιστολογίας και αποτελεσματικότητας θεραπείας δεν είχαν αναφερθεί. Η πρώτη αναφορά του ιστολογικού υπότυπου του ΜΜΚΠ ως κύριο προγνωστικό παράγοντα της απόκριση στην Χ/Θ, έγινε το 2001 σε μια προοπτική, τυχαιοποιημένη, πολυκεντρική μελέτη που σύγκρινε δύο Χ/Θ σχήματα (**Georgoulas et al., 2001**).

Επιπροσθέτως, πρόσφατα στοιχεία από δύο μεγάλες, τυχαιοποιημένες μελέτες φάσης III, έδωσαν νέο ενδιαφέρον στην επίδραση του ιστολογικού υπότυπου του ΜΜΚΠ στη δραστηριότητα της

X/Θ. Μία αναδρομική ανάλυση (**Hanna et al., 2004**) της μελέτης που συνέκρινε σαν X/Θ 2^{ης} γραμμής την remetrexed με docetaxel στο MMΚΠ και μία προοπτική προκαθορισμένη ανάλυση της μελέτης σύγκρισης X/Θ 1^{ης} γραμμής remetrexed και cisplatin με gemcitabine και cisplatin (**Scagliotti et al., 2008**) προσδιόρισε μία στατιστικά σημαντική αυξημένη επιβίωση στους ασθενείς με μη-πλακώδες καρκίνωμα που έλαβαν remetrexed και αντίστοιχα μικρότερη για τα πλακώδη καρκινώματα. Επιπλέον, μία τρίτη τυχαioποιημένη μελέτη που συνέκρινε δύο δόσεις remetrexed στη 2^η και 3^η γραμμή X/Θ στο MMΚΠ έδειξε επίσης ότι η δραστικότητα εξαρτιόταν από τον ιστολογικό τύπο (**Okabe et al., 2007**).

Πιο συγκεκριμένα, στη μελέτη των Scagliotti et al (**Scagliotti et al., 2008**), 1725 ασθενείς (η μεγαλύτερη μελέτη που έγινε μέχρι σήμερα στην 1η γραμμή του MMΚΠ) τυχαioποιήθηκαν στα δύο σκέλη, τα οποία αποδείχθηκαν ισοδύναμα στο PFS, OS, RR με το σκέλος cisplatin και remetrexed να είναι λιγότερο τοξικό. Εκείνο όμως που ήταν πολύ ενδιαφέρον ήταν ότι σε προκαθορισμένη ανάλυση για επιβίωση σε σχέση με τον ιστολογικό τύπο, οι ασθενείς που έλαβαν τον ανωτέρω συνδυασμό και είχαν αδενοκαρκίνωμα βελτίωσαν την επιβίωσή τους (12.6 vs 10.9 μήνες αντίστοιχα, HR:0.84, p=0.03). Αντίθετα, το αντίστροφο συνέβη στους ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα που ωφελήθηκαν περισσότερο από τον συνδυασμό cisplatin και gemcitabine (10.8 vs 9.4 μήνες, αντίστοιχα, HR:1.23, p=0.05). Ένα ενδιαφέρον ακόμα εύρημα από τη μελέτη ήταν η σχέση του καπνίσματος με την επιβίωση. Η διάμεση

επιβίωση για τους μη-καπνιστές ήταν 15,6 μήνες συγκρινόμενη με τους 10.2 μήνες για πρώην ή νυν καπνιστές.

Για την ερμηνεία του αποτελέσματος αυτού οι συγγραφείς πρότειναν ένα μοριακό μηχανισμό που συσχετίζει τα επίπεδα έκφρασης της θυμιδικής συνθετάσης (thymidylate synthase, TS) με τους ιστολογικούς τύπους του ΜΜΚΠ. Η βασική έκφραση του γονιδίου της TS είναι σημαντικά υψηλότερη στο πλακώδες καρκίνωμα σε σχέση με το αδενοκαρκίνωμα. Τα προκλινικά δεδομένα δείχνουν ότι υπάρχει ελαττωμένη δραστηριότητα της remetrexed όταν υπάρχει υψηλή έκφραση TS (**Sigmond et al., 2003, Giovannetti et al., 2005**). Στη μελέτη των Ceppi et al (**Ceppi et al., 2006**) σε ασθενείς που δεν είχαν λάβει Χ/Θ η βασική έκφραση του γονιδίου της TS και της πρωτεΐνης του ήταν σημαντικά υψηλότερη στο πλακώδες καρκίνωμα παρά στο αδενοκαρκίνωμα ($p < 0.0001$). Επιπρόσθετα, οι TS και SKp2 (S phase kinase-associated protein) ρυθμίζονται μεταγραφικά στην S φάση του κυτταρικού κύκλου από τον μεταγραφικό παράγοντα E2F-1 (**Huang et al., 2007, Sowers et al., 2003**). Όπως και η TS, αυξημένη έκφραση της SKp2 ανευρίσκεται συχνότερα στο πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα απ' ότι στο αδενοκαρκίνωμα (**Salon et al., 2007**). Οι συγγραφείς δηλώνουν ότι έχουν ήδη συλλεχθεί τα blocks βιοψιών για προσδιορισμό βιοδεικτών. Θα έχει ενδιαφέρον η ανάλυσή τους ενδεχομένως μαζί με τον προσδιορισμό της RRM1 (Ribonucleotide Reductase Subunit M1), που είναι ο κυρίαρχος παράγοντας της δραστηριότητας της gemcitabine (**Zheng et al., 2007**), στο

αν υπάρχει διαφορά στην έκφραση των επιπέδων της ανάλογα με τον ιστολογικό τύπο που να δικαιολογεί τα καλύτερα αποτελέσματα της gemcitabine στο πλακώδες καρκίνωμα και τα κατώτερα στο αδενοκαρκίνωμα.

Επτά άλλες μελέτες έχουν συσχετίσει, μέσω συγκριτικής ανάλυσης, τον ιστολογικό τύπο με τη πρόβλεψη της δραστικότητας διαφόρων χημειοθεραπευτικών συνδυασμών με στατιστικά σημαντική απόδειξη (Ardizzoni et al., 2007, Rudd et al., 2005, Cellerino et al., 1991, Veronesi et al., 1988, Kim et al., 2002, Huang et al., 2007, Georgoulas et al., 2001). Οι τέσσερις συγκρίνουν δύο χημειοθεραπευτικά σχήματα (Ardizzoni et al., 2007, Rudd et al., 2005, Veronesi et al., 1988, Georgoulas et al., 2001), η μία συνδυασμό Χ/Θ και βέλτιστης υποστηρικτικής αγωγής (Cellerino et al., 1991) και οι άλλες δύο εξετάζουν τον προβλεπτικό ρόλο της ιστολογίας στην εισαγωγική θεραπεία ακολουθούμενη από σύγχρονη Α/Θ και Χ/Θ (Kim et al., 2002, Huang et al., 2007).

Η πρώτη (Ardizzoni et al., 2007) είναι μια μετα-ανάλυση από 9 τυχαιοποιημένες κλινικές μελέτες (n=2968) που συγκρίνει σχήματα με βάση τη cisplatin vs carboplatin. Αυτή βρήκε ότι τα σχήματα που περιέχουν carboplatin έχουν λιγότερες πιθανότητες ανταπόκρισης και αυξημένο κίνδυνο θνησιμότητας για ασθενείς με μη-πλακώδες καρκίνωμα. Τα στατιστικά σημαντικά tests αλληλεπίδρασης ιστολογίας-θεραπείας (interaction test $p=0.046$ για ανταπόκριση) επιβεβαίωσαν τον

προβλεπτικό ρόλο της ιστολογίας στην επιβίωση και ανταπόκριση του όγκου.

Οι Rudd et al (**Rudd et al., 2005**), συγκρίνοντας δύο πλατινούχα σχήματα, βρήκαν ότι ο ιστολογικός τύπος που χαρακτηριζόταν ως «έτερος» (όγκοι, που δεν ήταν ούτε αδενοκαρκίνωμα ούτε πλακώδες καρκίνωμα), και πιθανά το αδενοκαρκίνωμα, μπορεί να είναι προβλεπτικός παράγοντας μακρότερης επιβίωσης για τον συνδυασμό carboplatin + gemcitabine έναντι cisplatin, mitomycin, ifosfamide (interaction test $p=0.10$).

Στη μελέτη των Georgoulis et al (**Georgoulis et al., 2001**), ο ιστολογικός τύπος ήταν προβλεπτικός για δύο θεραπευτικά σχήματα: ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα είχαν σημαντικά καλύτερες ανταποκρίσεις με gemcitabine + docetaxel, ενώ οι ασθενείς με μη-αδενοκαρκίνωμα με cisplatin + docetaxel με στατιστικά σημαντικό test αλληλεπίδρασης θεραπείας και ιστολογίας για ανταπόκριση του όγκου (δεν αναφέρεται). Αν και, ο ιστολογικός τύπος ήταν προβλεπτικός της απάντησης, πρόσθετες αναλύσεις κατέληξαν ότι δεν είναι προβλεπτικός της επιβίωσης ή του PFS.

Μία αναδρομική ανάλυση από τη μελέτη των Cellerino et al (**Cellerino et al., 1991**) βρήκε ότι τα μη-πλακώδη καρκινώματα είναι προβλεπτικός παράγοντας μακρότερης επιβίωσης στους ασθενείς που λαμβάνουν Χ/Θ έναντι βέλτιστης υποστηρικτικής αγωγής. Αντίθετα, οι ασθενείς με πλακώδη καρκινώματα έχουν την ίδια διάμεση επιβίωση και στα δύο σκέλη. Το συμπέρασμα αυτό μάλλον κρίνεται ως υπερβολικό

λόγω του μικρού μεγέθους της μελέτης και της έλλειψης επίσημου test αλληλεπίδρασης ιστολογίας – θεραπειάς. Οι Veronesi et al (**Veronesi et al., 1988**) σε παλαιότερη μελέτη αναφέρουν ότι οι ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα διπλασίασαν τις ανταποκρίσεις με το σχήμα cisplatin + etoposide συγκρινόμενο με τον συνδυασμό τεσσάρων φαρμάκων (44.7% vs 21.6%), ενώ οι ασθενείς με αδenoκαρκίνωμα είχαν ταυτόσημες ανταποκρίσεις και στα δύο σκέλη (23.5% vs 27.3%), το test της συσχέτισης μεταξύ θεραπείας και απάντησης, προσαρμοσμένο στον ιστολογικό τύπο, να έχει μία τιμή $p=0.08$.

Στις δύο μελέτες εισαγωγικής Χ/Θ πριν την Α/Θ + Χ/Θ (**Kim et al., 2002, Huang et al., 2007**) η επιβίωση ήταν μακρότερη στο μη-πλακώδες καρκίνωμα. Αντίθετα, οι ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα δεν είχαν όφελος από την εισαγωγική Χ/Θ (test αλληλεπίδρασης δεν αναφέρθηκε).

Έντεκα ακόμη μελέτες μονοθεραπείας ή προερχόμενες από συγκεντρωμένες ομάδες πληθυσμού (pooled population) έχουν προσδιορίσει μία συσχέτιση μεταξύ ιστολογικού τύπου και κλινικής έκβασης σε προχωρημένο ΜΜΚΠ (**Charloux et al.,1997, Martins & Pereira,1999, Itaya et al., 2007, Shinkai et al.,1992, Finkelstein et al.,1986 Ceresoli et al., 2004, LeCaer et al., 2007, Weiss et al., 2007, Fukuoka et al., 1991, Rapp et al., 1988, Saynak et al., 2005**). Σε αυτές, ο σχεδιασμός της μελέτης ή ο τύπος της ανάλυσης δεν επιτρέπουν τη ξεκάθαρη διάκριση μεταξύ προγνωστικής και προβλεπτικής συσχέτισης. Σε κάποιες δε, ο ιστολογικός τύπος μπορεί να παίξει και τους δύο ρόλους.

Όμως ο σταθερότερος σύνδεσμος μεταξύ ιστολογίας και κλινικής έκβασης έχει βρεθεί για τους αναστολείς τυροσινικής κινάσης του EGFR (**Chang et al., 2006, Kaneda et al., 2004, Fukuoka et al., 2003, Park et al., 2004, Jänne et al., 2004, Kim et al., 2005, Lin et al., 2006, Yang et al., 2006, Cappuzzo et al., 2005, Kris et al., 2003, Miller et al., 2004, Thatcher et al., 2005, Shepherd et al., 2005, Johnson et al., 2005**) σε 14 δημοσιεύσεις. Οι πρώτες 11 μελέτες δείχνουν ότι το αδενοκαρκίνωμα συνδέεται με καλύτερες ανταποκρίσεις, έλεγχο νόσου, PFS και επιβίωση, ενώ το πλακώδες καρκίνωμα ή ασθενείς με μη-αδενοκαρκίνωμα όχι. Σε μία μελέτη (**Miller et al., 2004**) το βρογχοκυψελιδικό καρκίνωμα (BAC) εξετάστηκε ξεχωριστά και συνδέθηκε με στατιστικά αυξημένες ανταποκρίσεις απ' ότι άλλοι υπότυποι του αδενοκαρκινώματος. Σε όλες αυτές, οι ασθενείς έλαβαν gefitinib. Επειδή όμως και στις 11 μελέτες έλειπε ένα συγκριτικό σκέλος με μη-gefitinib θεραπεία, δεν μπορεί να εκτιμηθεί η προβλεπτική σχέση.

Οι Thatcher et al (**Thatcher et al., 2005**) ανέφεραν επίσης ότι το αδενοκαρκίνωμα μπορεί να είναι προβλεπτικός παράγοντας απάντησης στο gefitinib. Αυτή η μεγάλη προοπτική τυχαιοποιημένη (n=1692) μελέτη συνέκρινε gefitinib με placebo. Αν και οι διαφορές στην επιβίωση μεταξύ των δύο σκελών δεν έφθασαν στα όρια της στατιστικής σημαντικότητας στο πρωτεύον log-rank test, είτε στο συνολικό πληθυσμό, είτε στο αδενοκαρκίνωμα μόνο, μία προοπτικά καθορισμένη Cox regression ανάλυση αποδείχθηκε σημαντική υπέρ του gefitinib και στο συνολικό

πληθυσμό ($p=0.03$) και στο αδενοκαρκίνωμα ($p=0.033$). Περαιτέρω, μία ανάλυση υποομάδων έδειξε υψηλότερες ανταποκρίσεις με το gefitinib versus placebo στους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα έναντι του πλακώδους καρκινώματος. Οι αναλύσεις αυτές δείχνουν ότι υπάρχει σαφώς μία θετική επίδραση της θεραπείας περισσότερο στο αδενοκαρκίνωμα απ' ό τι στο μη-αδενικό, όμως και εδώ ένα επίσημο test αλληλεπίδρασης θεραπείας-υπότυπου δεν αναφέρθηκε.

Οι άλλες δύο δημοσιεύσεις (**Shepherd et al., 2005, Johnson et al., 2005**) είναι αναλύσεις από τη μελέτη φάσης III του erlotinib versus placebo σαν θεραπεία 2^{ης} γραμμής. Στην αρχική ανάλυση (**Shepherd et al., 2005**), το αδενοκαρκίνωμα συσχετίσθηκε με καλύτερες απαντήσεις και επιβίωση είτε οι ασθενείς έλαβαν erlotinib είτε placebo. Σε μονοπαραγοντική ανάλυση της ίδιας μελέτης, οι Johnson et al (**Johnson et al., 2005**) έδειξαν ότι τόσο το πλακώδες καρκίνωμα όσο και το αδενοκαρκίνωμα μπορούν να προβλέψουν ανώτερη επιβίωση στο σκέλος του erlotinib, όμως πάλι ένα επίσημο test αλληλεπίδρασης θεραπείας-υπότυπου λείπει. Να σημειώσουμε ότι η ανάλυση στην αρχική μελέτη κατηγοριοποίησε τους ιστολογικούς υπότυπους σαν αδενοκαρκίνωμα και μη, ενώ η δεύτερη ανάλυση τους διέκρινε σαν αδενοκαρκίνωμα, πλακώδες και έτερο. Ίσως σε αυτό να οφείλονται οι διαφορές στα αποτελέσματα.

Η σχέση μεταξύ αδενοκαρκινώματος και ισχυρότερης δραστηριότητας των αναστολέων EGFR δεν ήταν ένα αναμενόμενο

αποτέλεσμα. Μάλλον θα περίμενε κανείς το αντίθετο, γιατί ο EGFR εκφράζεται περισσότερο στο πλακώδες καρκίνωμα (**Hirsch et al., 2003, Riely et al., 2006**). Νεότερα όμως στοιχεία δείχνουν ότι η αποτελεσματικότητα των αναστολέων τυροσινικής κινάσης σχετίζεται με την ικανότητα τους να αναστέλλουν το μονοπάτι μεταγωγής σήματος του EGFR που ενεργοποιείται από μεταλλάξεις στον υποδοχέα της τυροσινικής κινάσης (**Lynch et al., 2004, Paez et al., 2004**) ή ότι συσχετίζεται με αυξημένο αριθμό γονιδιακών αντιγράφων του EGFR (**Cappuzzo et al., 2005**).

Βέβαια, υπάρχουν και πολλές δημοσιεύσεις που δεν βρήκαν κάποια σημαντική σχέση (**Gatzemeier et al., 2007, Comella et al., 2007, Sculier et al., 2007, Pujol et al., 2005, Martoni et al., 2005, Hoang et al., 2005, Stathopoulos et al., 2004, Giaccone et al., 2004, Herbst et al., 2004, Smit et al., 2003, Scagliotti et al., 2002, Billingham & Cullen, 2001, Kosmidis et al., 1996**) ιστολογίας και απάντησης στη θεραπεία. Οι λόγοι μπορεί να είναι: ο σχεδιασμός της μελέτης, ο πληθυσμός της, τα διαφορετικά δημογραφικά χαρακτηριστικά, η εξέλιξη της ιστολογικής ταξινόμησης τα τελευταία χρόνια, η κατηγοριοποίηση κατά τύπους, το είδος του δείγματος (βιοψία ή κυτταρολογική) ή το μικρό δείγμα που δεν έχει τη στατιστική ισχύ να ανιχνεύσει την αλληλεπίδραση θεραπείας-υπότυπου (συνήθως απαιτείται τετραπλάσιος αριθμός ασθενών).

Συμπερασματικά, θα λέγαμε ότι στην εποχή των στοχευουσών θεραπειών και του ραφινάρισματος της ιστολογικής διάκρισης του ΜΜΚΠ,

ολοένα και περισσότερες μελέτες θα περιλαμβάνουν στην ανάλυση τους τη σχέση ιστολογικού υπότυπου και αποτελεσματικότητας της θεραπείας. Η ανάγκη αυτών των αναλύσεων καθίσταται ακόμη μεγαλύτερη με την αύξηση της συχνότητας του αδενοκαρκινώματος ώστε να χρειαζόμαστε επιπλέον θεραπευτικές επιλογές για αυτό το είδος όγκου. Επιπλέον, η ιστολογική διάκριση θα αποφύγει την έκθεση του ασθενούς σε δυνητικές τοξικότητες (π.χ. ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα είναι αυξημένου κινδύνου για αιμορραγικές επιπλοκές από τη χρήση του bevacizumab) και πιθανά στο μέλλον να υπάρχει στις αναλύσεις των μελετών συσχέτιση τοξικότητας και υπότυπου. Ακόμη, στις μελέτες του μέλλοντος, η διαστρωμάτωση θα λαμβάνει υπόψη και τον ιστολογικό υπότυπο, εκτός των άλλων γνωστών προγνωστικών παραγόντων, και θα περιλαμβάνεται επίσης το test αλληλεπίδρασης θεραπείας-υπότυπου. Εκτιμάται ότι η κεντρική εξέταση των δειγμάτων θα πρέπει να είναι προαπαιτούμενο ώστε να μην υπάρχουν διαφορές στη κατηγοριοποίηση (πχ, υπότυποι αδενοκαρκινώματος, μεγαλοκυτταρικοί νευροενδοκρινείς όγκοι θα πρέπει να αναλύονται καλύτερα με τον μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα παρά με τον ΜΜΚΠ).

Παθολογοανατομική ταξινόμηση του αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα

Η ιστολογική υπο-ταξινόμηση του αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα εξελίχθηκε αισθητά μετά την αρχική του, το 1967, από την ΠΟΥ (Πίνακας 1) (Travis et al., 2005).

Πίνακας 1. Ιστορική αναδρομή ταξινόμησης του αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα κατά ΠΟΥ

| 1967 (WHO, 1967) | 1981 (WHO, 1981) | 1999 (Travis et al., 1999) | 2004 (Travis et al., 2004) |
|--|---|---|---|
| Βρογχογενές | Οξύφιλο αδενοκαρκίνωμα | Οξύφιλο | Αδενοκαρκίνωμα με μεικτούς υπότυπους |
| Οξύφιλο (Acinar) | Θηλώδες αδενοκαρκίνωμα | Θηλώδες | Οξύφιλο αδενοκαρκίνωμα |
| Θηλώδες (Papillary) | Βρογχοκυψελιδικό καρκίνωμα | Βρογχοκυψελιδικό καρκίνωμα | Θηλώδες αδενοκαρκίνωμα |
| Βρογχοκυψελιδικό (Bronchiolo-alveolar) | Συμπαγές καρκίνωμα με παραγωγή βλέννης (Solid carcinoma with mucus formation) | Μη βλεννώδες (Nonmucinous) | Βρογχοκυψελιδικό καρκίνωμα |
| | | Βλεννώδες (Mucinous) | Μη βλεννώδες |
| | | Μεικτό βλεννώδες και μη βλεννώδες (Mixed mucinous and nonmucinous) | Βλεννώδες |
| | | Συμπαγές αδενοκαρκίνωμα με βλέννη | Μεικτό, βλεννώδες και μη/ ή απροσδιόριστο |
| | | Αδενοκαρκίνωμα με μεικτούς υπότυπους (Adenocarcinoma with mixed subtypes) | Συμπαγές αδενοκαρκίνωμα με βλέννη |
| | | Ποικιλίες (Variants) | |
| | | Καλά διαφοροποιημένο εμβρυικό αδενοκαρκίνωμα (Well-differentiated fetal adenocarcinoma) | Εμβρυικό αδενοκαρκίνωμα |
| | | Βλεννώδες (κολλοειδές) αδενοκαρκίνωμα (Mucinous (colloid) adenocarcinoma) | Βλεννώδες (κολλοειδές) αδενοκαρκίνωμα |
| | | Βλεννώδες κυσταδενοκαρκίνωμα (Mucinous cystadenocarcinoma) | Βλεννώδες κυσταδενοκαρκίνωμα |
| | | Αδενοκαρκίνωμα δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου (Signet-ring adenocarcinoma) | Αδενοκαρκίνωμα δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου |
| | | Διαυγοκυτταρικό αδενοκαρκίνωμα (Clear-cell adenocarcinoma) | Διαυγοκυτταρικό αδενοκαρκίνωμα |

Οι σημαντικότερες αλλαγές συστήθηκαν το 1999 από την ΠΟΥ και μόνο μικρές τροποποιήσεις προέκυψαν από την αναθεώρηση του 2004. Στη ταξινόμηση του 1999, η κατηγορία του αδενοκαρκινώματος με μεικτούς υπότυπους προστέθηκε στους 4 υπότυπους του 1981. Οι δύο ταξινομήσεις, του 1999 και 2004, αναγνωρίζουν ότι ο μεικτός υπότυπος

είναι ο συχνότερος ιστολογικός τύπος του αδενοκαρκινώματος του πνεύμονα και γι' αυτό το 2004 μετακινήθηκε στη κορυφή της λίστας.

Το βρογχοκυψελιδικό καρκίνωμα (BAC) άλλαξε κυρίως το 1999. Η σημαντικότερη αλλαγή ήταν η απαίτηση να επιδεικνύει καθαρή φολιδωτή (lepidic) ανάπτυξη δίχως διήθηση του στρώματος, αγγείων ή υπεζωκότα. Έτσι, τώρα με τον στενότερο ορισμό του BAC, ο όρος αδενοκαρκίνωμα μεικτού υπότυπου χρησιμοποιείται για όγκους που έχουν BAC και διηθητικά στοιχεία. Τρεις τύποι BAC αναγνωρίζονται: το μη-βλεννώδες, το βλεννώδες και το μεικτό. Το μη-βλεννώδες συντίθεται από ποικιλίες των πνευμοκυττάρων τύπου II και των κυττάρων Clara, χωρίς ιδιαίτερη κλινική σημασία διάκρισης αυτών των δύο κυττάρων.

Μία άλλη σημαντική αλλαγή ήταν η προσθήκη το 1999 και το 2004 της άτυπης αδενωματούδους υπερπλασίας (Atypical adenomatous hyperplasia) σαν προδιηθητική βλάβη για το αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα. Μοιάζει, αλλά δεν πληροί, τα κριτήρια του BAC. Αποτελείται από εντοπισμένο, ήπιο ή μέτριο πολλαπλασιασμό των άτυπων πνευμοκυττάρων, χωρίς να ξεπερνά τα 5mm.

Μία ένδειξη ότι ο αναθεωρημένος ορισμός του BAC θα έχει κλινική εφαρμογή είναι τα πρόσφατα στοιχεία από τους Zell et al (Zell et al., 2005), οι οποίοι βασιζόμενοι στα επιδημιολογικά δεδομένα από τρεις κομητείες της Νοτίου Καλιφόρνιας από το 1995 έως το 2003, έδειξαν ότι η διάμεση ολική επιβίωση των ασθενών με BAC που διαγνώστηκαν μετά τον Μάρτιο του 1999 ήταν >53 μήνες, σημαντικά καλύτερη, συγκρινόμενη

με αυτήν των 32 μηνών, $p=0.012$, των ασθενών που διαγνώστηκαν με BAC πριν τον Μάρτιο του 1999.

Μοριακά χαρακτηριστικά του αδενοκαρκινώματος

Λόγω του ότι το αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα έχει εξελιχθεί στον συχνότερο τύπο του ΜΜΚΠ και από αυτό, το αδενοκαρκίνωμα μεικτού υπότυπου με BAC στοιχεία η συχνότερη μορφή του, θα ήταν ενδιαφέρον να ανατρέξουμε στη βιβλιογραφία για την ανάδειξη των μοριακών αλλαγών που συμβαίνουν στη καρκινογένεση του περιφερικού αδενοκαρκινώματος, που ξεκινά από την άτυπη αδενωματώδη υπερπλασία, περνά στο BAC και κατόπιν γίνεται διηθητικό και έχουν εφαρμογές στη θεραπευτική τους.

Η κλινική και ιστολογική ετερογένεια του BAC δείχνει ότι υπάρχουν πολλαπλά μονοπάτια γενετικών διαταραχών που μπορεί να οδηγήσουν από την ατυπία στο διηθητικό αδενοκαρκίνωμα. Τα περιστασιακά ευρήματα της άτυπης αδενωματώδους υπερπλασίας, BAC και αδενοκαρκινώματος σε ένα δείγμα καρκίνου του πνεύμονα μας αναγκάζουν να σκεφτούμε ότι ακόμη και μέσα σε ένα μόνον όγκο, ετερογενή μοριακά γεγονότα συμβαίνουν κατά την εξέλιξη της νεοπλασίας, πιθανά προερχόμενα από τον κλωνικό πολλαπλασιασμό αρχέγονων κυττάρων του καρκίνου του πνεύμονα (stem cells). Πρόσφατα (**Kim et al., 2005**), ερευνητική ομάδα περιέγραψε βρογχοκυψελιδικά αρχέγονα κύτταρα στη βρογχοκυψελιδική συμβολή, ικανά να φτιάξουν

τόσο τελικό βρογχικό επιθήλιο ή κύτταρα Clara, όσο και κυψελιδικά πνευμονοκύτταρα τύπου II. Ενεργοποίηση του K-ras σε μοντέλο ποντικού οδήγησε στον πολλαπλασιασμό τους και διαφοροποίηση προς τη κυψελιδική σειρά. Ο πολλαπλασιασμός των αρχέγονων κυττάρων βρέθηκε και κατά μήκος της άτυπης αδενωμάτωσης υπερπλασίας και αδενώματος και BAC. Αυτά τα στοιχεία προτείνουν ότι η καρκινογένεση στον πνεύμονα αρχίζει από τη μετατροπή των αρχέγονων κυττάρων και η διαφοροποίηση τους εξαρτάται από τη προεξάρχουσα μετάλλαξη ή ομάδα μεταλλάξεων που δημιουργούν το περιβάλλον του όγκου (tumor milieu).

Στην Ιαπωνία υπάρχει μία μακρά παράδοση στην έρευνα των αδενοκαρκινωμάτων λόγω της αυξημένης συχνότητάς τους. Οι Nogushi et al (Nogushi et al., 1995) ανέπτυξαν μία ανεξάρτητη ταξινόμηση για τα μικρά περιφερικά αδενοκαρκινώματα (<2cm) που αποτελείται από έξι υπότυπους (Πίνακας 2).

Πίνακας 2. Noguchi's ιστολογική κατάταξη των μικρών αδενοκαρκινωμάτων του πνεύμονα κάτω από 2cm

| Τύπος | Περιγραφή |
|--------------|--|
| A | Εντοπισμένο βρογχολυψελιδικό καρκίνωμα |
| B | Εντοπισμένο βρογχολυψελιδικό καρκίνωμα με κατά τόπους καταστροφή της κυψελιδικής δομής |
| C | Εντοπισμένο βρογχολυψελιδικό καρκίνωμα με εστίες ενεργού ινοβλαστικού πολλαπλασιασμού |
| D | Πτωχά διαφοροποιημένο αδενοκαρκίνωμα |
| E | Σωληνώδες αδενοκαρκίνωμα |
| F | Θηλώδες αδενοκαρκίνωμα με συμπίεστική και καταστροφική ανάπτυξη |

Στους A και B τύπους δεν ανευρίσκονται λεμφαδενικές μεταστάσεις και έχουν 100% πενταετή επιβίωση, αν είναι κάτω από 2cm και αφαιρεθούν πλήρως. Σε 28% του τύπου C υπάρχουν λεμφαδενικές μεταστάσεις και η 5-ετής επιβίωση ήταν 74.8%, ενώ του διηθητικού αδενοκαρκινώματος 52%. Για πρακτικούς λόγους θα θεωρήσουμε ότι οι τύποι A και B κατά Nogushi αντιστοιχούν στο BAC της ΠΟΥ και ο τύπος C είναι ισοδύναμος του μεικτού υπότυπου με προεξάρχον στοιχείο το BAC. Όσο ανεβαίνει ο υπότυπος, τόσο αυξάνουν και οι μοριακές αλλαγές που επισυμβαίνουν. Αυτές περιλαμβάνουν κυρίως τις μεταλλάξεις στη θέση της τυροσινικής κινάσης του EGFR, ενίσχυση του γονιδίου του EGFR, ενεργοποιημένες μεταλλάξεις του KRAS γονιδίου, μεταλλάξεις του γονιδίου p53 ή υπερέκφραση της πρωτεΐνης του (Πίνακας 3).

Πίνακας 3. Βιολογικές ιδιότητες στην άτυπη αδενωματώδη υπερπλασία, καθαρό βρογχοκυψελιδικό καρκίνωμα, αδενοκαρκίνωμα με βρογχοκυψελιδικά στοιχεία και αδενοκαρκίνωμα (Wislez et al., 2006, Soh et al., 2008)

| | Άτυπη αδενωματώδη υπερπλασία | Βρογχοκυψελιδικό καρκίνωμα | Αδενοκαρκίνωμα με βρογχοκυψελιδικά στοιχεία | Αδενοκαρκίνωμα |
|--|------------------------------|----------------------------|---|----------------|
| Μεταλλάξεις EGFR | <5% | 10% | 50% | 50% |
| Μεταλλάξεις TP53 | Δεν αναφέρθηκαν | 0% | 10% | 50% |
| Υπερέκφραση P53 ανοσοϊστοχημικά | 8% | 5-15% | 30% | 50% |
| Αυξημένος αριθμός αντιγράφων EGFR – FISH | 0% | 8% | 32% | 32% |
| Μεταλλάξεις KRAS | 40% | 10% | 10% | 42% |

Οι σημαντικότερες μεταλλάξεις στην άτυπη αδενωματώδη υπερπλασία είναι οι μεταλλάξεις στο KRAS (κωδικόνιο 12) (40%), p53 (10-60%), υπερέκφραση της cyclin D1 (70%) και survinin (50%), απώλεια της λειτουργίας της LKB1 (20%), απώλειες αλληλίων στα χρωμοσώματα 3p (20%), 9q (50%), 9p (10%), ενώ είναι σχετικά ασυνήθεις οι μεταλλάξεις του EGFR (**Westra, 2000, Ghaffar et al., 2003, Kitaguchi et al., 1998, Takamochi et al., 2001, Tominaga et al., 2003, Nakanishi et al., 2003, Yoshida et al, 2005, Yatabe et al., 2005**).

Οι Tang et al (**Tang et al., 2005**) δημοσίευσαν πρόσφατα ότι οι μεταλλάξεις του EGFR είναι ένα πρώιμο συμβάν στη παθογένεση του καρκίνου του πνεύμονα, με το να τις ανιχνεύσουν στο φυσιολογικό επιθήλιο των μικρών βρόγχων και βρογχιολίων σε επαφή με μεταλλαγμένο EGFR αδenoκαρκίνωμα σε 43% των ασθενών που εξετάστηκαν και σε κανέναν από αυτούς με μη-μεταλλαγμένο όγκο.

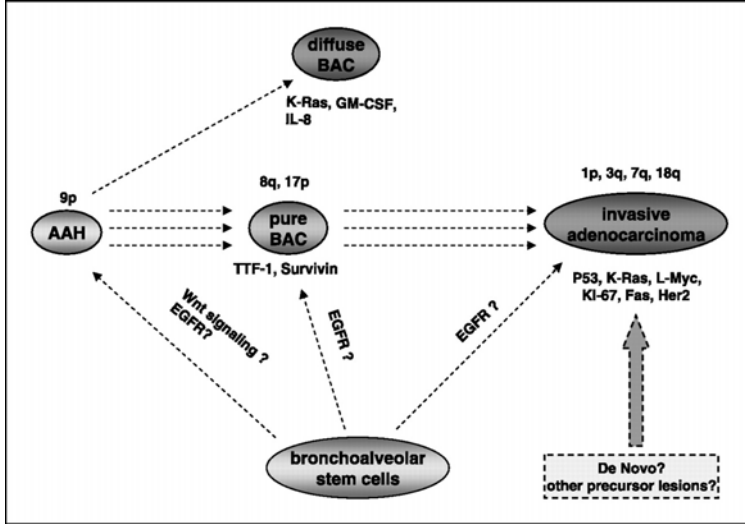
Σε μία μελέτη με 860 καρκίνους του πνεύμονα, οι Marchetti et al (**Marchetti et al., 2005**), έδειξαν ότι κανένα από τα βλεννώδη BAC δεν είχε μετάλλαξη στο EGFR συγκρινόμενα με το 32% των μη-βλεννωδών όγκων και το 57% των μη-καπνιστών με βιοψία BAC. Είναι ενδιαφέρον ότι οι μεταλλάξεις του K-ras είναι αποκλειστικά αμοιβαίες με αυτές του EGFR. Οι μεταλλάξεις του K-ras είναι συχνότερες στα βλεννώδη BAC (76%) παρά στα μη-βλεννώδη (14%), με κανένα όγκο μεταλλαγμένο για το EGFR να έχει και μετάλλαξη του K-ras. Αναμενόμενο δε ήταν οι μεταλλάξεις του K-ras να είναι συχνότερες στους μη-απαντητές με

αναστολείς TKI του EGFR (**Pao et al., 2005**). Δεν είναι ξεκάθαρη η αιτία γι' αυτό το εύρημα. Οι μεταλλάξεις του K-ras σχετίζονται στενά με το κάπνισμα, ενώ οι μεταλλάξεις του EGFR συνδέονται με το μη-κάπνισμα. Είναι πιθανό ότι η σχέση των μεταλλάξεων EGFR και K-ras δεν είναι ανεξάρτητη, αλλά επηρεάζεται από το κάπνισμα. Εναλλακτικά, μπορούν οι ανωτέρω μεταλλάξεις ανεξάρτητα η καθεμιά τους να οδηγούν τη καρκινογένεση σε παρόμοιους λειτουργικούς δρόμους, κάνοντας απίθανο οι όγκοι να έχουν και τις δύο. Προοπτικές μελέτες που ελέγχουν την ανταπόκριση σε EGFR-TKIs ανάλογα με το sequencing EGFR και K-ras είναι σε εξέλιξη και θα διαφωτίσουν περισσότερο αυτό το εύρημα.

Μία πρόσφατη μελέτη (**Soh et al., 2008**) δείχνει ότι αυξημένος αριθμός αντιγράφων του γονιδίου EGFR φαίνεται να είναι ένα συμβάν στην εξέλιξη της καρκινογένεσης ανεξάρτητο από τις αρχικές βλάβες, καθώς απαντάται τέσσερες φορές συχνότερα στους διηθητικούς όγκους παρά στους μη-διηθητικούς. Άλλες μελέτες δείχνουν επίσης ότι οι μεταλλάξεις του EGFR προηγούνται της ενίσχυσης, με την ενίσχυση να ευνοεί το μεταλλαγμένο αλληλίο (**Nomura et al., 2007**). Το κατασταλικό ογκογονίδιο p53 είναι σημαντικά βλαμμένο στη πλειονότητα των αδενοκαρκινωμάτων του πνεύμονα και συνδέεται στενά με το κάπνισμα. Το p53 υπερεκφράζεται σε μόνο 8% της άτυπης αδενωματώδους και 4-16% των καθάρων BAC συγκρινόμενα με το 30-53% του αδενοκαρκινώματος (**Kitamura et al., 1996**). Υπερέκφραση του p53 φαίνεται να είναι ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας ελαττωμένης

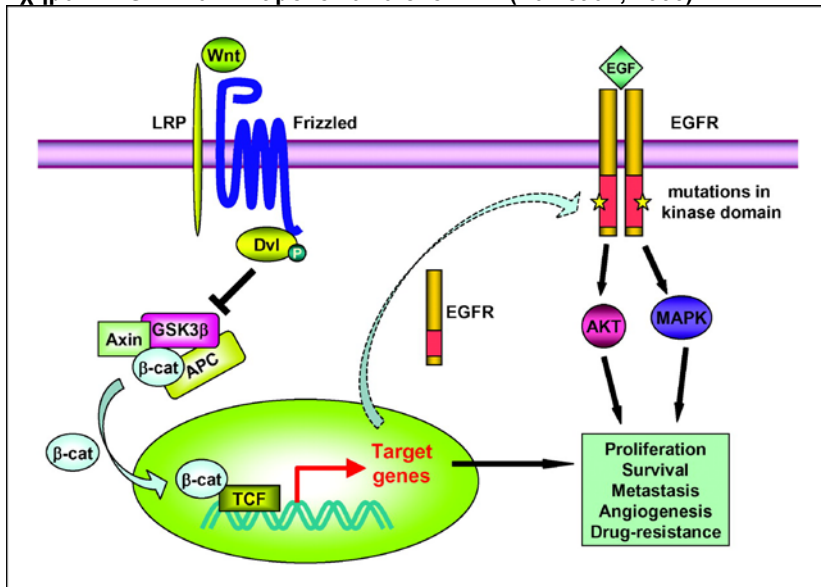
μακρόχρονης επιβίωσης στα ΒΑC και αδενοκαρκινώματα σταδίου Ι. Η επιβίωση μειώνεται περαιτέρω σε δομικές μεταλλάξεις ή «κομμένο» γονίδιο p53 (**Ahrendt et al., 2003**). Αυτά τα στοιχεία δείχνουν ότι οι μεταλλάξεις του p53 παίζουν σημαντικό ρόλο στη κακοήθη μετατροπή του ΒΑC. Αυτές τις μοριακές αλλαγές μπορούμε να τις δούμε σχηματικά στο Σχήμα 1.

Σχήμα 1. Μεταλλάξεις και ανωμαλίες στην ανάπτυξη του BAC (Raz et al., 2006)



Στο Σχήμα 2, μπορούμε να δούμε υπό μορφή γραφήματος τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος EGFR και Wnt/ β -catenin και την αλληλεπίδραση τους στην ογκογένεση.

Σχήμα 2. EGFR και Wnt μονοπάτια στο BAC (Raz et al., 2006)



Οι μεταλλάξεις στο EGFR που βρέθηκαν στα BAC ενεργοποιούν αντι-αποπτωτικά μονοπάτια παρά αναπτυξιακά (**Krause & Van Etten, 2005**). Οι Cappuzzo et al (**Cappuzzo et al., 2004**), έδειξαν ότι η φωσφορυλίωση της Akt, που ενεργοποιεί την Akt, η οποία με τη σειρά της ελέγχει κυρίως την απόπτωση, σχετίζεται με τον ιστολογικό τύπο BAC, το μη-κάπνισμα και το θηλυκό φύλο. Η φωσφορυλίωση του MAPK (Mitogen-activated protein kinase) δεν βρέθηκε να συνδέεται με αυτούς τους παράγοντες. 60% των όγκων που ήταν φωσφορυλιωμένοι για την Akt απάντησαν στη gefitinib. Οι Sordella et al (**Sordella et al., 2004**), έδειξαν σε κυτταρικές σειρές ότι οι μεταλλάξεις του EGFR οδηγούν σε επιλεκτική ενεργοποίηση του μονοπατιού της Akt που κινητοποιεί αντι-αποπτωτικά σήματα, τα οποία αναστέλλονται με τη παρουσία της gefitinib και αντιστέκονται στη cisplatin και doxorubicin. Αυτό δείχνει ότι η απάντηση στους EGFR-TKIs σε EGFR μεταλλαγμένους όγκους είναι αποτέλεσμα της αναστολής των μονοπατιών που χρησιμοποιούν την Akt, στα οποία οι όγκοι έχουν γίνει υπερβολικά ευαίσθητοι.

Άλλοι ερευνητές βρήκαν ότι η υπερέκφραση γονιδίων στο μονοπάτι Wnt/ β -catenin της ογκογένεσης, και ειδικότερα στα Wnt-1, Wnt-3A, Wnt-5, β -catenin έχει σαν αποτέλεσμα την υπερρύθμιση (up-regulation) και ενεργοποίηση του EGFR (**Civenni et al., 2003, Tan et al., 2005**). Αυτό δείχνει ότι ο δρόμος του Wnt μπορεί να παίξει ένα σπουδαίο υπερρυθμιστικό ρόλο στην ανάπτυξη EGFR-ευαίσθητων όγκων. Πρόδρομες ανακοινώσεις (**Heet al., 2005, You et al., 2004**) έδειξαν ότι τα

Wnt-1 και Wnt-2 γονίδια υπερεκφράζονται σημαντικά σε κυτταρικές σειρές με BAC και σε κάποιους ανθρώπινους BAC όγκους και χορήγηση ειδικών αντισωμάτων που τα αναστέλλει έχει δυνητική θεραπευτική χρήση. Η ίδια ομάδα υποθέτει ότι ανώμαλη έκφραση του Wnt μονοπατιού έχει σημαντικό ρόλο στη μετατροπή των αρχέγονων καρκινικών κυττάρων λόγω της σπουδαίας επίδρασης του Wnt στην εξελικτική βιολογία.

Κατανοώντας τις αλλαγές που συμβαίνουν από μία μικρή προκαρκινωματώδη βλάβη στο διηθητικό αδενοκαρκίνωμα είναι κεφαλαιώδους σημασίας. Απαιτείται ουσιαστική διερεύνηση και μελέτη των μεταλλάξεων και του περιβάλλοντος του όγκου που καθορίζουν τη κατεύθυνση και τα βήματα της διαφοροποίησης των αρχέγονων κυττάρων του καρκίνου του πνεύμονα προς το BAC. Πχ., έκθεση στον καπνό ή έλλειψη οιστρογόνων μπορούν να δημιουργήσουν ένα περιβάλλον για τα αρχέγονα κύτταρα που να ευνοεί τη διαφοροποίηση τους προς έναν επιθετικότερο τύπο καρκίνου του πνεύμονα. Αλληλεπιδράσεις όγκου-ξενιστή και σωματικές μεταλλάξεις του EGFR σε φυσιολογικό πνευμονικό ιστό σε πληθυσμούς που προσβάλλονται δυσανάλογα από BAC μπορούν να επηρεάσουν την ανάπτυξη BAC. Αν και το μονοπάτι του EGFR αναδύθηκε σαν σύνδεση με αυτά τα κλινικά χαρακτηριστικά, άλλα κριτικά μονοπάτια πιθανά θα έλθουν στο προσκήνιο να αποτελέσουν ενδιαφέροντες στόχους στη θεραπεία των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα.

MicroRNA: Συσχέτιση με ιστολογικό τύπο στο ΜΜΚΠ και πρόγνωση

Τα MiRs είναι μία κατηγορία μικρών, μη κωδικοποιημένων RNAs που συμμετέχουν σε πολλές αναπτυξιακές διεργασίες. Τα MiRs ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση μέσα από ένα ατελές ζευγάρισμα βάσεων (base-pairing) σε μία συμπληρωματική αλληλουχία στη 3' αμετάφραστη περιοχή ενός mRNA-στόχου, που οδηγεί σε μεταφραστική καταστολή και, σε μικρότερο βαθμό, επιταχύνει το turnover του στοχευμένου αντιγράφου (**Valencia-Sanchez et al., 2006**). Απορρύθμιση των miRs σχετίσθηκε με την έναρξη του καρκίνου και επιδείνωση, υπογραμμίζοντας ότι τα miRs μπορούν να παίξουν ρόλο κατασταλτικών γονιδίων του όγκου ή ογκογονιδίων και μπορούν να επάγουν ή αναστείλουν την απόπτωση (**Esquela-Kerscher & Slack, 2006**).

Μελέτες έκφρασης των MiRs σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του πνεύμονα ή ζωικά μοντέλα έχουν κυρίως επικεντρωθεί στην οικογένεια των miRs let-7, η οποία λειτουργεί σαν κατασταλτική του όγκου με το να εμποδίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και να ρυθμίζει το ογκογονίδιο RAS (**Kumar et al., 2008**). Η let-7 μπορεί επίσης να στοχεύσει τους ενεργοποιητές (effectors) του κυτταρικού κύκλου (**Esquela-Kerscher & Slack, 2006**) και με τη σειρά της να ανασταλεί η λειτουργικότητα της από το ογκογονίδιο MYC (**Chang et al., 2008**). Λίγες μελέτες μέχρι τώρα στους ανθρώπους προσδιόρισαν διαφορετικές εκφράσεις miR που να

σχετίζονται με την επιβίωση στον καρκίνο του πνεύμονα (**Takamizawa et al., 2004, Yanaihara et al., 2006, Yu et al., 2008**). Συνολικά, αυτές οι μελέτες είναι σχετικά μικρές και έχουν περιορισμένη δυνατότητα να προσμετρήσουν και άλλους δυνητικούς παράγοντες κινδύνου στον καρκίνο του πνεύμονα.

Οι Landi et al, (**Landi et al., 2010**), σε μία μεγάλη μελέτη με 290 περιστατικά, 165 αδenoκαρκινώματα και 125 πλακώδη, ανέλυσαν την έκφραση miRs σε ιστό παραφίνης χρησιμοποιώντας μια ειδικά φτιαγμένη miR μικροσυστοιχία για να απαντήσουν στο ερώτημα αν το προφίλ έκφρασης miR μπορεί να ξεχωρίσει τα αδenoκαρκινώματα από τα πλακώδη ή να προβλέψει επιβίωση. Επίσης ερεύνησαν την επίδραση του καπνίσματος στην έκφραση των miR. Το μεγάλο μέγεθος της μελέτης επέτρεψε τη διαστρωμάτωση ή προσαρμογή για δυνητικούς συμμετέχοντες παράγοντες, όπως, ηλικία, φύλο, κάπνισμα, στάδιο, διαφοροποίηση, μέγεθος, προσβολή λεμφαδένων, παρουσία μεταστάσεων, ιστολογικός τύπος.

Στα αποτελέσματα τους φάνηκε ότι η υπογραφή miRs είναι ισχυρά διαφορετική στα αδenoκαρκινώματα απ' ότι στα πλακώδη ($p < 0.0001$), ειδικότερα στα πρώιμα στάδια και περιέλαβε miRs που βρίσκονται στο χρωμόσωμα 3p21-22, όπου απώλειες αλληλίων και γενετικές μεταβολές είναι οι πρωιμότερες και συχνότερες γενωμικές ανωμαλίες στον ΜΜΚΠ και είναι πιο συχνές στο πλακώδες από το αδenoκαρκίνωμα (**Lerman et al., 2000, Braga et al., 2002**). Τα περισσότερα miRs,

συμπεριλαμβανομένης της οικογένειας let-7, ήταν υπο-εκφρασμένα στα πλακώδη καρκινώματα και μάλιστα η χαμηλή τους έκφραση σχετιζόταν με 1.2-3.6 αυξημένο κίνδυνο θανάτου από τη νόσο. Όπως έχει παρατηρηθεί και σε άλλα μονοπάτια (EGFR στο ΜΜΚΠ) ή άλλους όγκους (NRAS/BRAF στο μελάνωμα) είναι πιθανό ότι οι μεταβολές έκφρασης της let-7 και μεταλλάξεων στο KRAS να είναι αμοιβαίες στη καρκινογένεση του καρκίνου του πνεύμονα, με τη let-7 να έχει περισσότερο κυρίαρχο ρόλο στα πλακώδη και οι μεταλλάξεις KRAS στα αδενοκαρκινώματα. Επίσης, το miR-29a, που δρα σαν ογκογονίδιο ή “oncomiR” σε πολλούς τύπους όγκων και παίζει σπουδαίο ρόλο στη μεταστατικότητα του όγκου, βρέθηκε να διαφοροποιείται σημαντικά ανάλογα με τον ιστολογικό τύπο, με υψηλά επίπεδα στα αδενοκαρκίνωμα σταδίου II αλλά όχι στο στάδιο I, υποθέτοντας ότι μπορεί να χρησιμεύσει σαν δείκτης επιδείνωσης, προσδιορίζοντας τους όγκους που βρίσκονται στη καμπή του μεταστατικού δυναμικού. Αν αυτά επαληθευθούν λειτουργικά, τα miRs μπορεί-ειδικά σε νεοπλάσματα που έχουν εξαιρεθεί χειρουργικά-να ταυτοποιήσουν συγκεκριμένους ιστολογικούς υπότυπους. Μία υπογραφή με 5 miRs στατιστικά σημαντικά προέβλεπε την επιβίωση, κάτι που και άλλες μελέτες έδειξαν (**Gallardo et al., 2009, Raponi et al., 2009, Markou et al., 2008**) και έτσι τα miRs μπορεί να έχουν σημαντικές εφαρμογές για τη πρόγνωση και αντιμετώπιση του καρκίνου του πνεύμονα ανάλογα με τον ιστολογικό τύπο.

στ. ΦΑΡΜΑΚΟΓΕΝΩΜΙΚΗ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΠΝΕΥΜΟΝΑ (ΚΠ)

Η φαρμακογενωμική είναι ο τομέας της φαρμακολογίας ο οποίος στοχεύει στη κατανόηση αλλά και στη πρόβλεψη της ανταπόκρισης ενός συγκεκριμένου ασθενούς στη φαρμακευτική θεραπεία με βάση τη γενετική του ποικιλότητα. Ενώ οι σωματικές μεταλλάξεις συμβαίνουν μόνο στο προσβεβλημένο όργανο ή στον ίδιο μόνο όγκο, και οδηγούν σε διαφορετική γενετική σύνθεση ενός όγκου, οι πολυμορφισμοί των γεννητικών κυττάρων έχουν μία αρχέγονη προέλευση και είναι κληρονομήσιμοι. Σε αυτό το μέρος θα παρουσιάσουμε τα δεδομένα που απετέλεσαν το έναυσμα για να ξεκινήσει η παρούσα διατριβή.

Πρόσφατες εξελίξεις δείχνουν ότι τα αδενοκαρκινώματα φέρουν διακριτές γενωμικές αλλαγές που επιτρέπουν την υπο-κατηγοριοποίηση τους σε μοριακούς υπότυπους με κλινική σημασία. Αυτοί οι υπότυποι, που μπορεί να μοιάζουν μορφολογικά, διακρίνονται από μία ξεχωριστή γενωμική αλλοίωση που είναι υπεύθυνη και για την έναρξη και για τη συντήρηση του καρκίνου. Τέτοια γενωμική διαταραχή αποκαλείται μετάλλαξη-οδηγός (driver-mutation). Επίσης, είναι σημαντικό ότι ειδικές μεταλλάξεις οδηγούν τον όγκο να ανταποκρίνεται διαφορετικά στις στοχεύουσες θεραπείες. Πχ, οι όγκοι που είναι εξαιρετικά ευαίσθητοι στους αναστολείς τυροσινικής κινάσης του EGFR (gefitinib/erlotinib) συχνά περιέχουν κυρίαρχες σωματικές μεταλλάξεις σε εξόνια που

κωδικοποιούν ένα τμήμα της περιοχής της τυροσινικής κινάσης του EGFR (**Lynch et al., 2004, Paez et al., 2004, Pao et al., 2004**). Αντίστροφα, όγκοι με σωματικές μεταλλάξεις στο KRAS, που κωδικοποιούν μία GTPase στη κατωφέρεια του μονοπατιού του EGFR, δεν υποστρέφονται όταν αντιμετωπίζονται με παρόμοια φάρμακα (**Pao et al., 2005, Han et al., 2005, Giaccone et al., 2006**). Και με ένα και μόνο γονίδιο, οι όγκοι μπορούν περαιτέρω να ταξινομηθούν ανάλογα με τις ειδικές γενωμικές τροποποιήσεις τους. Για παράδειγμα, οι απαλείψεις στο εξόνιο 19 του EGFR και οι σημειακές μεταλλάξεις στο εξόνιο 21(L858R) προσδίδουν ευαισθησία στους EGFR TKIs, ενώ οι προσθήκες/διπλασιασμοί στο εξόνιο 20 προσφέρουν πρωτογενή αντίσταση (**Wu et al., 2008**).

Όταν η γνώση ειδικών γενωμικών αλλοιώσεων συνδέεται με στοχεύουσα θεραπεία, τότε δραματικές απαντήσεις και κλινικά οφέλη προκύπτουν, και οι ασθενείς μπορούν να αποφύγουν τη χημειοθεραπεία. Περίπου 75% των ασθενών που οι όγκοι τους φέρουν ευαίσθητες στα φάρμακα μεταλλάξεις του EGFR απαντούν ακτινολογικά στους EGFR TKIs (**Costa et al., 2007**), συγκρινόμενοι με <5% των ασθενών Καυκάσιας φυλής με MMKP με υποδοχέα “wild-type” και <1% με όγκους με μεταλλάξεις στο KRAS (**Riely et al., 2009**). Συγκριτικά, οι απαντήσεις με τη standard χημειοθεραπεία βασισμένη στη πλατίνα μαζί με bevacizumab είναι 35% (**Schiller et al., 2002, Shepherd et al., 2005**).

Το 2007, οι Soda et al (**Soda et al., 2007**) περιέγραψαν για πρώτη φορά το συντηγμένο ογκογονίδιο (fusion oncogene) EML4-ALK, που

αποτελεί το νεότερο στόχο στο ΜΜΚΠ. Το αποτέλεσμα της σύντηξης από μία μικρή αναστροφή μέσα στο χρωμόσωμα 2p, οδηγεί στην έκφραση μιας χιμαιρικής τυροσινικής κινάσης, στην οποία το μισό τελικό της N-αλύσου της echinoderm microtubule-associated protein-like 4 (EML4) συντήκεται με την ενδοκυττάρια περιοχή της anaplastic lymphoma kinase (ALK). Η EML4-ALK κατέχει δυνητική ογκογενετική δραστηριότητα και in vitro και in vivo. Αυτή η δραστηριότητα μπορεί αποτελεσματικά να αναχαιπισθεί από μικρά μόρια – αναστολείς, γεγονός που καθιστά την EML4-ALK οδηγό-κλειδί για τη καρκινογένεση στον πνεύμονα.

Οι ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα, που είναι EML4-ALK θετικοί έχουν ορισμένα ιδιαίτερα κλινικά και μοριακά χαρακτηριστικά. Είναι κυρίως άνδρες, νεότερης ηλικίας και μη-καπνιστές, οι δε όγκοι τους είναι αδενοκαρκινώματα, με μεγάλο αριθμό κυττάρων δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου (signet ring).

Έτσι, οι ασθενείς με ΜΜΚΠ, θα ήταν καλό να εξετάζονται αρχικά για μεταλλάξεις στο EGFR, καθότι είναι συχνότερες απ' ό,τι οι συντήξεις στο EML4-ALK και επιπλέον οι EGFR TKIs έχουν ένδειξη χορήγησης τους στην 1^η γραμμή σε θετικούς για μεταλλάξεις ασθενείς. Σε απουσία μεταλλάξεων EGFR, τότε θα πρέπει να εξετάζονται για μεταλλάξεις στο EML4-ALK. Υπάρχουν προκλινικά δεδομένα ευαισθησίας σε ALK αναστολείς και αυτή η υπόθεση ελέγχεται τώρα στη κλινική πράξη.

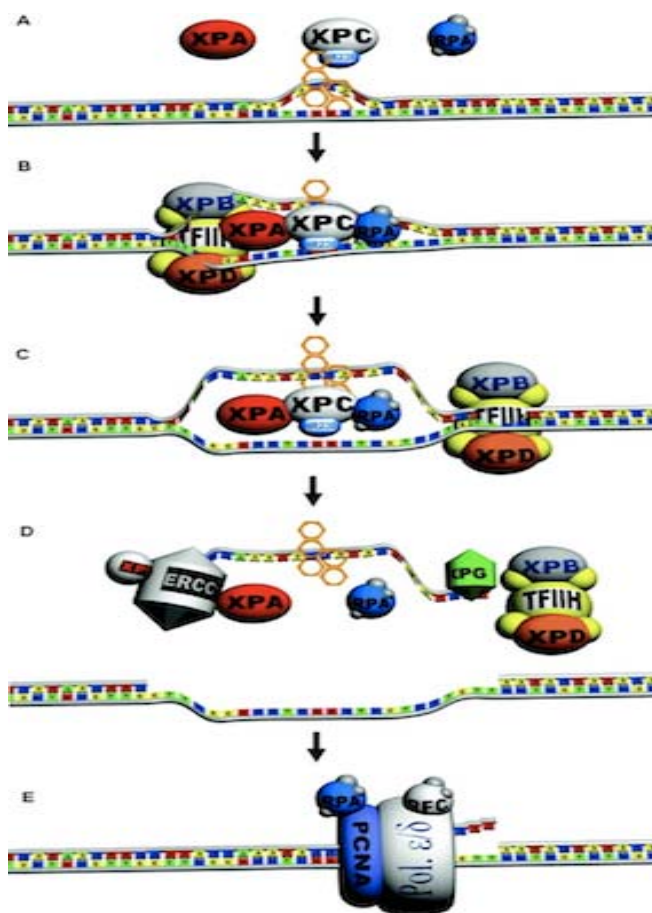
ERCC1,RRM1,RRM2,BRCA1 και απάντηση στη χημειοθεραπεία

Η γενετική μπορεί να επηρεάσει την απάντηση στη χημειοθεραπεία και θα αναφερθεί αρχικά ο ρόλος στο μονοπάτι επιδιόρθωσης βλαβών των νουκλεοτιδίων (nucleotide excision repair NER). Τα εισπνεόμενα με τον καπνό καρκινογόνα προκαλούν μία τοπική πνευμονική φλεγμονώδη απάντηση που χαρακτηρίζεται από την είσοδο ουδετερόφιλων στις αναπνευστικές οδούς. Με την είσοδο τους στους πνεύμονες, τα ουδετερόφιλα ενεργοποιούνται και απελευθερώνουν μία σειρά ιόντων οξυγόνου και πρωτεϊνών, όπως μυελοϋπεροξειδάση. Στα ανθρώπινα κυψελιδικά επιθηλιακά κύτταρα έχει παρατηρηθεί μία σημαντική ελάττωση του NER όταν συγκαλλιεργούνται με ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα (**Gungor et al., 2007**).

Το NER, ένα ιδιαίτερα εύστροφο μονοπάτι για την απομάκρυνση βλαβών DNA, συχνά δυσλειτουργεί στον ΜΜΚΠ και θα μπορούσε να είναι η Αχίλλειος πτέρνα του στη προσπάθεια ανάπτυξης εξατομικευμένης χημειοθεραπείας. Η αντίσταση στα φάρμακα της χημειοθεραπείας επέρχεται κυρίως λόγω της αποτοξίνωσης ή αποτελεσματικής επιδιόρθωσης του βλαμμένου DNA από τα πολλά μέλη του NER. Το NER καθαρίζει μία μεγάλη σειρά βλαβών που διαστρεβλώνουν τις έλικες του DNA, συμπεριλαμβανομένων των βλαβών που προκαλούνται από τη cisplatin και των προϊόντων επίδρασης της υπεριώδους ακτινοβολίας. Κληρονομούμενες ανωμαλίες στις διεργασίες του NER προκαλούν μία σειρά επιδιορθωτικών διαταραχών, όπως π.χ. στο xeroderma

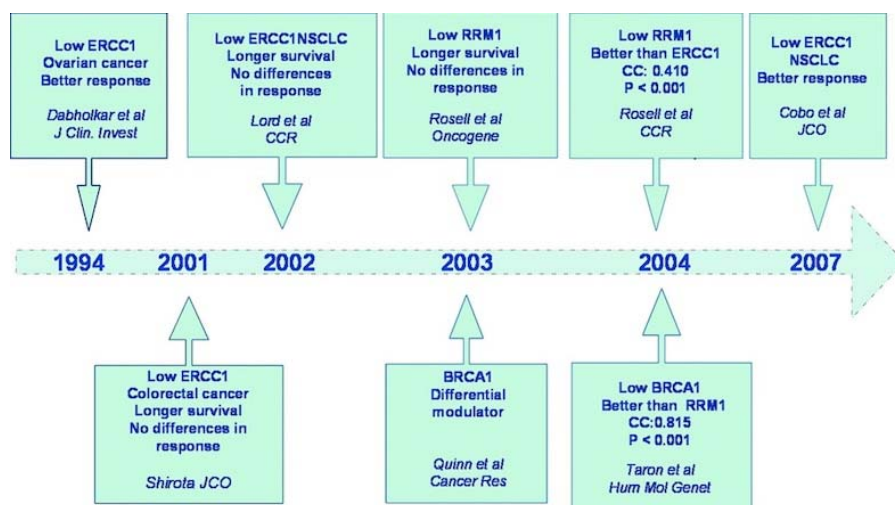
pigmentosum (XP), με υπερβολικό κίνδυνο εμφάνισης καρκίνων του δέρματος που σχετίζονται με υπεριώδη ακτινοβολία και του συνδρόμου Cockayne. Το NER λειτουργεί με μηχανισμό «κόψε-ράψε» (copy-paste), ο οποίος αναγνωρίζει τη βλάβη από τη πλατίνη, ανοίγει τοπικά την έλικα του DNA γύρω από τη βλάβη, την αποκόβει και γεμίζει το χάσμα με πολυμεράσες και αντιγραφικούς παράγοντες (σχήμα 3). Το NER αποτελείται από δύο υπο-μονοπάτια: το σφαιρικό γενωμικό NER (global genome NER-GG-NER-) και το μεταγραφικά-ζευγαρωμένο NER (transcription-coupled NER-TC-NER-), τα οποία μοιράζονται τον ίδιο πυρηνικό μηχανισμό αλλά διαφέρουν στον τρόπο που αναγνωρίζουν τις βλάβες (**Wijnhoven et al., 2007**). Το ελαττωματικό - NER XP διακρίνεται σε επτά συμπληρωματικές ομάδες, από XPA έως XPG. Τα XPA και XPE είναι ελαττωματικά κυρίως στο GG-NER, το οποίο επιδιορθώνει τη βλάβη στα μη-μεταγραμμένα νήματα DNA, ενώ οι άλλες XP ομάδες εμπλέκονται σε ανεπάρκειες τόσο του TC-NER όσο και του GG-NER (**Ito et al., 2007**).

Σχήμα 3 (courtesy Rafael Rosell). Λειτουργικό μονοπάτι NER και επιδιόρθωση βλαβών από πλατίνα. (A) Αναγνώριση των συμπλόκων πλατίνας (χρυσοί δακτύλιοι) από το ετεροδιμερές XPC/hHR23B. **(B)** TFIIH περιέχει δύο ελικάσες, που ανοίγουν ένα τμήμα 30-βάσεων DNA γύρω από τη βλάβη. **(C)** Αυτό το ενδιάμεσο άνοιγμα σταθεροποιείται από τα RPA και XPA. **(D)** Τα νήματα DNA που περιέχουν τις βλαμμένες βάσεις αποκόπτονται από το XPG και από τα excision repair cross-complementing 1 (ERCC1)/XPF. Το XPG καθαρίζει το βλαμμένο νήμα 3' DNA από τη βλάβη, και το ERCC1/XPF καθαρίζει το βλαμμένο νήμα 5' DNA. **(E)** Το εναπομείναν χάσμα γεμίζεται από DNA πολυμεράση δ ή ε με τη παρουσία αντιγραφικών παραγόντων.



Τα τελευταία χρόνια το ERCC1 και άλλα μέλη του συστήματος επιδιόρθωσης των βλαβών DNA ερευνήθηκαν στη κλινικά πράξη (Σχήμα 4).

Σχήμα 4 (courtesy Rafael Rosell). Κλινικές μελέτες του ERCC1 και άλλων στοιχείων του συστήματος επιδιόρθωσης των βλαβών DNA



Το ERCC1 (Excision Repair Cross-Complementing group 1 gene) κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη επιδιόρθωσης με αποκοπή νουκλεοτιδίων, η οποία επιδιορθώνει μία σειρά βλαβών, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, για το NER. Υψηλά ιστικά επίπεδα ERCC1 mRNA σε ασθενείς με καρκίνο ωοθηκών και στομάχου σχετίσθηκαν με αντίσταση στην πλατίνα (**Dabholkar et al., 1998, Metzger et al., 1998**). Όταν μετρήθηκε το ενδοογκικό ERCC1 mRNA από δείγματα παραφινωμένου ιστού με real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction από ασθενείς με καρκίνο παχέος εντέρου που έλαβαν oxaliplatin και 5-fluoracil, υψηλά επίπεδα

ERCC1 σχετίσθηκαν σημαντικά με πτωχές απαντήσεις και μικρότερη επιβίωση (**Shirota et al., 2001**).

Το RRM1 είναι ένα γονίδιο που κωδικοποιεί τη ρυθμιστική υπομονάδα της ριβονουκλεοτιδικής αναγωγάσης και είναι ο μοριακός στόχος της gemcitabine. Μετά τη κυτταρική πρόσληψη, η gemcitabine φωσφορυλιώνεται στους ενεργούς μεταβολίτες της, διφωσφορικό dFdCDP και τριφωσφορικό dFdCTP, τα οποία αντίστοιχα αναστέλλουν τη ριβονουκλετιδική αναγωγάση και τη σύνθεση του DNA.

Η deoxycytidine kinase (dCK) είναι το περιοριστικό καταλυτικό ένζυμο στο βιοσχηματισμό των νουκλεοσιδικών αναλόγων, και αρκετές μελέτες έχουν προτείνει ότι είναι περιοριστικός παράγοντας δραστηριότητας της gemcitabine καθώς η ανεπάρκεια της είναι κριτικός παράγων στην επίκτητη αντίσταση *in vitro* μοντέλων καρκίνων του πνεύμονα στη gemcitabine. Επιπρόσθετα, τα προθεραπευτικά επίπεδα dCK μπορεί να χρησιμοποιηθούν σαν προβλεπτική παράμετρος ευαισθησίας του όγκου. Πράγματι, μια αναλογική σχέση μεταξύ dCK δραστηριότητας και ευαισθησίας στη gemcitabine δείχθηκε σε xenografts όγκου (**Kroep et al., 2002**). Ο ουσιώδης ρόλος της dCK επιβεβαιώθηκε από την αξιοσημείωτα ελαττωμένη δραστηριότητα της gemcitabine έναντι κυτάρων MMKP με τη χρήση του φυσικού υποστρώματος 2'-deoxycytidine, ενώ transcriptome ανάλυση προτείνει τη συνεργιστική αλληλεπίδραση με τη pemetrexed έναντι του MMKP, η οποία σαν αναστολέας *de novo* της βιοσύνθεσης των πουρινών μπορεί να ενισχύσει την έκφραση ενζύμων που εμπλέκονται

στα μονοπάτια διάσωσης των νουκλεοσιδών, περιλαμβανομένης της dCK, σαν αντιρροπιστικός μηχανισμός. Το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες, που υπέδειξαν ότι μερικά χημειοθεραπευτικά, όπως τα νουκλεοσιδικά ανάλογα, etoposide και topotecan είχαν διεγερτική επίδραση στη dCK (**Giovannetti et al., 2005**). Τα ευρήματα αυτά μπορούν να έχουν εφαρμογές στον ορθολογιστικό σχεδιασμό χορήγησης χημειοθεραπευτικών σχημάτων που ενσωματώνουν τη gemcitabine και άλλους παράγοντες που τροποποιούν τη δραστικότητα της dCK στην αντιμετώπιση του καρκίνου του πνεύμονα. Έτσι, η ύπαρξη προκλινικών δεδομένων συνέργειας με τη διαδοχική χορήγηση φαρμάκων οδήγησε σε τυχαίοποιημένη μελέτη φάσης II με τρία σκέλη remetrexed μαζί με gemcitabine σαν 1ης γραμμής θεραπεία σε προχωρημένο ΜΜΚΠ, και τα πρόδρομα αποτελέσματα αποτελεσματικότητας και τοξικότητας έδειξαν ότι η remetrexed ακολουθούμενη από τη gemcitabine την ημέρα 1 είναι το βέλτιστο σχήμα (**Adjei, 2006**).

Το ποσοστό των φωσφορυλιωμένων μεταβολιτών της gemcitabine μπορεί να ελαττωθεί από τη κυτταρική 5'-nucleotidase (5'-NT), ενώ η gemcitabine μόνη της απενεργοποιείται με απαμίνωση μέσω της cytidine deaminase (CDA). Υψηλά επίπεδα των καταβολικών αυτών ενζύμων έχουν βρεθεί σε κυτταρικές σειρές όγκων ανθεκτικών στα νουκλεοσιδικά ανάλογα και gemcitabine. Μία πρόσφατη ανοσοιστοχημική μελέτη από ιστούς ασθενών με προχωρημένο ΜΜΚΠ έδειξε ότι η 5'-NT είναι

ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας στους ασθενείς που έλαβαν gemcitabine. Πράγματι, οι ασθενείς με χαμηλά επίπεδα έκφρασης 5'-NT είχαν χειρότερη επιβίωση απ'ότι ασθενείς με υψηλότερη έκφραση (6 και 11 μήνες αντίστοιχα) (**Seve et al., 2005**).

Αρκετές μελέτες σε ασθενείς με MMΚΠ σταδίου IV που έλαβαν gemcitabine/ cisplatin έδειξαν ότι οι ασθενείς με χαμηλά επίπεδα ERCC1 ή ribonucleotide reductase subunit M1 (RRM1) mRNA είχαν μία διάμεση επιβίωση 15 μηνών. Μολαταύτα, η προβλεπτική αξία των χαμηλών επιπέδων ERCC1 mRNA που κατέδειξε η πρώτη μελέτη (**Lord et al., 2002**) δεν αναπαράχθηκε σε δεύτερη μελέτη της ίδιας ομάδας με Ιταλούς ασθενείς, όπου χαμηλά επίπεδα ERCC1 mRNA έδειξαν μία μη-σημαντική τάση για καλύτερη επιβίωση. Αντίστροφα, στον ίδιο Ιταλικό πληθυσμό, χαμηλά επίπεδα RRM1 mRNA σχετίσθηκαν με σημαντικά βελτιωμένη επιβίωση (15.5 μήνες vs 6.8 μήνες: $p=0.002$) (**Rosell et al., 2003**). Δεν ανιχνεύθηκαν διαφορές με βάση τα επίπεδα RRM1 σε ασθενείς που έλαβαν paclitaxel/ carboplatin ή vinorelbine/ cisplatin σαν μέρος της αρχικής μελέτης (**Scagliotti et al., 2002**). Αν και στην αρχική μελέτη δεν βρέθηκαν διαφορές μεταξύ των τριών πλατινούχων συνδυασμών, το RRM1 προσδιόρισε ασθενείς με καλύτερη επιβίωση στο σκέλος gemcitabine/ cisplatin, το οποίο μπορεί να αποδοθεί στην επίδραση του RRM1 στο μεταβολισμό της gemcitabine και στο μονοπάτι NER. Χαμηλά επίπεδα RRM1 σχετίζονται με καλύτερη επιβίωση στο MMΚΠ σε ασθενείς που έλαβαν τον συνδυασμό gemcitabine/ cisplatin σε μία μεγάλη

τυχαίοποιημένη μελέτη (**Rosell et al., 2004, Alberola et al., 2003**). Παρόλα ταύτα, η προβλεπτική αξία του RRM1 δεν επιβεβαιώθηκε στην ομάδα ασθενών που έλαβαν την τριπλέτα gemcitabine/cisplatin/vinorelbine, εγείροντας την υπόθεση ότι οι αντι-μικροσωληναριακοί παράγοντες δρουν στο μονοπάτι NER με διαφορετικό τρόπο. Σε άλλη μελέτη (**Rosell et al., 2004**) ασθενών που έλαβαν προεγχειρητικά gemcitabine/cisplatin και κατόπιν χειρουργήθηκαν, τα χαμηλά επίπεδα RRM1 mRNA (κατώτερο τεταρτημόριο) προέβλεπαν σημαντικά καλύτερη επιβίωση σε σχέση με τα υψηλά, ενώ δεν βρέθηκαν διαφορές ανάλογα με τα ERCC1 και XPD mRNA επίπεδα.

Ο προβλεπτικός ρόλος του ERCC1 στην ανταπόκριση στη πλατίνη ελέγχθηκε σε προοπτική μελέτη βασισμένη στα επίπεδα του ERCC1 mRNA. Ασθενείς στο σκέλος ελέγχου έλαβαν docetaxel/cisplatin, ενώ οι ασθενείς με εξατομικευμένη θεραπεία ανάλογα με τα επίπεδα ERCC1 mRNA, αν ήταν χαμηλά έλαβαν docetaxel/ cisplatin και να ήταν υψηλά μη-πλατινούχο συνδυασμό (docetaxel/gemcitabine). Οι απαντήσεις ήταν 39.3% στο σκέλος ελέγχου και 50.7% στο εξατομικευμένο σκέλος ($p=0.019$) (**Cobo et al., 2007**). Αυτή η μελέτη δείχνει ότι η μέτρηση της έκφρασης ERCC1 mRNA σε ιστούς ασθενών είναι εφικτή στη καθημερινή κλινική πρακτική και σχετίζεται με απαντήσεις στο συνδυασμό docetaxel/cisplatin. Παρόλο αυτά, οι αυξημένες απαντήσεις δεν μεταφράστηκαν σε όφελος στην επιβίωση, το οποίο μπορεί εν μέρει να εξηγηθεί από το γεγονός ότι τα αντι-μικροσωληναριακά φάρμακα δεν είναι

και οι καλύτεροι συνοδοί της πλατίνας όταν τα επίπεδα ERCC1 είναι χαμηλά. Ο συνδυασμός έκφρασης των γονιδίων ERCC1 και RRM1 σε επίπεδο mRNA χρησιμοποιώντας κατεψυγμένα δείγματα ιστών έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για επιλογή χημειοθεραπευτικών (**Simon et al., 2007**): ασθενείς με χαμηλή έκφραση mRNA και των δύο γονιδίων έλαβαν carboplatin/gemcitabine, αυτοί με υψηλή έκφραση και των δύο γονιδίων τον συνδυασμό docetaxel/vinorelbine, αυτοί με υψηλή έκφραση ERCC1 αλλά χαμηλά RRM1 mRNA τον συνδυασμό gemcitabine/docetaxel ενώ, τέλος, αυτοί με χαμηλή έκφραση ERCC1 mRNA και υψηλή RRM1 mRNA τον συνδυασμό docetaxel/carboplatin. Αυτή η μελέτη επιβεβαίωσε τη δυνατότητα εφαρμογής κατάλληλα προσαρμοσμένης χημειοθεραπείας και άνοιξε τον δρόμο για πρόσθετες δοκιμές.

Το GG-NER πιθανόν να μη ανιχνεύει ορθά τα σύμπλοκα cisplatin-DNA, επειδή έχει καταδειχθεί ότι έχει χαμηλή συγγένεια γι' αυτά (**Laine & Egly, 2006, Tremeau-Bravard et al., 2004**). Από την άλλη πλευρά, ανεπάρκειες του TC-NER καθιστούν τα κύτταρα εξαιρετικά υπερευαίσθητα στη πλατίνα (**Furuta et al., 2002**). Διαφορετικά από το ERCC1, το BRCA1 (Breast Cancer Susceptibility gene1) εμπλέκεται στο TC-NER και τα κύτταρα με ελαττωματικό BRCA1 είναι υπερευαίσθητα στη πλατίνα (**Husain et al., 1998**). Η έκφραση BRCA1 παρέχει διαφορετική χημειοευαισθησία στις κυτταρικές σειρές (**Quinn et al., 2003**), και χαμηλά επίπεδα BRCA1 σχετίζονται με αυξημένη επιβίωση στο στάδιο III του

ΜΜΚΠ σε ασθενείς που έλαβαν προεγχειρητική χημειοθεραπεία με cisplatin/gemcitabine και μετά χειρουργήθηκαν (**Taron et al., 2004**).

Το BRCA1 είναι ένας σημαντικός διαμεσολαβητής της απάντησης σε βλάβη του DNA (**Matsuoka et al., 2007**). Χαμηλά επίπεδα έκφρασης BRCA1 επιφέρουν αυξημένη ευαισθησία στη cisplatin (**Quinn et al., 2003, Quinn et al., 2007, Husain et al., 1998, Lafarge et al., 2001**) και etoposide (**Quinn et al., 2003**) και αντίσταση στα αντι-μικροσωληναριακά φάρμακα, όπως η paclitaxel(**Quinn et al., 2003, Quinn et al., 2007, Lafarge et al., 2001**), η docetaxel (**Quinn et al., 2007**) και η vinorelbine (**Quinn et al., 2003**), ενώ υψηλά επίπεδα έκφρασης BRCA1 οδηγούν σε αντίσταση στη cisplatin (**Quinn et al., 2003, Quinn et al., 2007, Husain et al., 1998, Lafarge et al., 2001**) και στην etoposide (**Quinn et al., 2003**) και ευαισθησία στη paclitaxel(**Quinn et al., 2003, Quinn et al., 2007, Lafarge et al., 2001**), docetaxel (**Quinn et al., 2007**) και vinorelbine (**Quinn et al., 2003**).

Ορισμένα άλλα επίπεδα εμπειρίας δείχνουν ότι η άρση της λειτουργίας του BRCA1 οδηγεί σε αντίσταση στα αντι-μικροσωληναριακά φάρμακα. Ελλείμματα στο σχηματισμό της ατράκτου συσχετίζονται με αντίσταση στις taxanes και στα vinca alkaloids. Καταστολή του Mad2 η του BubR1 σε MCF-7 κύτταρα καρκίνου του μαστού θεραπευμένα με paclitaxel καταργεί τη λειτουργία της ατράκτου, οδηγώντας σε ενισχυμένη αντίσταση στο paclitaxel (**Sudo et al., 2004**). Επίσης, η ρύθμιση προς τα κάτω της έκφρασης BRCA1 μεσολαβεί στην αντίσταση στο paclitaxel

μέσω προ-ώριμης απενεργοποίησης της λειτουργίας της ατράκτου σε MCF-7 κύτταρα μέσω ρύθμισης προς τα κάτω του BubR1 (**Chabali et al., 2006**). Η δυσλειτουργία του BRCA1 είναι κοντινά σχετιζόμενη με τις ελλείψεις στη λειτουργία της ατράκτου αλλά όχι στις εναλλαγές της φάσης G2. Πράγματι, ένα set εναλλαγών της γονιδιακής έκφρασης λόγω της κατάρριψης του ενδογενούς δρόμου του BRCA1 έχουν αναγνωρισθεί σε προστατικά (DU-145) και μαστικά (MCF-7) καρκινικά κύτταρα με DNA microarray ανάλυση (**Bae et al., 2005**). Διάφορες κατηγορίες γονιδίων ρυθμίζονται προς τα κάτω σε BRCA1-knockdown κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των γονιδίων της μεταγραφής και ρύθμισης του κυτταρικού κύκλου και της αντιγραφής και επιδιόρθωσης του DNA. Τα BRCA1-short interference RNAs (siRNAs) ακόμη προκαλούν τη ρύθμιση προς τα κάτω της DNA topoisomerase II alpha (TOP2A), ενός ενζύμου που συμμετέχει στην αντιγραφή DNA και στις δύο βλάβης DNA που ανταποκρίνονται στην έναρξη και στο τέλος της φάσης G2. Αυτό το σημείο απαιτεί τα ενδοκυττάρια μόρια TOP2A, ATR, WRN (Werner's syndrome helicase) και BRCA1. Αυτά είναι σε έλλειψη σε κύτταρα με μεταλλαγμένο το BRCA1. Ωστόσο, σε αντίθεση με τις μεταλλαγμένες κυτταρικές σειρές, η κατάρριψη του ευρέος τύπου του BRCA1 δεν αδυνατίζει αυτό το σχηματισμό αλλά έδειξε ελαττωμένη μιτωτική ατρακτοειδή κίνηση (**Bae et al., 2005**). Το BRCA1 ρυθμίζει θετικά την έκφραση πολλών γονιδίων που συμμετέχουν στο σχηματισμό της ατράκτου, όπως Bub1 και BubR1.

Συνεπώς με αυτά τα ευρήματα είναι η διαπίστωση ότι κύτταρα προθεραπευμένα με BRCA1-siRNAs απέτυχαν να αναστείλουν τη μετάφραση μετά από θεραπεία με nocodazole (**Bae et al., 2005**). Είναι ενδιαφέρον ότι BRCA1-siRNAs προκαλούν επίσης ρύθμιση προς τα κάτω γονιδίων μεταβολισμού όπως RRM2 και ρεδοκτάση του διυδροφολικού (dihydrofolate reductase-DHFR) (**Bae et al., 2005**). Επιπλέον, μια ενσωματωμένη γονιδιακή υπογραφή από πολλαπλά διαγονιδιακά μοντέλα επιθηλιακών καρκίνων (σχετικών με τις λειτουργίες των Simian virus 40T/t-αντιγόνων) συντίθεται από γονίδια που ρυθμίζουν τη κυτταρική αντιγραφή, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και την επιδιόρθωση του DNA. Το BRCA1 υπερεκφράζεται σε 3 T/t-αντιγονικά διαγονιδιακά μοντέλα ποντικών (μαστός, πνεύμονας, προστάτης), όπως και άλλα γονίδια, συμπεριλαμβανομένων των Bub1b, TOP2A, DHFR, thymidylate synthase (TS), and RRM1 (**Deeb et al., 2007**).

III. ΣΚΟΠΟΙ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Σκοπός αυτής της διατριβής είναι να αξιολογήσει αρχικά τη κλινική αποτελεσματικότητα του χημειοθεραπευτικού συνδυασμού docetaxel με gemcitabine σαν 1^{ης} γραμμής χημειοθεραπεία σε ηλικιωμένους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα, και στη συνέχεια, επεκτεινόμενη στο αναπτυσσόμενο πεδίο της φαρμακογενωμικής, να εντοπίσει παράγοντες πρόβλεψης της ανταπόκρισης στη συγκεκριμένη Χ/Θ, εστιάζοντας στη mRNA έκφραση ενδοκυττάρων πρωτεϊνικών ενζύμων όπως των RRM1, RRM2 και BRCA1 σε ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα ή με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα γενικότερα.

Πιο συγκεκριμένα, η παρούσα διατριβή αποτελεί μια κλινικο-εργαστηριακή ερευνητική προσπάθεια διεκπεραίωσης των παρακάτω ειδικών στόχων:

Στόχος 1 (Κλινική προσέγγιση): Να διεξαχθεί μια πολυκεντρική μελέτη φάσης II και να αξιολογηθεί κλινικά η αποτελεσματικότητα του χημειοθεραπευτικού συνδυασμού docetaxel και gemcitabine ως πρώτης γραμμής Χ/Θ σε ηλικιωμένους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα.

Στόχος 2 (Φαρμακογενωμική-εργαστηριακή προσέγγιση): Να προσδιοριστούν σημαντικοί φαρμακογενωμικοί δείκτες με καταμέτρηση των επιπέδων έκφρασης mRNA, όπως οι υπομονάδες M1 και M2 της

ριβονουκλεοτιδικής ρεντουκτάσης (RRM1 και RRM2) και του BRCA1 που συσχετίζονται με τη χημειοευαισθησία των κακοήθων κυττάρων και το μεταβολισμό της Χ/Θ και παράλληλα συνδέονται με τη πρόβλεψη της απάντησης στη Χ/Θ και τη κλινική έκβαση σε ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα και μη-μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα που ακολούθησαν το χημειοθεραπευτικό συνδυασμό docetaxel και gemcitabine ως πρώτης γραμμής Χ/Θ.

Στόχος 2α: Να αξιολογηθούν τα επίπεδα έκφρασης mRNA των υποομάδων RRM1 και RRM2 της ριβονουκλεοτιδικής ρεντουκτάσης από τα κακοήθη κύτταρα και να συσχετιστούν τα επίπεδα αυτών με τα κλινικά αποτελέσματα σε ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα που θεραπεύονται με το συνδυασμό docetaxel και gemcitabine ως 1^{ης} γραμμής Χ/Θ.

Στόχος 2β: Να αξιολογηθούν τα επίπεδα έκφρασης mRNA των BRCA1, RRM1 και RRM2 από τα κακοήθη κύτταρα και να συσχετιστούν τα επίπεδα αυτών με τη κλινική απάντηση σε 1^{ης} γραμμής Χ/Θ με docetaxel και gemcitabine σε ασθενείς με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα.

Με δεδομένο τα κενά έρευνας στο χώρο της φαρμακογενωμικής στα καρκινώματα πνεύμονα και στην ανάγκη στοχοποίησης νέων δεικτών για τη κλινική πρόβλεψη της απάντησης στη χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής με docetaxel και gemcitabine, καθώς επίσης και για τη κλινική

αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της ανωτέρω θεραπείας στους ηλικιωμένους, το πρωτόκολλο της παρούσας διδακτορικής διατριβής έθεσε τους παραπάνω ειδικούς στόχους ώστε να προσεγγίσει σφαιρικότερα τη θεραπευτική πρόβλεψη ορισμένων πολύ κοινών ιστολογικών τύπων καρκίνου του πνεύμονα μέσω της σύγχρονης φαρμακογενετικής θεώρησης.

IV. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. ΚΛΙΝΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ (Στόχος 1)

1. ΑΣΘΕΝΕΙΣ – ΜΕΘΟΔΟΙ

ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΕΙΣΑΓΩΓΗΣ

Πρόκειται για μια πολυκεντρική μελέτη φάσης II με ένα σκέλος στην οποία εντάχθηκαν ασθενείς στους οποίους δεν είχε προηγηθεί σχήμα Χ/Θ, ηλικίας >70 ετών με ιστολογική ή κυτταρολογική διάγνωση αδενοκαρκινώματος πνεύμονα. Άλλα κριτήρια εισαγωγής περιελάμβαναν: νόσο σταδίου IIIB με πλευριτική συλλογή (με κυτταρολογική απόδειξη ύπαρξης κακοήθων κυττάρων) και σταδίου IV, ECOG performance status 0-2, προσδόκιμο επιβίωσης ≥ 12 εβδομάδων, ύπαρξη τουλάχιστον μίας βλάβης έξω από πεδίο προηγούμενης Α/Θ μετρήσιμη σε δύο διαστάσεις, επαρκή μυελό των οστών (απόλυτος αριθμός ουδετερόφιλων [ANC] ≥ 1500 /dl, αριθμός αιμοπεταλίων [PLT] ≥ 100.000 /dl), ικανοποιητική νεφρική λειτουργία (κρεατινίνη ορού $\leq 1,5$ χ το ανώτερο φυσιολογικό όριο) και ικανοποιητική ηπατική λειτουργία (χολερυθρίνη $\leq 1,5$ χ το ανώτερο φυσιολογικό όριο, οξαλοξική [SGOT] και πυροσταφυλική [SGPT] τρανσαμινάση ορού $\leq 2,5$ χ το ανώτερο φυσιολογικό όριο). Κατάλληλοι επίσης κρίθηκαν οι ασθενείς με σταθερές εγκεφαλικές μεταστάσεις, μετά τη χειρουργική αφαίρεση τους και/ ή ακτινοβολία εγκεφάλου.

Ασθενείς εξαιρέθηκαν από τη μελέτη εφόσον είχαν ιστορικό άλλης νεοπλασίας (εκτός από καρκίνωμα τραχήλου μήτρας και βασικοκυτταρικό καρκίνωμα δέρματος), καρδιακής νόσου (μη ελεγχόμενη υπέρταση, ασταθή στηθάγχη, συμφορητική καρδιακή ανεπάρκεια, 2^{ου} ή 3^{ου} βαθμού καρδιακό αποκλεισμό, έμφραγμα μυοκαρδίου τους προηγούμενους 6 μήνες ή κοιλιακή αρρυθμία που απαιτούσε αγωγή), περιφερική νευροπάθεια, σοβαρή ψυχιατρική διαταραχή ή ενεργό λοίμωξη. Ασθενείς στους οποίους είχε προηγηθεί Α/Θ συμπεριλήφθηκαν στη μελέτη, εφόσον η θεραπεία είχε ολοκληρωθεί 4 εβδομάδες πριν την εισαγωγή τους και είχαν αναρρώσει πλήρως από όλες τις παρενέργειες. Επιπλέον, σε αυτούς τους ασθενείς έπρεπε να έχει ακτινοβοληθεί $\leq 30\%$ επιφάνειας μυελοπαραγωγού οστού. Μείζονες επεμβάσεις θα έπρεπε να είχαν ολοκληρωθεί 4 εβδομάδες πριν την εισαγωγή των ασθενών στη μελέτη. Το πρωτόκολλο Χ/Θ εγκρίθηκε από την Επιστημονική Επιτροπή όλων των συμμετεχόντων νοσοκομείων και όλοι οι ασθενείς έδωσαν γραπτή συγκατάθεση για την θεραπεία.

Επιπλέον, στο εργαστηριακό τμήμα της έρευνας (φαρμακογενωμική μελέτη), εντάχθηκαν 75 ασθενείς με διαθέσιμο βιολογικό υλικό (βιοψία από τον πρωτοπαθή όγκο). Οι ασθενείς αυτοί είχαν θεραπευθεί με το ίδιο χημειοθεραπευτικό σχήμα (docetaxel – gemcitabine) στο πλαίσιο διάφορων θεραπευτικών πρωτοκόλλων.

ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Η gemcitabine (GEMZAR; Eli Lilly, Indianapolis, USA) χορηγήθηκε σε δόση $1100\text{mg}/\text{m}^2$ με ενδοφλέβια έγχυση διάρκειας 30 min στις μέρες θεραπείας 1 και 8. Η docetaxel (Taxotere; Sanofi-Aventis, Collegenille, USA) χορηγήθηκε σε δόση $100\text{mg}/\text{m}^2$ σε ωριαία ενδοφλέβια έγχυση, την 8^η μέρα μετά τη χορήγηση της gemcitabine. Όλοι οι ασθενείς έλαβαν προετοιμασία με dexamethasone (4mg per os, 12h και 4h πριν τη χορήγηση της docetaxel και στη συνέχεια κάθε 8h για τις επόμενες δύο μέρες), καθώς και σταθερό αντιεμετικό σχήμα με ondansertone. Οι κύκλοι θεραπείας επαναλαμβάνονταν κάθε 21 μέρες σε βάση εξωτερικού ιατρείου. Ανασυνδυασμένος ανθρώπιος αυξητικός παράγοντας των ουδετερόφιλων (rhG-CSF; Granocyte; Sanofi-Aventis, Bridgewater, NJ, USA) χορηγούνταν υποδορίως ($150\mu\text{g}/\text{m}^2$) στους ασθενείς από την ημέρα 9 έως την 15, ή έως ότου ο απόλυτος αριθμός των ουδετερόφιλων να είναι τουλάχιστον $\geq 1000/\text{dl}$ σε δύο διαδοχικές μετρήσεις μετά τη χαμηλότερη τιμή.

Οι δόσεις των χημειοθεραπευτικών σκευασμάτων προσαρμόζονταν ανάλογα με την αιματολογική και μη-αιματολογική τοξικότητα. Σε περίπτωση αιματολογικής τοξικότητας (απόλυτος αριθμός ουδετερόφιλων $\text{ANC} \leq 500/\mu\text{l}$ για ≥ 7 ημέρες, εμπύρετος ουδετεροπενία, αναιμία βαθμού 4, θρομβοπενία βαθμού 4 ή επεισόδια αιμορραγίας που απαιτούσαν μετάγγιση αιμοπεταλίων) και σε \geq από στάδιο 3 NCI-CTC μη αιματολογικής τοξικότητας (εκτός από ναυτία/έμετο), οι δόσεις docetaxel

και gemcitabine μειωνόταν κατά 25% στους επόμενους κύκλους. Εάν η σοβαρή αιματολογική ή μη τοξικότητα επέμενε παρά την ελάττωση των δόσεων, η θεραπεία διακόπτονταν. Μείωση της δόσης της docetaxel κατά 25% πραγματοποιούνταν σε εμφάνιση σοβαρής (\geq βαθμού 2) μυαλγίας/αρθραλγίας ή σε νευροαισθητική τοξικότητα. Η θεραπεία διακόπτονταν σε περιπτώσεις: σοβαρής (\geq βαθμού 2) μυαλγίας/αρθραλγίας που διαρκούσε \geq από 7 ημέρες, $>$ βαθμού 3 ηπατοτοξικότητας, νευροτοξικότητας, συμπτωματικής αρρυθμίας ή άλλης σημαντικής βαθμού 3 ή 4 τοξικότητας κάποιου οργάνου (εκτός αλωπεκίας και έμετου) που δεν αποκαθίσταται μετά από 2 εβδομάδες. Η θεραπεία συνεχιζόταν σε απουσία επιδείνωσης νόσου και μη-αποδεκτής τοξικότητας για το ανώτερο 6 κύκλους (3 επιπλέον κύκλοι επιτρέπονταν στους ασθενείς με συνεχή απάντηση της νόσου, σύμφωνα με τη κλινική κρίση του θεράποντος ιατρού).

ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ

Η προ θεραπείας εκτίμηση περιελάμβανε: φυσική εξέταση, ακτινογραφίες θώρακος, ηλεκτροκαρδιογράφημα (ΗΚΓ), πλήρη γενική αίματος και βιοχημικό έλεγχο. Η σταδιοποίηση γινόταν με αξονικές τομογραφίες (CT) θώρακος, άνω-κάτω κοιλίας και εγκεφάλου. Οι ασθενείς επίσης υποβάλλονταν σε ολόσωμο σπινθηρογράφημα οστών και επιπλέον ακτινολογικό έλεγχο (εφόσον υπήρχε ένδειξη). Στη διάρκεια της θεραπείας εκτελούνταν φυσική εξέταση, ΗΚΓ, αιματολογικοί και βιοχημικοί

προσδιορισμοί σε κάθε κύκλο. Νευρολογική εκτίμηση πραγματοποιούνταν εφόσον οι ασθενείς ανέφεραν συμπτώματα ενδεικτικά σοβαρής νευροτοξικότητας (\geq βαθμού 2).

Πριν από κάθε κύκλο θεραπείας, οι ασθενείς υποβάλλονταν σε λήψη ιστορικού και φυσική εξέταση για να εκτιμηθούν τα συμπτώματα που σχετίζονταν με τη νόσο και με τη τοξικότητα της θεραπείας. Στη διάρκεια της θεραπείας, πλήρης αιματολογικός έλεγχος με γενική αίματος και αριθμό αιμοπεταλίων γινόταν κάθε εβδομάδα, ή σε περίπτωση βαθμού 3-4 ουδετεροπενίας ή θρομβοπενίας ή εμπυρέτου ουδετεροπενίας κάθε μέρα, μέχρι ανάρρωση του μυελού. Βιοχημικός έλεγχος εκτελούνταν κάθε 3 εβδομάδες. Βλάβες που ήταν μετρήσιμες με τη κλινική εξέταση καταγράφονταν μετά κάθε κύκλο θεραπείας, ενώ όλοι οι ασθενείς εκτιμούνταν για απάντηση στη θεραπεία με αξονικές τομογραφίες κάθε 3 κύκλους Χ/Θ. Όλες οι απαντήσεις επιβεβαιώνονταν από ομάδα ανεξάρτητων ακτινολόγων. Όλοι οι ασθενείς που έλαβαν τουλάχιστον 1 κύκλο θεραπείας αξιολογήθηκαν για τοξικότητα, η οποία σταδιοποιήθηκε σύμφωνα με τα National Cancer Institute Common Toxicity Criteria, έκδοση 2.0 [**National Cancer Institute: Common Toxicity Criteria v2:** <http://ctep.cancer.gov/reporting/ctc.html>]. Η απάντηση στη θεραπεία αξιολογούνταν κάθε 3 κύκλους Χ/Θ σύμφωνα με τα κριτήρια απάντησης του WHO (Miller et al., 1981).

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ

Πρόκειται για πολυκεντρική, (ανοιχτή) open-label, φάσης II μελέτη με πρωτεύοντα σκοπό να αξιολογήσει το συνολικό ποσοστό απάντησης σε docetaxel και gemcitabine των ηλικιωμένων ασθενών με αδenoκαρκίνωμα πνεύμονα. Δευτερεύοντες στόχοι αποτελούσαν η επιβίωση και η τοξικότητα. Το μέγεθος του δείγματος βασίσθηκε στο μοντέλο δύο σταδίων του Simon, θεωρώντας ότι το αναμενόμενο ποσοστό απάντησης θα ήταν τουλάχιστον 32% και το ελάχιστο αποδεκτό ποσοστό 18%, οπότε ένα δείγμα 28 ασθενών απαιτούνταν για το πρώτο βήμα. Εάν παρατηρούνταν το ελάχιστο 6 απαντήσεις, το σύνολο των ασθενών θα αυξανόταν σε 75. Ως εκ τούτου, εάν συνέβαιναν τουλάχιστον 18 απαντήσεις, η πιθανότητα αποδοχής θεραπείας με πραγματικό ποσοστό απάντησης λιγότερο του 18%, θα ήταν 5%. Από την άλλη μεριά, το ρίσκο απόρριψης μιας θεραπείας (στο δεύτερο βήμα) με ποσοστό απάντησης περισσότερο από 32%, θα ήταν 20%. Αυτό το μέγεθος δείγματος είχε επίσης επαρκή ισχύ, όσον αφορά τη συνολική επιβίωση (ελάχιστη 37 εβδομάδες), για να υποστηρίξει τη σύγκριση του σχήματος DG με vinorelbine (**Friedlin et al., 2003**).

Η διάμεση TTP και η ολική επιβίωση υπολογίσθηκαν από την αρχή της θεραπείας μέχρι τη πρώτη αποδεδειγμένη επιδείνωση νόσου ή το θάνατο, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα λογοκρίνονταν σε περίπτωση που κάποιος στόχος δεν είχε επιτευχθεί στο χρόνο του τελευταίου ελέγχου ή εάν ο ασθενής είχε χαθεί από τον επανέλεγχο (follow up). Η μέθοδος Kaplan-

Meier χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση της διάρκειας απάντησης, TTP και συνολικής επιβίωσης (**Kaplan & Meier, 1958**). Η μονοπαραμετρική ανάλυση της TTP και επιβίωσης χρησιμοποίησε το log-rank test για να εξετάσει την επίδραση των διαφορετικών κλινικών παραμέτρων αναφοράς. Ανάλογα μοντέλα κινδύνου προσαρμόστηκαν στα δεδομένα της TTP και ολικής επιβίωσης για να εκτιμήσουν την επίδραση των διάφορων κλινικών παραμέτρων (**Cox, 1972**).

B. ΦΑΡΜΑΚΟΓΕΝΩΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ (Στόχοι 2α και 2β)

1. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1α. ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΑΣΘΕΝΩΝ

Χρησιμοποιήθηκε αρχειακό υλικό από τον πρωτοπαθή όγκο ασθενών οι οποίοι είχαν λάβει χημειοθεραπεία πρώτης γραμμής για προχωρημένο ΜΜΚΠ (καρκινωματώδη πλευριτική συλλογή ή απομακρυσμένες μεταστάσεις) που είχαν υποβληθεί σε θεραπεία 1^{ης} γραμμής με βάση το συνδυασμό γεμισταβίνη-δοσιταξέλης, στα πλαίσια προοπτικών κλινικών μελετών της Ελληνικής Ογκολογικής Ερευνητικής Ομάδας. Το υλικό αξιολογήθηκε στο Εργαστήριο Παθολογικής Ανατομικής του Παν. Νοσοκομείου Ηρακλείου, και επιλέχθηκαν οι κύβοι παραφίνης που ήταν πιο αντιπροσωπευτικοί για τον όγκο από εξειδικευμένο παθολογοανατόμο (κ. Α Κουτσόπουλος).

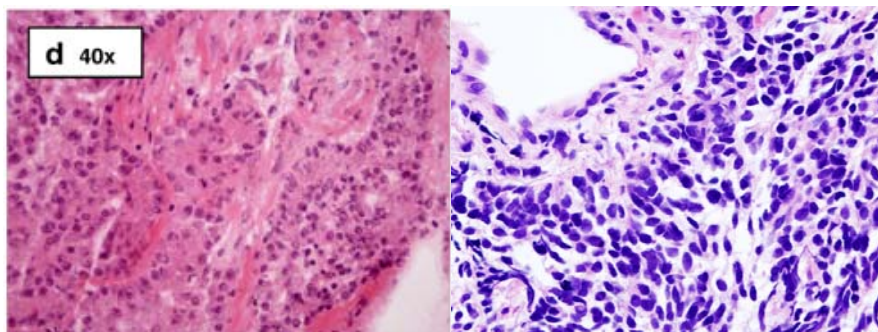
3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ-ΤΕΧΝΙΚΕΣ

3α. ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΧΡΩΣΗ ΑΙΜΑΤΟΞΥΛΙΝΗΣ- ΗΩΣΙΝΗΣ

Η χρώση αιματοξυλίνης- ηωσίνης είναι μία από τις συνηθέστερες και πιο διαδεδομένες ιστολογικές χρώσεις που χρησιμοποιούνται στην παθολογοανατομία. Χρησιμοποιείται συνήθως για τον χρωματισμό ιστολογικών τομών παραφίνης οι οποίες έχουν δημιουργηθεί νωρίτερα με τη βοήθεια ειδικού μικροτόμου. Η χρώση αυτή πραγματοποιείται με τον συνδυασμό δύο επιμέρους χρωστικών, της αιματοξυλίνης και της ηωσίνης.

Οι χρωστικές που χρησιμοποιούνται προέρχονται συνήθως από τη χημεία χρωμάτων ενδυμάτων και μπορούν να προσκολληθούν στις κυτταρικές δομές λόγω φορτίου ή άλλων δυνάμεων. Πρόκειται για έγχρωμα, ιονιζόμενα οργανικά μόρια που συνήθως περιέχουν έναν ή περισσότερους αρωματικούς δακτυλίους με δομές συντονισμού. Τα μόρια αυτά, απορροφούν φωτόνια σε συγκεκριμένα μήκη κύματος ενώ αφήνουν ελεύθερα τα υπόλοιπα φωτόνια που διαπερνώντας τα μόρια αυτά τους προσδίδουν χαρακτηριστικό χρώμα. Ανάλογα με το είδος του χρωμοφόρου μορίου που φέρει μία χρωστική το χρώμα φυσικά είναι διαφορετικό. Η αιματοξυλίνη δεσμεύεται από τα βασεόφιλα/όξινα μέρη του κυττάρου όπως τον πυρήνα, προσδίδοντας έντονο μωβ-μπλε χρώμα. Αντίθετα, η ηωσίνη δεσμεύεται από τα οξεόφιλα/βασικά μέρη

χρωματίζοντας με ιώδες-ερυθρό χρώμα τις υπόλοιπες κυτταρικές δομές.



Εικόνα 8^α Πλακώδες καρκίνωμα

Εικόνα 8^β Αδενοκαρκίνωμα

Το διχρωματικό τελικά αποτέλεσμα επιτρέπει τη μικροσκοπική παρατήρηση του ιστού που υπάρχει στην τομή της αντικειμενοφόρου (Εικόνα 8^α και 8^β). Είναι έτσι δυνατόν να εντοπιστούν οι μη-φυσιολογικές κυτταρικές δομές και, κατά συνέπεια, να διαχωριστούν και τα καρκινικά από τα μη-καρκινικά τμήματα του ιστού που ενδιαφέρει τις εργασίες του παρόντος εργαστηρίου. Η μέθοδος της χρώσης που ακολουθήθηκε για τους σκοπούς της εργασίας αυτής, είναι η ακόλουθη:

Υλικά-συσκευές:

- Κλίβανος θέρμανσης
- Ειδική απαγωγός για την αποφυγή επαφής με πτητικές ουσίες
- Πλαστικοί φορείς αντικειμενοφόρων με λαβή για τη μεταφορά τους και τον εμβαπτισμό τους στα απαραίτητα διαλύματα
- Γυάλινα σκεύη για τη τοποθέτηση των υγρών διαλυμάτων εμβαπτισμού
- Ξυλόλη για τη διαύγαση των ιστών
- Αιθανόλη συγκέντρωσης 100%
- Αιθανόλη συγκέντρωσης 95%

- ➔ Αιθανόλη συγκέντρωσης 70%
- ➔ Απεσταγμένο νερό
- ➔ Αιματοξυλίνη (Sigma-Aldrich Mayer's hematoxylin solution)
- ➔ Ηωσίνη αραίωσης 0.5%w/v (Riedel-de-Haen Eosin Y disodium salt purum for microscopy M=691.85g/Mol)
- ➔ Απορροφητικό χαρτί
- ➔ Τομές παραφίνης με έγκλειστο ιστό τοποθετημένες σε αντικειμενοφόρους πλάκες.

Μέθοδος:

- ➔ Αρχικά, ο κλίβανος προθερμαίνεται ώστε να επιτύχουμε θερμοκρασία 50-55°C. Τοποθετούνται έπειτα σε αυτόν οι αντικειμενοφόροι που έχουν τοποθετηθεί στους πλαστικούς φορείς. Αφήνουμε στον κλίβανο τις τομές για διάστημα 6-10 λεπτών, διάστημα επαρκές για να λιώσει ελαφρά η παραφίνη και να διευκολυνθεί η περαιτέρω διαδικασία χωρίς όμως να υπερθερμανθεί και να ξεκολλήσει η τομή. Είναι πολύ σημαντικό για να είναι επιτυχής η χρώση, οι χρόνοι που αναφέρονται στην διαδικασία αυτή να τηρούνται με ακρίβεια.
- ➔ Ακολουθεί το στάδιο της ενυδάτωσης του με διαδοχικές εμβάπτισεις σε φθίνουσες συγκεντρώσεις αιθανόλης αφού πρώτα οι τομές εμβάπτιστούν σε ξυλόλη:
 - Εμβάπτιση σε ξυλόλη για 6 λεπτά
 - Εμβάπτιση σε 100% αιθανόλη για 1 λεπτό
 - Εμβάπτιση σε 95% αιθανόλη για 30 δευτερόλεπτα

- Εμβάπτιση σε 70% αιθανόλη για 30 δευτερόλεπτα
 - Ξέπλυμα με απεσταγμένο νερό (0% αιθανόλη)
- Έπειτα πραγματοποιήθηκε εμβάπτιση στην αιματοξυλίνη για 30 δευτερόλεπτα ώστε να χρωματιστούν οι πυρήνες
- Ακολουθούν δύο ξεπλύματα με απεσταγμένο νερό ώστε να απομακρυνθεί η μη δεσμευμένη αιματοξυλίνη
- Έπειτα πραγματοποιήθηκε εμβάπτιση στην ηωσίνη για 1 λεπτό ώστε να χρωματιστούν τα οξεόφιλα.
- Στη συνέχεια θα πρέπει ο ιστός να απαλλαχθεί από τη μη δεσμευμένη ηωσίνη και επίσης να αφυδατωθεί ξανά οπότε γίνονται τα ακόλουθα:
- Εμβάπτιση σε 95% αιθανόλη για 30 δευτερόλεπτα
 - Εμβάπτιση σε 95% αιθανόλη για 30 δευτερόλεπτα
 - Εμβάπτιση σε 95% αιθανόλη για 30 δευτερόλεπτα
 - Εμβάπτιση σε 100% αιθανόλη για 30 δευτερόλεπτα
- Τέλος ακολουθεί διαύγαση σε ξυλόλη με εμβάπτιση για 1-2 λεπτά
- Οι τομές στεγνώνουν ελεύθερες και αποθηκεύονται στις ειδικές καρτέλες μεταφοράς τους έως τη παρατήρησή τους και την επεξεργασία τους για απομόνωση επιθυμητών δομών με τη βοήθεια μικροσκοπίου-micro dissector.

3β. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

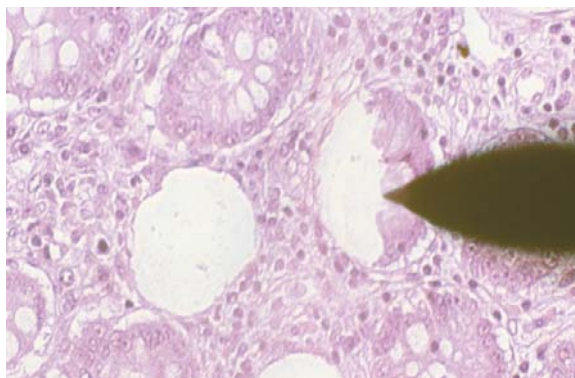
Η επιλογή των καρκινικών κυττάρων από της χρωματισμένες τομές, έγινε με τη βοήθεια ανεστραμμένου μικροσκοπίου και τη χρήση πιεζοηλεκτρικού-micro dissector (Eppendorf, Εικόνα 9). Ο μικροτόμος αυτός φέρει δύο βραχίονες οι οποίοι προσαρμόζονται στο ανεστραμμένο μικροσκόπιο. Στην άκρη του ενός βραχίονα προσαρμόζεται νυστερίδιο το οποίο μέσω του βραχίονα συνδέεται με πηγή εκπομπής υπερήχων. Ο έτερος βραχίονας συνδέεται με ρύγχος αναρρόφησης. Και οι δύο βραχίονες συνδέονται στη συνέχεια με μικροχειριστήρια (joy stick).



Εικόνα 9.
Πιεζοηλεκτρικός
microdissector
Eppendorf

Ο χειριστής μέσω των μικροχειριστηρίων επιλέγει και κόβει τα καρκινικά κύτταρα με το νυστερίδιο και τα αναρροφά με το ρύγχος. Το μικροσκόπιο συνδέεται μέσω CCD κάμερας με υπολογιστή για λήψη φωτογραφιών και για λόγους διασφάλισης της ποιότητας (παρακολούθηση χειριστή από πλέον πεπειραμένο προσωπικό). Τα κύτταρα που έχουν απομονωθεί συλλέγονται σε σωληνάρια τύπου

erpendorf και επεξεργάστηκαν έπειτα για να αποπαραφινωποιηθούν με τη διαδικασία που περιγράφεται παρακάτω.



Εικόνα 10.
Λειτουργία
πιεζοηλεκτρικού
microdissector
Erpendorf

3γ. ΑΠΟΠΑΡΑΦΙΝΟΠΟΙΗΣΗ

Η έγκλειση των ιστών σε κύβους παραφίνης για τη μονιμοποίηση-διατήρησή τους απαιτεί το πρωταρχικό βήμα της όποιας επεξεργασίας του ιστού ακολουθεί να είναι η αποπαραφινοποίησή του. Η αποπαραφινοποίηση μπορεί να εφαρμοστεί σε ολόκληρες τομές από κύβους παραφίνης, είτε σε μικρότερη κλίμακα, σε microdissected κύτταρα που έχουν απομονωθεί από τομή. Για την εργασία αυτή χρησιμοποιήθηκε η δεύτερη περίπτωση.

Υλικά-συσσκευές:

- Αιθανόλη συγκέντρωσης 100%
- Μηχάνημα φυγοκέντρωσης (erpendorf centrifuge)
- Πιπέτα συλλογής υγρών χωρητικότητας 1000μl και ρύγχη

Μέθοδος:

Η αποπαραφινολοποίηση microdissected κυττάρων που προηγείται της περαιτέρω επεξεργασίας τους όπως η κυτταρική λύση, είναι σύντομη εξαιτίας της μικρότερης ποσότητας παραφίνης που φέρουν σε σχέση με τις τομές. Τα τοποθετημένα σε αιθανόλη δείγματα, φυγοκεντρώνονται σε 10.000 rpm για 5 λεπτά στους 4°C. Το υπερκείμενο αφαιρείται και ακολουθεί μία πλύση με απόλυτη (100%) αιθανόλη. Τα δείγματα αναδεύονται και φυγοκεντρώνονται για 5 λεπτά σε 10.000 rpm στους 4°C. Η αιθανόλη αφαιρείται και ακολουθεί άλλος ένας κύκλος πλύσης-φυγοκέντρησης απομόνωσης κυτταρικής πελέτας. Εξαιρετικής σημασίας είναι να αποφευχθεί ή δυνατόν η απώλεια υλικού κατά τη διαδικασία αυτή καθώς και η πλήρης αφαίρεση της αιθανόλης, η οποία αναστέλλει τη δράση της πρωτεϊνάσης και ως εκ τούτου της πρωτεϊνικής πέψης.

35. ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΛΥΣΗ-ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗ ΠΕΨΗ

Η κυτταρική λύση είναι ένα απαραίτητο στάδιο προκειμένου να απομονωθούν νουκλεϊκά οξέα για περαιτέρω μελέτη. Για τον σκοπό αυτό, χρησιμοποιείται ένα ειδικό διάλυμα λύσης και μία ενζυμική πρωτεϊνάση. Ειδικότερα, για τη λύση κυττάρων που έχουν απομονωθεί επιλεκτικά από τομή παραφίνης με διαδικασία microdissection και έχουν αποπαραφινολοποιηθεί, ακολουθείται το παρακάτω πρωτόκολλο .

Υλικά-συσσκευές:

- Σωληνάρια τύπου erpendorf χωρητικότητας 1,5 ml

- Σωληνάρια τύπου erpendorf χωρητικότητας 1,5 ml όπου περιέχονται τα αποπαραφινωποιημένα κύτταρα, απαλλαγμένα από την αιθανόλη της αποπαραφινωποίησης.
- Διάλυμα λύσης (10mM Tris, 0,1mM EDTA, 2% SDS)
- Ένζυμο πρωτεϊνάσης: proteinase k, Qiagen(>600 mAU/ml, 20 mg/ml, διάλυμα)
- Πιπέτα συλλογής υγρών χωρητικότητας 1000μl και ρύγχη
- Θερμική συσκευή επώασης με ανάδευση (erpendorf thermomixer comfort)

Μέθοδος:

Παρασκευάστηκε το διάλυμα λύσης σε τελικό όγκο αντίστοιχο του αριθμού των κυτταρικών δειγμάτων, υπολογίζοντας όγκο 400μl για κάθε σωληνάριο-δείγμα. Προστέθηκε στα σωληνάρια όπου περιέχονταν τα κύτταρα προς λύση, 400μl από το διάλυμα λύσης και κατόπιν 30μl πρωτεϊνάσης (10mg/ml). Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στην θερμική συσκευή επώασης σε θερμοκρασία 60°C με ανάδευση για την διευκόλυνση της πλήρους ενζυμικής λύσης. Η επώαση γινόταν για 16 τουλάχιστον ώρες (overnight). Δόθηκε προσοχή ώστε τα κύτταρα στα οποία προστέθηκε το διάλυμα λύσης και το ένζυμο να είναι απαλλαγμένα από την αιθανόλη με την οποία προηγουμένως αποπαραφινωποιήθηκαν, επειδή αυτή είναι ανασταλτικός παράγοντας της ενζυμικής δράσης της πρωτεϊνάσης K.

3ε. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΚΑΙ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ RNA (RNA EXTRACTION)

Η εκχύλιση των νουκλεϊκών οξέων από τους ιστούς και ο καθαρισμός τους, βασίσθηκε στο Trizol LS, το οποίο είναι μονοφασικό διάλυμα φαινόλης και ισοθειοκυανικής γουανιδίνης. Είναι τοξικό για αυτό η χρήση του γίνεται με προσοχή και κατά προτίμηση σε απαγωγό χημικών αερίων (hood).

Υλικά-συσσκευές:

- Ισοπροπανόλη
- Χλωροφόρμιο
- 75% αιθανόλη παρασκευασμένη με DEPC νερό (νερό κατεργασμένο με διαιθυλοπυροκαρβονικό εστέρα)
- Γλυκογόνο (Roche 20mg/ml)
- Οξικό νάτριο
- Σωληνάρια τύπου erpendorf
- Πιπέτες συλλογής υγρών και ρύγχη
- Μηχάνημα φυγοκέντρωσης (erpendorf centrifuge)

Μέθοδος:

Αρχικά, απαλλάχθηκαν τα λυμένα από το ένζυμο της πρωτεϊνάσης κύτταρα, από τις ακαθαρσίες της λύσης, μετά από φυγοκέντρωση για 1 λεπτό σε 12.000rpm στους 4°C. Συλλέγεται έπειτα προσεχτικά, σε σωληνάρια χωρητικότητας 2ml το υπερκείμενο, το οποίο είχε όγκο περίπου 430μl, σύμφωνα με το στάδιο της λύσης που προηγήθηκε.

Προστίθεται περίπου τριπλάσιος όγκος Trizol ($\approx 1200\mu\text{l}$) και μετά από ανάδευση με το χέρι, τα δείγματα επωάζονται στον πάγο για 5 λεπτά περίπου. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η πλήρης αποσύνδεση των νουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων.

Ακολούθως προστίθεται χλωροφόρμιο σε αναλογία: 0.2ml χλωροφόρμιο/ 1ml Trizol. Τα δείγματα ανακινούνται πολύ καλά και επωάζονται 2 με 3 λεπτά σε πάγο. Έπειτα φυγοκεντρώνονται σε 12.000g για 15 λεπτά στους 4°C , με αποτέλεσμα να προκύψουν δύο φάσεις. Η οργανική φάση στο κάτω μέρος και μία υδατική στο επάνω. Το RNA, χάρη στο χλωροφόρμιο συγκεντρώνεται μόνο στην υδατική φάση η οποία και συλλέγεται με προσοχή σε καθαρό σωληνάριο, φροντίζοντας να μην μείνουν ίχνη της οργανικής. Προστίθεται έπειτα ίσος όγκος χλωροφορμίου και κατόπιν ανάδευσης, επωάζεται με αυτό στον πάγο για 5 λεπτά. Κατόπιν, τα δείγματα φυγοκεντρώνονται σε 12.000g για 8 λεπτά στους 4°C .

Μετά τη συλλογή της υδατικής φάσης σε καθαρά σωληνάρια, προστίθεται $2.5\mu\text{l}$ γλυκογόνου για κάθε δείγμα ($50\mu\text{g}$ συνολικά). Το γλυκογόνο, συγκεντρώνεται και εγκλωβίζεται στη ζελατινώδη υφή του το RNA. Έπειτα προστίθεται οξικό νάτριο όγκου ίσου με το $1/10$ του υπάρχοντος στα δείγματα. Το οξικό νάτριο, σε 1 λεπτό περίπου κατακρημνίζει τα νουκλεϊκά οξέα. Τέλος προστίθεται ισοπροπανόλη σε αναλογία $1/1$ με τον όγκο της υδατικής φάσης. Τα δείγματά αναδεύονται

και τοποθετούνται σε θερμοκρασία -80°C για 16 ώρες, ώστε να ολοκληρωθεί η κατακρήμνιση.

Μετά από το στάδιο αυτό, τα δείγματα φυγοκεντρούνται σε 12.000 rpm για 10 λεπτά στους 4°C . Το RNA σχηματίζεται σε ζελατινώδη πελέτα. Αφαιρείται το υπερκείμενο και εκπλύεται 2 φορές με αιθανόλη 75% κάθε μία από τις οποίες ακολουθήθηκε από ανάδευση και φυγοκέντρηση σε 12.000rpm για 5 λεπτά στους 4°C . Η αιθανόλη έχει την ιδιότητα να αφαιρεί τις προσμίξεις του RNA σε άλατα που υπάρχουν. Μετά από την τελευταία φυγοκέντρηση, αφαιρείται και η τελευταία αιθανόλη όσο το δυνατόν ακριβέστερα και αφήνονται οι πελέτες να στεγνώσουν.

ΧΡΗΣΗ DNAase ΓΙΑ ΤΗΝ ΔΙΑΣΠΑΣΗ ΤΟΥ DNA

Στο σημείο αυτό, η απομόνωση του RNA έχει ολοκληρωθεί. Ωστόσο, στη περίπτωση που η μοριακή μελέτη που θα ακολουθήσει επηρεάζεται από την ύπαρξη DNA που μέρος του επίσης απομονώθηκε με τη παραπάνω διαδικασία (κυρίως DNA χαμηλού μοριακού βάρους), απαιτείται η απαλλαγή από αυτό. Η ανάγκη αυτή υπήρχε στην παρούσα εργασία. Χρησιμοποιήθηκε έτσι, το ένζυμο της DNAάσης το οποίο θραυσματοποιώντας το DNA, το καθιστά ανενεργό και «αόρατο» στις επόμενες μοριακές τεχνικές.

Υλικά-συσσκευές:

- ➔ DEPC νερό
- ➔ DNάση (rDNase I συγκέντρωσης 2 units/μl, Ambion)

- ➔ Ρυθμιστικό διάλυμα DNάσης (10X DNase buffer, Ambion)
- ➔ Παράγοντας απενεργοποίησης της DNάσης (DNase inactivation reagent, Ambion)
- ➔ Σωληνάρια τύπου eppendorf
- ➔ Πιπέτες συλλογής υγρών και ρύγχη
- ➔ Μηχάνημα φυγοκέντρησης (eppendorf centrifuge)
- ➔ Θερμική συσκευή επώασης

Μέθοδος:

Αρχικά, διαλυτοποιείται η πελέτα σε 10μl νερό. Προστίθεται έπειτα σε κάθε δείγμα, 1μl του ρυθμιστικού διαλύματος και 1μl του ενζύμου. Κατόπιν ανάδευσης, επωάζονται στους 37°C για 30 λεπτά. Έπειτα προστίθενται 2μl από τον παράγοντα απενεργοποίησης ο οποίος αφέθηκε να δράσει 3-4 λεπτά με ελαφριά ανάδευση. Τα δείγματα φυγοκεντρώνται για 2 λεπτά, σε 10.000rpm στους 4°C. Με αυτόν τον τρόπο, ο παράγοντας απενεργοποίησης ο οποίος έχει λευκή μορφή και ρητινώδη υφή, μένει στο κάτω μέρος του σωληναρίου. Συλλέγεται σε σωληνάριο το μέρος που έφερε το RNA. Ο λόγος απομάκρυνσης της ρητίνης είναι ότι επηρεάζει τη μετέπειτα μέτρηση της συγκέντρωσης του RNA στη φασματοφωτομετρική συσκευή.

3στ. ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΟΥ RNA ΚΑΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΕΙΔΙΚΟΥ ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΟΥ



Η ποσότητα του RNA που απομονώθηκε με τις τεχνικές που αναφέρθηκαν παραπάνω, είναι σκόπιμο να προσδιοριστεί και επίσης να καθοριστεί ο βαθμός ύπαρξης άλλων προσμίξεων. Αυτό μπορεί να γίνει με τη βοήθεια ειδικής φασματοφωτομετρικής συσκευής. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιείται συσκευή Nanodrop spectrophotometer η οποία επιτρέπει τους παραπάνω υπολογισμούς σε εξαιρετικά μικρούς όγκους διαλυμάτων με επαρκή ακρίβεια.

Η συσκευή αυτή, προσδιορίζει μεταξύ άλλων, 3 σημαντικές τιμές. Πρόκειται για α) τη συγκέντρωση του RNA του μετρούμενου διαλύματος σε ng RNA/μl διαλύματος, β) τη τιμή του λόγου 260/280 γ) τη τιμή του



λόγου 260/230. Τα νουκλεϊκά οξέα απορροφούν στα 260 nm. Οι πρωτεΐνες και ο αρωματικός δακτύλιος της φαινόλης, απορροφούν στα 260 αλλά και στα 280 nm όπου δεν απορροφούν τα νουκλεϊκά οξέα. Σε γενικές γραμμές, για να θεωρείται ένα δείγμα καθαρό θα πρέπει η απορρόφηση στα 260 να είναι σχεδόν διπλάσια αυτής στα 280. Ο λόγος δηλαδή απορρόφησης: OD₂₆₀/OD₂₈₀ όπου OD (optical density), πρέπει να είναι κατά το δυνατόν πλησιέστερα στο 2, ενώ ελάχιστο όριο αξιοπιστίας, (εμπιστοσύνης στο ότι η ποσότητα που μετρήθηκε αφορά νουκλεϊκά οξέα και όχι κάτι άλλο), τίθεται το 1.6. Στα 230 nm απορροφούν

κυρίως άλατα και ανόργανες ενώσεις οπότε πραγματοποιείται και ο έλεγχος αυτός.

Η διαδικασία της μέτρησης στη συσκευή είναι πολύ απλή και αυτοματοποιημένη. Ποσότητες διαλύματος όγκου 1-2μl «φορτώνονται» στην ειδική επιφάνεια της συσκευής με τη μορφή σταγόνας (drop) και ακολουθεί η μέτρηση και η εμφάνιση των αντίστοιχων παραμέτρων. Βασικό σημείο της διαδικασίας, είναι ο «μηδενισμός» της συσκευής πριν από την έναρξη των μετρήσεων, χρησιμοποιώντας σταγόνα νερού απαλλαγμένη από νουκλεάσες και νουκλεϊκά οξέα.

Υλικά-συσκευές:

- Συσκευή φασματοφωτομέτρησης Nanodrop και εγκατάσταση προγράμματος συσκευής σε Η/Υ
- Πιπέτα και ρύγχη
- Απορροφητικό χαρτί (kimwipes) με λεία επιφάνεια και υφή
- Σωληνάριο με DEPC νερό (κατά προτίμηση εκείνο με το οποίο έγινε η επαναδιαλυτοποίηση της πελέτας του RNA.



Μέθοδος:

Αφού ανοίγεται το σύστημα της μέτρησης, τοποθετείται ποσότητα 1.5μl DEPC νερού στην ειδική επιφάνεια της συσκευής και ενεργοποιείται η έναρξη των μετρήσεων. Μετά από καθαρισμό της επιφάνειας μέτρησης, επαναλαμβάνεται φόρτωμα νερού για να πραγματοποιηθεί η μέτρηση

blanc δηλαδή η μέτρηση που «μηδενίζει» την συσκευή θεωρώντας τιμή 0 αυτή που προκύπτει από τη μέτρηση αυτή και υπολογίζοντας τις επόμενες που θα ακολουθήσουν σύμφωνα με αυτή. Η διαδικασία αυτή, διασφαλίζει ότι αν στο νερό με το οποίο αραιώθηκε το RNA υπήρχε «μόλυνση» σε νουκλεϊκά οξέα, αυτή δεν θα συνυπολογιστεί. Ακολουθούν οι υπόλοιπες, κανονικές μετρήσεις μετρώντας με προσοχή ποσότητα 1.5μl από την επιφάνεια του RNA. Μεταξύ των μετρήσεων των δειγμάτων στο nanodrop γίνεται μέτρηση και 1.5μl DEPC νερού. Αυτό διασφαλίζει ότι η επιφάνεια της μέτρησης, απαλλάσσεται αποτελεσματικότερα από το προηγούμενο RNA οπότε δεν επηρεάζεται η τιμή της επόμενης.

3ζ. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ PCR (Polymerase Chain Reaction)

Η Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης, είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον επιλεκτικό πολλαπλασιασμό ενός τμήματος DNA ή RNA μεταξύ πολλών άλλων. Η βασική προϋπόθεση στην μέθοδο, είναι οι αλληλουχίες στα άκρα του πολλαπλασιαζόμενου τμήματος να είναι γνωστές. Η αντίδραση PCR πρακτικά μπορεί να εφαρμοστεί σε οποιοδήποτε δείγμα περιέχει νουκλεϊκά οξέα. Έτσι είναι δυνατή στη περίπτωση βιολογικών υγρών, φρέσκων ή παραφιντοποιημένων ιστών, κατεψυγμένων ιστών, ευκαρυωτικών ή προκαρυωτικών κυττάρων, ακόμη και σε «αρχαία» δείγματα που μπορεί να φέρει στο φως η Παλαιοντολογία.

Η μέθοδος, έχει μία σειρά διαφορετικών εφαρμογών που εκτός των άλλων εξαρτώνται και από το είδος του νουκλεϊκού οξέως. Έτσι, ο πολλαπλασιασμός γενωμικού DNA χρησιμοποιείται για τη κλωνοποίηση τμημάτων DNA, την εύρεση μεταλλάξεων, την αλληλούχηση, σε συγκριτικές μελέτες, στον προσδιορισμό αλληλομόρφων, στη διάγνωση και τη μελέτη της πορείας ασθενών κα. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η ποσοτική PCR και επίσης ενδιαφέρον έχει η εφαρμογή της στην εγκληματολογία και στη διεξαγωγή τεστ συγγένειας. Μερικές από τις εφαρμογές της μεθόδου σε RNA ή cDNA (συμπληρωματικό DNA) είναι η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση μεταγράφων που γίνεται με τη PCR πραγματικού χρόνου ή Real Time PCR, ή σύγκριση μεταγραφικών προτύπων, η κλωνοποίηση ακέραιου cDNA, η in situ PCR και άλλες.

Ο πολλαπλασιασμός του επιθυμητού τμήματος, γίνεται σε επαναλαμβανόμενους χρονικά, πανομοιότυπους κύκλους μετά από το πέρας των οποίων κάθε φορά, διπλασιάζεται ο αριθμός των αντιγράφων του προηγούμενου κύκλου. Ισχύει η σχέση $N=N_0 \cdot (1+\alpha/100)^n$ όπου N ο θεωρητικός αριθμός αντιγράφων σε κάθε κύκλο, N_0 ο αρχικός αριθμός τους και n ο αριθμός των κύκλων. Κάθε κύκλος περιλαμβάνει θερμοκρασιακές διακυμάνσεις υψηλής ή λιγότερο υψηλής θερμοκρασίας κατά τις οποίες οι έλικες των νουκλεϊκών οξέων ανοίγουν ή κλείνουν αντίστοιχα. Η διαδικασία δεν συνεχίζεται επ' άπειρων καθώς η αντίδραση αυτή επηρεάζεται από περιοριστικούς παράγοντες όπως ο χρόνος ζωής

του χρησιμοποιούμενου ενζύμου, η επάρκεια ποσότητας και ποιότητας εκκινητών και ελεύθερων νουκλεοτιδίων και άλλοι.

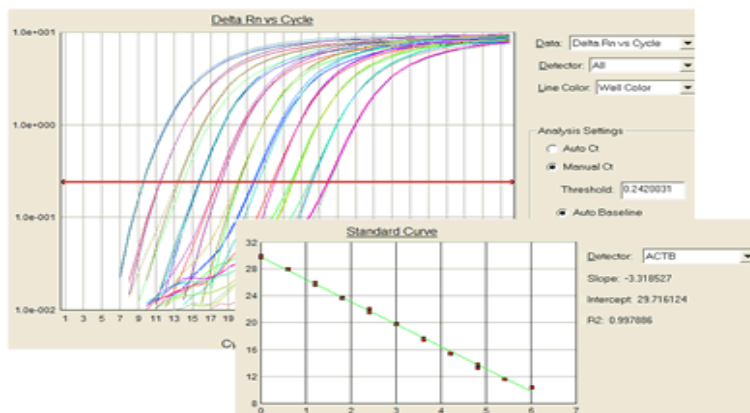
Για τις ανάγκες της εργασίας αυτής, χρησιμοποιήθηκαν δύο εφαρμογές της τεχνολογίας PCR. Πρόκειται για την «αντίστροφη μεταγραφή-PCR» (reverse transcription PCR) ή rt PCR και την «PCR πραγματικού χρόνου» (real time PCR).

Στην rt PCR, αφού γίνει απομόνωση ολικού RNA, απομακρύνεται το γενωμικό DNA με DNAση και ακολουθεί αντίστροφη μεταγραφή του με oligo-dT, τυχαία εξαμερή ή ειδικούς εκκινητές. Τέλος ακολουθεί η PCR στο cDNA προϊόν η οποία είναι ειδική για ένα γονίδιο.

Στην κλασική PCR, η ανίχνευση του προϊόντος γίνεται στο τελευταίο σημείο. Στις ποσοτικές συγκρίσεις η ακρίβεια είναι μικρή, όπως και η ευαισθησία, δεν υπάρχει αυτοματοποιημένη εξαγωγή αριθμητικών αποτελεσμάτων και απαιτούνται στάδια μετά το τέλος της μεθόδου πράγμα που τη καθιστά χρονοβόρο και επιρρεπή σε μολύνσεις διαδικασία. Τα παραπάνω δημιούργησαν την ανάγκη μίας PCR με μεγαλύτερη ευαισθησία και ικανότητα ανίχνευσης πριν το τελικό σημείο και μάλιστα στην εκθετική φάση όπου υπάρχει γραμμική σχέση της ποσότητας του προϊόντος με τη ποσότητα του εκμαγείου. Η ανίχνευση του προϊόντος ώστε να συσχετιστεί με τη ποσότητα του εκμαγείου, έγινε χάρη σε χρωστικές και την ιδιότητα του φθορισμού. Η τροποποιημένη αυτή PCR ονομάστηκε real time PCR.

Η ποσοτικοποίηση στην PCR αυτή γίνεται με τη μελέτη των C_q (quantification cycle). Ως C_q ορίζεται ο κλασματικός αριθμός κύκλων όπου ο φθορισμός μίας αντίδρασης τέμνει τη γραμμή-κατώφλι (threshold). Η γραμμή αυτή τοποθετείται στην εκθετική φάση της PCR λίγο πάνω από την εικόνα του background, όπως φαίνεται στο διάγραμμα της καμπύλης πολλαπλασιασμού στην αντίδραση αυτή. Η ποσοτικοποίηση μπορεί να είναι σχετική ή απόλυτη. Στη σχετική ποσοτικοποίηση, η τελευταία γίνεται σύμφωνα με μία δεδομένη ποσότητα αναφοράς. Η απόλυτη γίνεται με δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς μεταξύ του δεκαδικού λογαρίθμου της ποσότητας του DNA και των C_q για διαδοχικές γνωστές ποσότητες cDNA. Η κλίση της ευθείας δίνει την απόδοση ενώ το R² πρέπει να προσεγγίζει την τιμή 1.

Η RT-qPCR χαρακτηρίζεται από μεγάλη ευαισθησία και ακρίβεια, εξαλείφει στάδια επεξεργασίας μετά τη PCR, υπάρχει μικρός χρόνος της αντίδρασης και γίνονται μαζικές αναλύσεις. Έτσι, η RT-qPCR χρησιμοποιείται σε πλήθος εφαρμογών όπως η μελέτη ιϊκού και μικροβιακού φορτίου, η μέτρηση των αντιγράφων περιοχών DNA σε γονιδιώματα, η διάκριση αλληλομόρφων και πολυμορφισμών και σε ποσοτικές μελέτες γονιδιακής έκφρασης.



Εικόνα 11. RT-qPCR

Ανάστροφη Μεταγραφή

Υλικά-συσκευές:

- Συσκευή rt PCR θερμικού κυκλοποιητή (thermal cycler)
- Σωληνάρια τύπου erpendorf
- Πιπέτες συλλογής υγρών και ρύγχη
- Σωληνάρια ενωμένα σε οκτάδες μικρού μεγέθους
- dNTPs
- Τυχαίοι εκκινητές (random primers)
- Ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης
- DTT
- Απενεργοποιητής RNAσών (RNase out)
- Ένζυμο αντίδρασης (superscript III)

- DEPC νερό
- Εμπορικό RNA για χρήση ως calibrator (Liver, Breast, UPE)

Μέθοδος:

Αρχικά, τοποθετούνται στα ειδικά σωληνάρια οι ποσότητες του RNA σε καθαρή μορφή, απαλλαγμένο από γενωμικό DNA. Τοποθετείται ανά δείγμα συνολικός όγκος 50ng/γονίδιο που μελετήθηκε και επιπλέον η απαραίτητη ποσότητα DEPC νερού για να συμπληρωθεί ο όγκος έως τα 10 μl. Υπάρχει και ένα δείγμα μόνο με νερό σε κάθε οκτάδα (δείγμα RT-), χωρίς RNA, από το οποίο δεν ανιχνεύσαμε πολλαπλασιασμό (αρνητικός μάρτυρας) σε επόμενους χειρισμούς όπως η ηλεκτροφόρηση ή η Real Time PCR. Επίσης στην αντίδραση, χρησιμοποιούμε RNA από φυσιολογικούς ανθρώπινους ιστούς ώστε να μπορεί να γίνει εκτίμηση της ανάστροφης μεταγραφής και ποσοτικοποίηση των γονιδίων του ενδιαφέροντος. Τα δείγματα αυτά θέτουν τη βάση σύγκρισης (calibrators). Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν ως calibrators 3 διαφορετικά εμπορικά RNA (liver, breast, upe) σε ποσότητες: Liver: 1μg (1μl Liver+ 9 μl DEPC), Lung: 1μg (1μl Liver + 9 μl DEPC).

Κατόπιν, ετοιμάζεται ένα συνολικό μίγμα από τα dNTPs και τους random primers (εξαμερή), υπολογίζοντας 500μM για κάθε dNTPs και 250ng random hexamers ανά αντίδραση. Προστίθενται 2μl από αυτό σε κάθε δείγμα RNA καθώς και στον αρνητικό μάρτυρα. Τα δείγματα τοποθετούνται στη συσκευή για 5 λεπτά στους 65°C.

Στο διάστημα αυτό προετοιμάζεται ένα δεύτερο μίγμα για το οποίο υπολογίζεται ανά δείγμα: 4μl ρυθμιστικού διαλύματος 5x, 1μl 0.1M DTT(10mM ανά αντίδραση), 1μl RNase out (32.6 Units ανά αντίδραση) και 1μl superscript III. Μετά τα 5 λεπτά προστίθενται σε κάθε δείγμα 7μl από το μίγμα περιπίπου. Ακλουθούν οι επόμενοι κύκλοι με θερμοκρασίες κατάλληλες για τη δράση του ενζύμου (65°C για 5 λεπτά, 25°C για 10 λεπτά, 42°C για 50 λεπτά, 70°C για 15 λεπτά). Το cDNA αποθηκεύεται στους -80 έως την real time PCR.



Εικόνα 12. ABI PRISM 7900 Sequence Detection System

ΠΟΣΟΤΙΚΗ REAL TIME PCR (RT-qPCRαλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο)

Υλικά-συσσκευές:

- Συσσκευή Real Time PCR με το κατάλληλο λογισμικό σε υπολογιστή AB Prism 7900
- Πλαστικά «πίατα» υποδοχής δειγμάτων (plates)
- Πιπέτες συλλογής υγρών και ρύγχη
- Σωληνάκια ενωμένα σε οκτάδες μικρού μεγέθους

- Μίγμα ποσοτικής PCR (Qiagen real time PCR mix)
- Εκκινητές των γονιδίων που θα εξεταστούν (10 μ M)
- Ανιχνευτές (probes) των γονιδίων που θα εξεταστούν
- DEPC νερό

Μέθοδος:

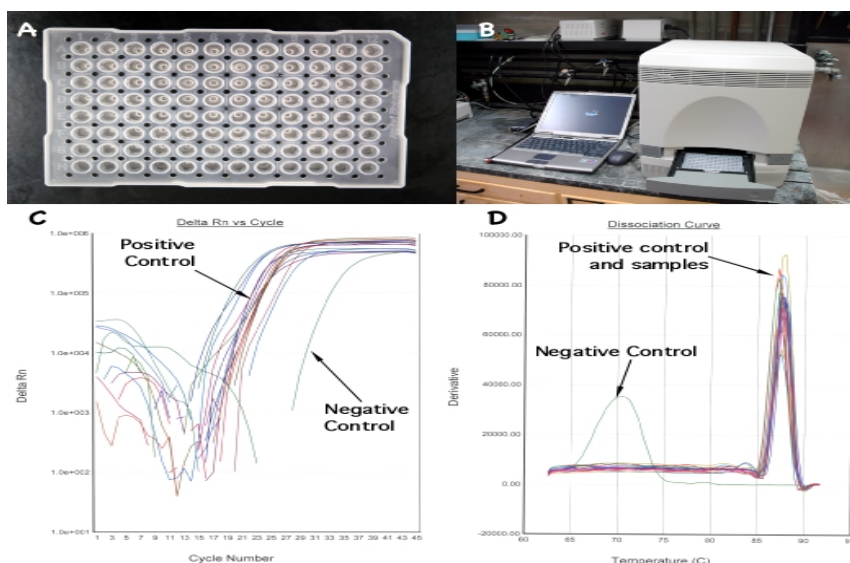
Για τη ποσοτική real time PCR, τοποθετούνται στις ειδικές υποδοχές από 12.5 μ l αντίδρασης που αντιπροσώπευε ένα ξεχωριστό δείγμα. Από τον όγκο αυτό, 10 μ l είναι το συνολικό μίγμα της αντίδρασης και 2.5 μ l το cDNA που χρησιμοποιείται. Το συνολικό μίγμα παρασκευάζεται υπολογίζοντας 6.25 μ l μίγματος ποσοτικής PCR (2x Taqman Master Mix), 1.25 μ l από κάθε έναν από τους 2 εκκινητές (1 μ M ανά αντίδραση), 0.50 μ l από κάθε έναν από τους 2 probe (0.33 μ M ανά αντίδραση) και 0.75 μ l νερού για κάθε δείγμα.

Κάθε δείγμα cDNA συμπεριλαμβανομένων και των calibrators και του αρνητικού μάρτυρα της rt-PCR εξετάζεται ως προς την έκφραση των γονιδίων: *BRCA1*, *RRM1*, *RRM2* και *B-ACTIN* (β -ακτίνη). Το γονίδιο της β -ακτίνης επειδή έχει γνωστό πρότυπο έκφρασης χρησιμοποιείται συχνά στην μέθοδο της real time PCR στον ρόλο του γονιδίου-μάρτυρα με το οποίο θα συγκριθούν τα πρότυπα έκφρασης των υπόλοιπων γονιδίων. Οι calibrators αραιώνονται ώστε να έχουν συγκέντρωση 10ng/2,5 μ l. Εξετάζονται επίσης και δείγματα RNA των ασθενών ώστε από τον μηδενικό πολλαπλασιασμό τους στην real time PCR να επιβεβαιωθεί ότι

τα εξεταζόμενα cDNA ήταν απαλλαγμένα από μόλυνση με γενωμικό DNA εξωγενούς προέλευσης που ίσως πρόσθεσε η διαδικασία.

Κάθε δείγμα εξετάζεται για κάθε γονίδιο 3 φορές σε 3 διαφορετικές υποδοχές του ειδικού πιάτου ώστε να ελεγχθεί η επαναληψιμότητα του αποτελέσματος. Η αραιώσεις των δειγμάτων γίνονται έτσι ώστε να επαρκεί το υλικό του cDNA για όλες τις θέσεις-αντιδράσεις. Η διαδικασία του «φορτώματος» στο ειδικό πιάτο (plate) των μιγμάτων της αντίδρασης και των cDNA γίνεται σε συνθήκες που να αποτρέπουν κατά το δυνατόν τις μολύνσεις των δειγμάτων από το εξωτερικό περιβάλλον και μεταξύ τους και επίσης σε χαμηλή θερμοκρασία. Μετά το φόρτωμα των επιθυμητών δειγμάτων, ακολουθεί η real time PCR. Ο θερμοκρασιακός κύκλος είναι: 50° C για 2 λεπτά-95 ° C για 10 λεπτά-95° C για 15 δευτ.-60° C για 1 λεπτό.

Εικόνα 13. Διαδικασία RT-qPCR



Από
τις
τιμές
C_q
της
έκφρ

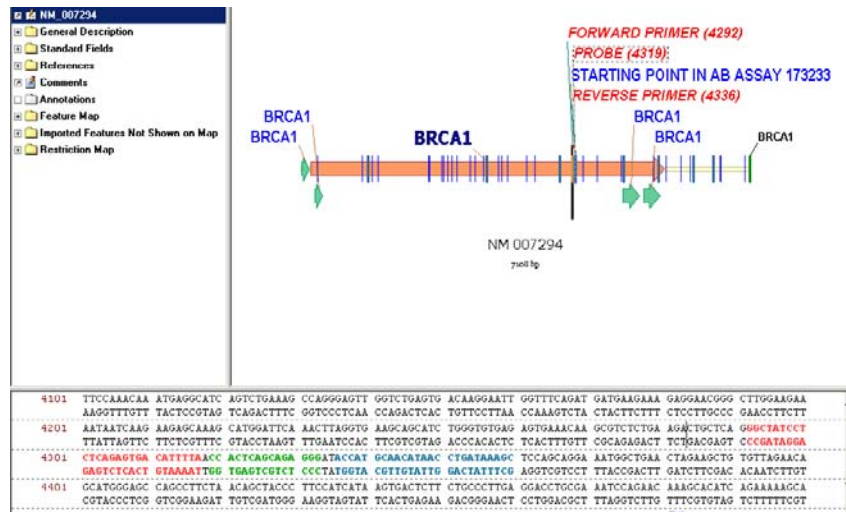
ασης που υπολογίζονται από το πρόγραμμα, ακολουθεί η ανάλυση των αποτελεσμάτων (της σχετικής έκφρασης κάθε γονιδίου) με τη μέθοδο $\Delta\Delta C_t$ στην οποία εφαρμόζεται ο τύπος: ποσότητα έκφρασης γονιδίου = $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Στην μέθοδο της σχετικής ποσοτικοποίησης είναι απαραίτητη πριν από την έναρξη της μελέτης, η εκτίμηση της αποτελεσματικότητας των εκκινητών και του ιχνηθέτη. Ελέγχεται η γραμμικότητα μεταξύ της ποσοτικοποίησης των γονιδίων στόχων (*BRCA1*, *RRM1*, *RRM2*) και του γονιδίου αναφοράς (*β -ACTIN*) ώστε τα αποτελέσματα που θα προκύψουν από τη συγκριτική μελέτη της έκφρασης να είναι αξιόπιστα.

Όλοι οι εκκινητές και ιχνηλάτες σχεδιάζονται ώστε ένας από αυτούς (κατά προτίμηση ο ιχνηλάτης) να βρίσκεται σε περιοχή σύνδεσης δύο εξωνίων ώστε να αποφευχθεί ο πολλαπλασιασμός γενομικού DNA (εικόνα 14). Οι ιχνηλάτες είναι σεσημασμένοι με φοριούχα μόρια (FAM) 5' άκρο και αναστολέα τους (TAMRA) στο 3' άκρο. Το T_m όλων των εκκινητών και το T_m των ιχνηλατών είναι τα ίδια για να μπορεί να γίνει η PCR για όλα τα γονίδια με την ίδια δραστικότητα στην ίδια αντίδραση. Το T_m των ιχνηλατών σχεδιάζεται να είναι 10°C υψηλότερο από αυτό των εκκινητών για να διευκολυνθεί η πρόσδεση τους στο υπόστρωμα. Για τη κατασκευή τους επιλέγεται η τεχνολογία MGB που δίνει υψηλό T_m με μικρότερο εύρος βάσεων ώστε να επιτευχθεί όσο το δυνατόν μικρότερο amplicon. Τέλος διενεργείται έρευνα στη βάση BLAST για να τεκμηριωθεί η ειδικότητα των εκκινητών και των ιχνηλατών που σχεδιάστηκαν.

Οι εκκινητές και ανιχνευτές των γονιδίων είναι:

B-ACTIN: πρόσθιος εκκινητής: 5'-GGC-ACC-CAG-CAC-AAT-GAA-G-3' οπίσθιος εκκινητής: 5'-GCC-GAT-CCA-CAC-GGA-GTA-CT-3' Ανιχνευτής: 5'-FAM-TCA-AGA-TCA-TTG-CTC-CTC-CTG-AGC-GC-TAMRA-3'

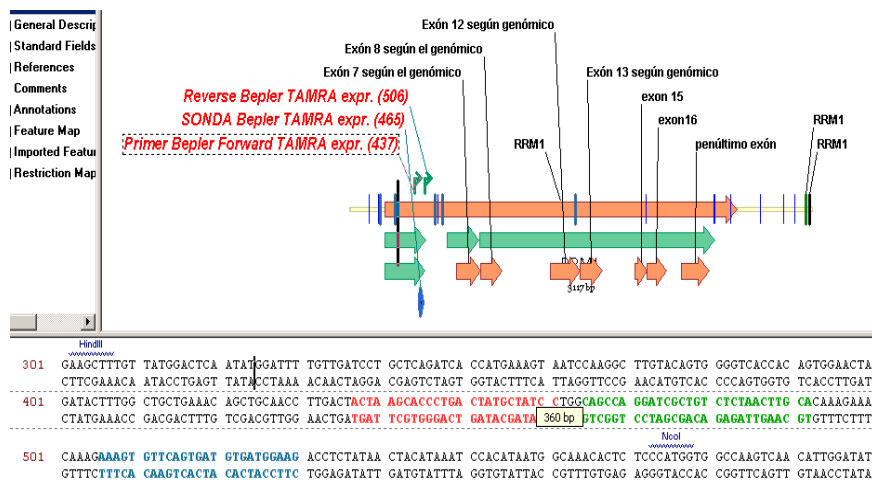
BRCA1(RefSeqNM_007294,<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink>) : πρόσθιος εκκινητής στο εξώνιο 8 (θέση 4292bp to 4317bp): 5'-GGC-TAT-CCT-CTC-AGA-GTG-ACA-TTT-TA -3' οπίσθιος εκκινητής στο εξώνιο 9 (θέση 4336bp to 4360bp): 5'-GCT-TTA-TCA-GGT-TAT-GTT-GCA-TGG-T-3' Ανιχνευτής στη συμβολή των εξωνίων 8 και 9 (θέση: 4313bp to 4333bp): 5'- FAM -CCA-CTC-AGC-AGA-GGG-TAMRA -3'



Εικόνα 14. Σχεδιασμός εκκινητών και ιχνοθετών BRCA1

RRM1 (Ref Seq L10342): πρόσθιος εκκινητής εξώνιο 1 (θέση 437 bp to 463 bp): 5'-GCA-GAA-GAA-AAT-GAA-GAA-AGC-TCA-TAA-3'

οπίσθιος εκκινήτης (θέση 506 bp to 525bp) : 5'-GGA-ATG-CTT-GCC-ATG-CTT-GT-3' Ανιχνευτής συμβολή εξωνίου 1 με εξώνιο 2 (θέση 465 bp-494bp,): 5' - FAM -ATG-CAC-AAG-CAC-CAA-AAG-CAC-CAC-AAG-TAC-TAMRA -3'



Εικόνα 15. Σχεδιασμός εκκινήτων και ιχνοθετών RRM1

RRM2 (Ref Seq NM_001034): πρόσθιος εκκινήτης εξώνιο 2 (320bp - 336bp) : 5'-TGG-TGT-GCG-TGG-CCA-AT-3' οπίσθιος εκκινήτης εξώνιο 3(357bp to 375bp): 5'-TGC-CCT-GAG-TTG-GGA-AGG-T-3' Ανιχνευτής συμβολή εξωνίου 2 με εξώνιο 3 (337bp to 355bp): 5'- FAM -CGA-CTT-ACC-ACT-GCA-AAA-AGG-ATA-ATT-GCC-C-TAMRA -3'

σημαντικών παραγόντων στη πολυπαραγοντική ανάλυση σε σχέση με την ανταπόκριση, το διάστημα έως την υποτροπή και την ολική επιβίωση. Το διάστημα έως την υποτροπή και η συνολική επιβίωση των ασθενών θα εκτιμηθούν με τη μέθοδο Kaplan-Meier. Για όλα τα test το επίπεδο σημαντικότητας ορίζεται σαν $p=0.05$.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Μελέτη Φάσης II

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΣΘΕΝΩΝ

Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν ογδόντα ασθενείς από τον Αύγουστο του 2002 μέχρι τον Αύγουστο του 2006. Τρεις ασθενείς κρίθηκαν ακατάλληλοι πριν τη χορήγηση του σχήματος DG: ο ένας ήταν νεότερος από 70 ετών, ο άλλος είχε και δεύτερο πρωτοπαθή όγκο (αδενοκαρκίνωμα προστάτη υπό ορμονοθεραπεία) και ο τρίτος εμφάνισε οξεία επιδείνωση της καρδιοαναπνευστικής λειτουργίας του και κατάληξε 4 ημέρες μετά την ένταξη του στη μελέτη. Μεταξύ των 77 αξιολογήσιμων ασθενών, 67 ήταν άρρενες και η διάμεση ηλικία τους ήταν 72 έτη (εύρος 70-78 έτη). Οι περισσότεροι ασθενείς (83,2%) είχαν PS (ECOG) 0-1, 66,2% αυτών παρουσίαζαν νόσο σταδίου IV και το 76,7% είχαν δύο ή περισσότερες εντοπίσεις της νόσου. Στον πίνακα 4 καταγράφονται τα χαρακτηριστικά των ασθενών και της νόσου στην έναρξη της μελέτης.

Πίνακας 4: Χαρακτηριστικά ασθενών

| | n | (%) |
|-----------------------|-------|--------|
| Age | | |
| Median | 72 | |
| Min-max | 70-78 | |
| Sex | | |
| Male | 67 | (87.0) |
| Female | 10 | (13.0) |
| Performance status | | |
| 0 | 34 | (44.2) |
| 1 | 30 | (39.0) |
| 2 | 13 | 16.9) |
| Stage | | |
| IIIB | 26 | (33.8) |
| IV | 51 | (66.2) |
| Previous surgery | 10 | 13.0) |
| No of organs involved | | |
| 1 | 18 | (23.4) |
| 2 | 36 | (46.8) |
| ≥3 | 23 | (29.9) |
| Median (min-max) | 2 | (1-5) |

ΧΟΡΗΓΗΣΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 314 κύκλοι Χ/Θ με διάμεση συχνότητα 3 κύκλοι/ασθενή (εύρος 1-9), ενώ 36 ασθενείς (46.8%) έλαβαν περισσότερους από 3 κύκλους Χ/Θ. Η διάμεση περίοδος μεταξύ των κύκλων ήταν 22 μέρες (εύρος 21-36 μέρες). Καθυστέρηση θεραπείας απαιτήθηκε σε 66 κύκλους (21%) και σε 29 από αυτούς (9.2%) η καθυστέρηση ήταν μεγαλύτερη από 7 μέρες. Οι λόγοι καθυστέρησης της θεραπείας ήταν αιματολογικοί (n=8 κύκλοι: 2.5%) και αιματολογικοί (n=7 κύκλοι: 2.2%), καθώς και λόγοι που δεν σχετίζονταν με τη θεραπεία (ευκολία ασθενών, καθυστερημένη εισαγωγή λόγω εκκρεμών ακτινολογικών πορισμάτων, n=51 κύκλοι: 16.2%). Μείωση της δοσολογίας

των φαρμάκων απαιτήθηκε σε 30 κύκλους (9.6%) και οι λόγοι αυτής της μείωσης ήταν αιματολογική (n=9 κύκλοι: 2.9%) και αιματολογική (n=6 κύκλοι: 1.9%) τοξικότητα, καθώς και συνδυασμό τους (n=15 κύκλοι: 4.8%). Η μέση ένταση δόσης για την docetaxel και gemcitabine ήταν 31.0 mg/m²/εβδομάδα και 733 mg/m²/εβδομάδα, αντίστοιχα, που ανταποκρίνονταν σε 94% και 85.5% των σχεδιασμένων από το πρωτόκολλο δόσεων, αντίστοιχα. Στη φάση της ανάλυσης, 32 ασθενείς (41.6%) είχαν ολοκληρώσει θεραπεία σύμφωνα με το πρωτόκολλο. Οι βασικοί λόγοι διακοπής θεραπείας ήταν επιδείνωση νόσου (n=33 ασθενείς: 42.9%), ανεπιθύμητες ενέργειες που σχετίζονταν με τη θεραπεία (n=5 ασθενείς: 6.5%), αιφνίδιος θάνατος που δεν σχετίζονταν άμεσα με τη θεραπεία (n=1 ασθενής: 1.3%) και ηθελημένη αποχώρηση (n=5 ασθενείς: 6.5%).

Θεραπεία 2^{ης} γραμμής χορηγήθηκε σε 19 ασθενείς (24.7%). Από αυτούς οι 17 έλαβαν X/Θ και οι 2 αναστολείς EGFR της τυροσινικής κινάσης (gefitinib ή erlotinib).

ΑΠΑΝΤΗΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΒΙΩΣΗ

Όλοι οι ασθενείς εκτιμήθηκαν για απάντηση στη θεραπεία. Σε μία ανάλυση πρόθεσης για θεραπεία επιτεύχθηκαν μία (1.3%) πλήρης (CR) και 23 (29.9%) μερικές (PR) απαντήσεις, σε συνολικό ποσοστό απάντησης 31.2% (95%CI: 20.82-41.51%). 17 ασθενείς (22.1%) είχαν σταθερή νόσο (SD) και 36 (46.8%) εμφάνισαν επιδείνωση νόσου (PD). Το ποσοστό

ελέγχου αύξησης του όγκου ήταν 53.3%. Το αντικειμενικό ποσοστό απάντησης (CR και PR) παρουσίαζε σημαντική συσχέτιση με τα στάδια IIIB και IV, 46.2% και 23.5%, αντίστοιχα (OR=2.786, 95%CI: 1.018-7.622; $p=0.043$). Αντίστροφα, δεν υπήρχε συσχέτιση μεταξύ της πιθανότητας απάντησης και φύλου, PS, απώλειας βάρους, ή τον αριθμό των εντοπίσεων της νόσου.

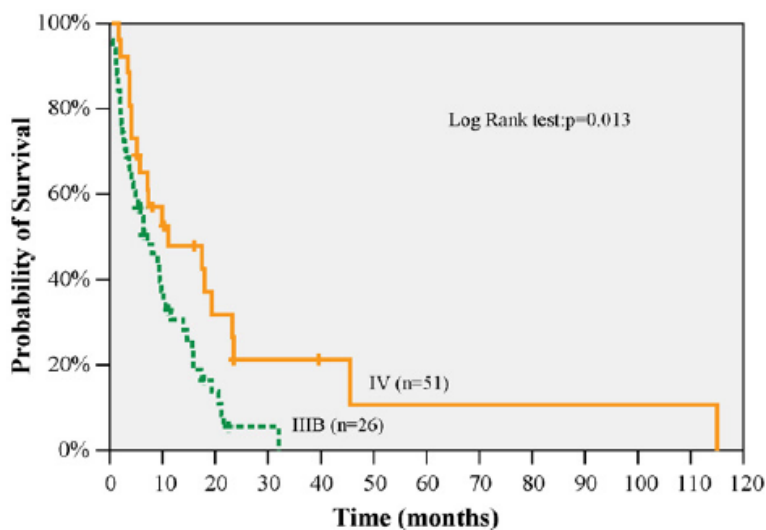
Την χρονική στιγμή της ανάλυσης 65 ασθενείς (84.4%) είχαν καταλήξει. Η διάμεση περίοδος επανελέγχου (follow up) ήταν 7.2 μήνες (εύρος, 1.1-46). Ο διάμεσος χρόνος μέχρι επιδείνωση νόσου (TTP) ήταν 4.1 μήνες (εύρος, 0.5-32,1) και η διάμεση διάρκεια απάντησης 7.6 μήνες (εύρος, 1.0-18.3). Η ανάλυση των υποομάδων αποκάλυψε πως μόνο η απάντηση στη θεραπεία σχετιζόταν με την TTP (9.9 και 2.2 μήνες για απαντητές και μη-απαντητές, αντίστοιχα; $p=0.004$). Επιπλέον, παρατηρήθηκε μία τάση προς καλύτερη TTP στους ασθενείς σταδίου IIIB (5.8 και 2.9 μήνες στους ασθενείς σταδίου IIIB και IV, αντίστοιχα; $p=0.097$). Στην πολυπαραγοντική ανάλυση, το φύλο και η απάντηση στη θεραπεία αναδείχθηκαν ανεξάρτητοι παράγοντες που σχετίζονταν με την TTP (hazard ratio: 2.188, 95%CI: 1.085-4.416; $p=0.029$ για το φύλο και 2.386, 95%CI: 1.381-4.121; $p=0.002$ για την απάντηση). Ο διάμεσος συνολικός χρόνος επιβίωσης ήταν 9.4 μήνες (εύρος, 1.1-45.6) και τα ποσοστά μονοετούς και διετούς επιβίωσης ήταν 37.9% και 10.7%, αντίστοιχα. Η ανάλυση υποομάδων, επίσης, έδειξε ότι οι ασθενείς σταδίου IIIB εμφάνιζαν καλύτερη συνολική επιβίωση από εκείνους σταδίου IV

(πίνακας 5; εικόνα 1). Η πολυπαραγοντική ανάλυση αποκάλυψε πως το στάδιο (hazard ratio 1.851, 95%CI: 1.051-3.260; $p=0.033$) και η απάντηση στη θεραπεία (hazard ratio 1.889, 95%CI: 1.084-3.292; $p=0.025$) ήταν ανεξάρτητοι παράγοντες που σχετίζονταν με την συνολική επιβίωση.

Πίνακας 5:

Ανάλυση υποομάδας της συνολικής επιβίωσης ηλικιωμένων ασθενών σε σχήμα DG

| | | | | |
|--------------------|------|----------|-------|-------|
| Performance status | | | | |
| 0-1 (n=64) | 9.8 | 6.4-13.1 | 39.6% | 0.112 |
| 2 (n=13) | 4.2 | 0.0-9.4 | 23.1% | |
| Stage | | | | |
| IIIb (n=26) | 11.1 | 0.0-25.2 | 47.8% | 0.013 |
| IV (n=51) | 7.1 | 3.1-11.2 | 30.6% | |
| Gender | | | | |
| Male (n=67) | 8.1 | 4.8-11.4 | 85.1% | 0.397 |
| Female (n=10) | 3.7 | 0.0-14.7 | 40.0% | |



Εικόνα 1: Συνολική επιβίωση ανάλογα με το στάδιο

ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ

Όλοι οι ασθενείς εκτιμήθηκαν για τοξικότητα (πίνακας 6). Ουδετεροπενία βαθμού 3 και 4 παρατηρήθηκε σε 4 (5,2%) και 10 (13%) ασθενείς, αντίστοιχα. Εμπύρετος ουδετεροπενία εμφανίστηκε σε 3 ασθενείς (3,9%), ενώ όλοι οι ασθενείς ανέρρωσαν πλήρως. Δεν παρουσιάστηκε κανένας θάνατος που να σχετίζεται με τη θεραπεία. Η λοιπή αιματολογική τοξικότητα ήταν ήπια και αντιμετωπιζόταν εύκολα, με τη θρομβοπενία βαθμού 3 και 4 να συμβαίνει σε 4 ασθενείς (5,2%). Η μη-αιματολογική τοξικότητα κυμάνθηκε από ήπια έως μέτρια. Οι πιο συχνές παρενέργειες ήταν: αδυναμία βαθμού 2-3, που εμφανίστηκε σε 17 ασθενείς (22,1%), νευροτοξικότητα βαθμού 2-3 που εμφανίστηκε σε 6 ασθενείς (7,8%) και διάρροια βαθμού 2-3 που εμφάνισαν 6 ασθενείς (7,8%). Μόνο 1 ασθενής (1,3%) εμφάνισε κλινικά και ακτινολογικά ευρήματα διάμεσης πνευμονίτιδας, οπότε απαιτήθηκε διακοπή θεραπείας. Δεν υπήρχε καμία συσχέτιση μεταξύ της εμφάνισης των διαφόρων παρενεργειών και του PS.

Πίνακας 6: Αιματολογική και μη-αιματολογική τοξικότητα του σχήματος DG σε ηλικιωμένους

| Adverse event | Grade | | | | | | | |
|-------------------------|-------|--------|----|--------|-----|-------|----|--------|
| | I | | II | | III | | IV | |
| | n | (%) | n | (%) | n | (%) | n | (%) |
| Neutropenia | 7 | (9.1) | 9 | (11.7) | 4 | (5.2) | 10 | (13.0) |
| Febrile neutropenia | – | – | – | – | – | – | 3 | (3.9) |
| Anaemia | 36 | (46.8) | 28 | (36.4) | – | – | – | – |
| Thrombocytopenia | 22 | (28.6) | 6 | (7.8) | 3 | (3.9) | 1 | (1.3) |
| Nausea/vomiting | 7 | (9.1) | 6 | (7.8) | 1 | (1.3) | 1 | (1.3) |
| Diarrhea | 6 | (7.8) | 3 | (3.9) | 3 | (3.9) | – | – |
| Stomatitis | 3 | (3.9) | 4 | (5.2) | – | – | – | – |
| Constipation | 6 | (7.8) | 1 | (1.3) | – | – | – | – |
| Neurotoxicity | 5 | (6.5) | 4 | (5.2) | 2 | (2.6) | – | – |
| Allergy | 4 | (5.2) | 2 | (2.6) | – | – | – | – |
| Asthenia | 25 | (32.5) | 11 | (14.3) | 6 | (7.8) | – | – |
| Edema | 6 | (7.8) | 4 | (5.2) | 1 | (1.3) | – | – |
| Pneumonitis | 1 | (1.3) | – | – | 1 | (1.3) | – | – |
| Fever without infection | 7 | (9.1) | – | – | – | – | – | – |
| Flue like syndrome | 3 | (3.9) | – | – | – | – | – | – |

2. ΦΑΡΜΑΚΟΓΕΝΩΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ (Στόχοι 2α και 2β)

Στόχος 2α. Συσχέτιση των επιπέδων mRNA RRM1 και RRM2 στα κακοήγη κύτταρα με τα κλινικά αποτελέσματα σε ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα που έλαβαν τον συνδυασμό docetaxel/gemcitabine ως θεραπεία 1^{ης} γραμμής.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

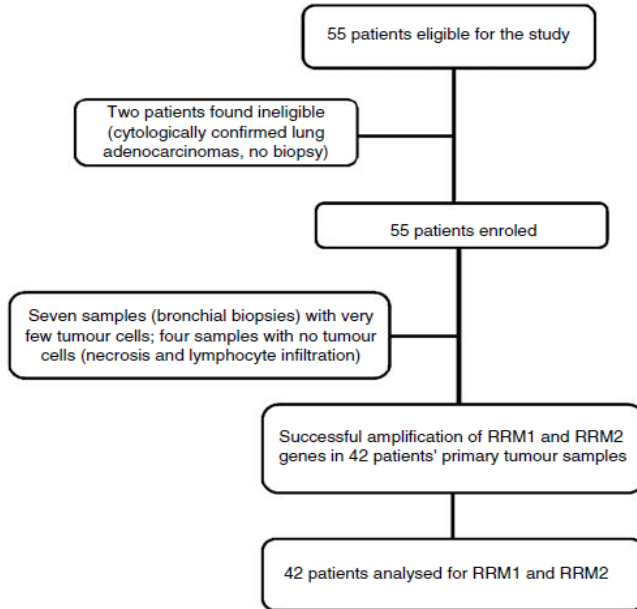
1.ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΣΘΕΝΩΝ

Στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν συνολικά 53 ασθενείς με αντιπροσωπευτικό δείγμα από τον πρωτοπαθή όγκο. Τα χαρακτηριστικά των ασθενών φαίνονται στον πίνακα 7. Σαράντα δύο δείγματα (79%) ενισχύθηκαν επιτυχώς, ενώ τα υπόλοιπα 11 δεν ήταν μετρήσιμα, είτε λόγω του ελάχιστου ποσού διαθέσιμου ιστού, είτε της εκτεταμένης νέκρωσης στο δείγμα του όγκου (Εικόνα 2).

Πίνακας 7: Χαρακτηριστικά ασθενών

| | Patients | |
|--------------------------------|----------|-----|
| | Number | % |
| Gender | | |
| Male | 45 | 85 |
| Female | 8 | 15 |
| Age (years) | | |
| Median | 60 | |
| Range | 39–75 | |
| Performance status (ECOG) | | |
| 0 | 35 | 66 |
| 1 | 16 | 30 |
| 2 | 2 | 4 |
| Stage | | |
| III B | 12 | 23 |
| IV | 41 | 77 |
| Number of organs involved | | |
| 1 | 16 | 30 |
| 2 | 20 | 38 |
| ≥3 | 17 | 32 |
| RRM1 mRNA expression | | |
| Samples analysed | 53 | 100 |
| Samples successfully amplified | 42 | 79 |
| Missing values | 11 | 21 |
| RRM2 mRNA expression | | |
| Samples analysed | 53 | 100 |
| Samples successfully amplified | 42 | 79 |
| Missing values | 11 | 21 |

Abbreviations: ECOG = Eastern Cooperative Oncology Group; RRM1 = ribonucleotide reductase subunit M1; RRM2 = ribonucleotide reductase subunit M2.



Εικόνα 2: Διάγραμμα ροής της προόδου των ασθενών κατά την διάρκεια της μελέτης

2. ΚΛΙΝΙΚΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ

Πλήρης απάντηση (CR) παρατηρήθηκε σε 4 ασθενείς (7.5%) και μερική απάντηση σε 15 (PR) (28.3%) (ολικό ποσοστό απάντησης 35.8%; 95%C.I.: 19.6%-46.9%). 15 ασθενείς είχαν σταθερή νόσο (SD) και 20 (37.7%) επιδείνωση νόσου (PD). Δεν υπήρξε συσχέτιση μεταξύ γνωστών κλινικών παραμέτρων (ηλικία, PS, στάδιο νόσου ή αριθμός εμπλεκόμενων εστιών) και πιθανότητας απάντησης. Μετά από διάμεσο χρόνο παρακολούθησης 7.5 μηνών (εύρος, 0.5-46.2), ο διάμεσος χρόνος έως επιδείνωση όγκου ήταν 4.3 μήνες (εύρος, 0.2-34.9) και η διάμεση ολική

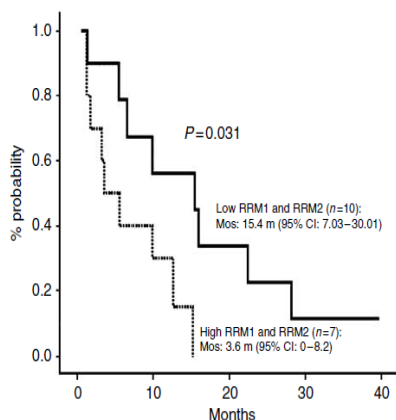
επιβίωση (OS) 10.1 μήνες (εύρος, 0.5-46.2), ενώ το ποσοστό της μονοετούς επιβίωσης ήταν 40.2%.

3. ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ RRM1 ΚΑΙ RRM2 m-RNA ΚΑΙ ΑΠΑΝΤΗΣΗ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Τα επίπεδα έκφρασης RRM1 και RRM2 m-RNA του όγκου κυμαίνονταν από 0.1-8.9 (διάμεση τιμή 1.04; μέση $1.8 \pm SD:1.15$) και από 0.97-114.3 (διάμεση τιμή 8.83; μέση $17.69 \pm SD:20.56$) αντίστοιχα. Δεν υπήρξε συσχέτιση μεταξύ ηλικίας ($p=0.79$), φύλου ($p=0.98$), PS ($p=0.53$) ή σταδίου νόσου ($p=0.50$) και επιπέδων RRM1 ή RRM2 mRNA ($p=0.89$, $p=0.10$, $p=0.19$ και $p=0.27$, αντίστοιχα). Υιοθετώντας ως κατώτατο όριο τις τιμές που αντιστοιχούσαν στα διάμεσα επίπεδα έκφρασης, υψηλή έκφραση του όγκου σε RRM1 παρατηρήθηκε σε 25 (59.5%), ενώ χαμηλή σε 17 (40.5%) ασθενείς. Ανάλογα, υψηλή και χαμηλή έκφραση RRM2 mRNA του όγκου παρατηρήθηκε σε 20 (47.6%) και 22 (52.4%) ασθενείς, αντίστοιχα. Ασθενείς με έκφραση όγκου RRM1 στα χαμηλότερα επίπεδα εμφάνιζαν μακρύτερη TTP (7.1 vs 1.3 μήνες; $p=0.044$) και OS (10.6 vs 1.6 μήνες; $p=0.02$), αλλά όχι αντικειμενικά ποσοστά απάντησης (45.5% vs 20%; $p=0.062$), όταν συγκρίνονταν με ασθενείς των οποίων ο όγκος είχε έκφραση RRM1 mRNA στις ανώτερες τιμές. Αντίθετα, το αντικειμενικό ποσοστό απάντησης ήταν σημαντικά υψηλότερο σε ασθενείς με χαμηλή παρά με υψηλή έκφραση RRM2 mRNA του όγκου (54.5% vs 20.5%; $p=0.0019$). Παρόλα αυτά δεν φάνηκε σχέση μεταξύ της έκφρασης RRM2

mRNA του όγκου και είτε της TTP (3.6 και 4.9 μήνες για χαμηλή και υψηλή RRM2 mRNA έκφραση, αντίστοιχα; $p=0.376$) είτε της OS (6.5 και 6.8 μήνες για χαμηλή και υψηλή RRM2 mRNA έκφραση, αντίστοιχα; $p=0.897$). Ασθενείς με RRM2 mRNA έκφραση στο τελευταίο τέταρτο των τιμών εμφάνιζαν σημαντικά υψηλότερο ποσοστό αντικειμενικής απάντησης (41.7%), σε σύγκριση με ασθενείς του υψηλότερου τετάρτου (0%) ($p=0.016$). Για άλλη μια φορά δεν υπήρχε διαφορά στην TTP (5.0 vs 3.6 μήνες; $p=0.18$) και στην OS (10.6 vs 5.5 μήνες; $p=0.14$).

Η συνδυασμένη ανάλυση της έκφρασης του όγκου και για RRM1 και για RRM2, αποκάλυψε ότι το ποσοστό απάντησης (60% vs 14.2%; $p=0.049$), η TTP (9.9 vs 2.3 μήνες; $p=0.003$; Εικόνα 3) και η OS (15.4 vs 3.6; $p=0.031$; Εικόνα 3) ήταν σημαντικά υψηλότερες σε ασθενείς με χαμηλή RRM1/χαμηλή RRM2 mRNA έκφραση, συγκρινόμενοι με αυτούς με υψηλή RRM1/υψηλή RRM2 mRNA έκφραση (Πίνακας 8). Αντίστροφα, δεν φάνηκε συσχέτιση μεταξύ των διάφορων παραμέτρων αποτελεσματικότητας και άλλων συνδυασμών της έκφρασης RRM1 και RRM2 mRNA (Πίνακας 8).



Εικόνα 3: OS ανάλογα με υψηλά ή χαμηλά επίπεδα των RRM1 και RRM2

Πίνακας 8: έκφραση mRNA RRM1 και RRM2 του όγκου και κλινικό αποτέλεσμα

| | | Time to progression (months) | | | Overall survival (months) | | Response N (%) | | |
|-------------------|-------------------------|------------------------------|-----------------|--------------------|---------------------------|-------------------|----------------|----------|--------------------|
| | | N (%) | Median (95% CI) | P | Median (95% CI) | P | CR+PR | SD+PD | P |
| High vs low | Low RRM1 | 17 (40.5) | 4.0 (3.1–5.8) | 0.43 | 9.8 (4.2–15.4) | 0.31 | 7 (41) | 10 (59) | 0.23 |
| | High RRM1 | 25 (59.5) | 3.7 (1.9–5.4) | | | | | | |
| | Low RRM2 | 20 (47.6) | 3.6 | | | | | | |
| | High RRM2 | 22 (52.4) | 4.9 | | | | | | |
| Quartiles | RRM1 by quartiles | | | | | | | | |
| | Q1 (low) | 11 | 7.1 (1.8–12.4) | 0.04 ^a | 10.6 (5.6–15.5) | 0.02 ^a | 5 (45.5) | 6 (54.5) | 0.06 ^a |
| | Q2+Q3 | 20 | 4.0 (0.8–7.2) | NS ^b | 5.5 (3.8–12.6) | NS ^b | 6 (30) | 70 | NS ^b |
| | Q4 (high) | 11 | 1.73 (0.6–2.0) | | 1.6 (1.4–1.8) | | 2 (20) | 80 | |
| RRM2 by quartiles | RRM2 by quartiles | | | | | | | | |
| | Q1 (low) | 11 | 5 (1.6–9.8) | 0.18 ^a | 10.6 (4.3–19.7) | 0.14 ^a | 5 (45.5) | 6 (54.5) | 0.016 ^a |
| | Q2+Q3 | 20 | 3.6 (1.1–6.1) | NS ^b | 9.5 (1.4–16.1) | NS ^b | 8 (40) | 12 (60) | 0.035 ^c |
| | Q4 (high) | 11 | 3.6 (0.1–5.6) | | 5.5 (0.5–10.5) | | 0 (0) | 11 (100) | |
| RRM1 and RRM2 | Low RRM1 and low RRM2 | 10 | 9.9 (1.9–17.8) | 0.003 ^d | 15.4 (7.0–30.1) | 0.03 ^d | 6 (60) | 4 (40) | 0.049 ^d |
| | High RRM1 and high RRM2 | 7 | 2.3 (0–5.3) | | | | | | |
| | Low RRM1 and high RRM2 | 15 | 3.6 (0.32–6.8) | | | | | | |
| | High RRM1 and low RRM2 | 10 | 3.8 (0–7.2) | | | | | | |

Abbreviations: CI = confidence interval; CR = complete response; PD = progressive disease; PR = partial response; SD = stable disease; RRM1 = ribonucleotide reductase subunit M1; RRM2 = ribonucleotide reductase subunit M2. ^aP-value: Q1 vs Q4. ^bP-value: Q1 vs Q2+3 and Q2+3 vs Q4. ^cP-value: Q2+3 vs Q4. ^dP-value: both low vs both high. ^eBoth low vs RRM1 low/RRM2 high or RRM1 high/RRM2 low.

4. ΜΟΝΟΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΗ ΚΑΙ ΠΟΛΥΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Η μονοπαραγοντική ανάλυση κατέδειξε πως η RRM2 mRNA έκφραση συσχετιζόταν σημαντικά με το ποσοστό αντικειμενικής απάντησης ($p < 0.001$, Πίνακας 9). Η λογιστική παλίνδρομη ανάλυση έδειξε ότι η υπερέκφραση του όγκου σε RRM2 άλλα όχι RRM1 συσχετιζόταν

σημαντικά με πτωχή απάντηση σε DG (Odds Ratio: 31.5, $p=0.002$) (Πίνακας 9). Αντίθετα, το PS (hazard ratio 2.26; $p=0.024$) άλλα όχι η υπερέκφραση του όγκου σε RRM1 και RRM2 εμφανιζόταν ως ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για την OS (Πίνακας 10).

Πίνακας 9: Μονοπαραγοντική και πολυπαραγοντική ανάλυση της απάντησης

| | Odds ratio | 95% CI | P-value |
|----------------------------------|-------------------|---------------|----------------|
| <i>Univariate analysis</i> | | | |
| Age (≤ 65 vs > 65 years) | 1.01 | 0.69–1.34 | 0.97 |
| Gender (male vs female) | 1.23 | 0.7–1.83 | 0.64 |
| Performance status (0 vs 1–2) | 1.54 | 0.87–2.04 | 0.15 |
| Stage (III vs IV) | 1.12 | 0.67–1.41 | 0.42 |
| RRM1 mRNA (low vs high) | 1.38 | 0.67–2.91 | 0.31 |
| RRM2 mRNA (high vs low) | 37.5 | 3.8–369.8 | <0.001 |
| <i>Multivariate analysis</i> | | | |
| RRM2 mRNA (high vs low) | 31.5 | 3.5–283.3 | 0.002 |

Abbreviations: CI = confidence interval; RRM1 = ribonucleotide reductase subunit M1; RRM2 = ribonucleotide reductase subunit M2.

Πίνακας 10: Μονοπαραγοντική και πολυπαραγοντική ανάλυση της επιβίωσης

| | Hazard ratio | 95% CI | P-value |
|----------------------------------|---------------------|---------------|----------------|
| <i>Univariate analysis</i> | | | |
| Age (≤ 65 vs > 65 years) | 1.04 | 0.45–2.41 | 0.912 |
| Gender (male vs female) | 1.82 | 0.73–4.49 | 0.192 |
| Performance status (0 vs 1–2) | 2.64 | 1.32–4.19 | 0.017 |
| Stage (III vs IV) | 1.46 | 0.57–3.75 | 0.421 |
| RRM1 mRNA (low vs high) | 1.58 | 0.78–3.20 | 0.198 |
| RRM2 mRNA (high vs low) | 1.85 | 0.75–4.56 | 0.178 |
| <i>Multivariate analysis</i> | | | |
| Performance status (0 vs 1–2) | 2.26 | 1.11–4.59 | 0.024 |

Abbreviations: RRM1 = ribonucleotide reductase subunit M1; RRM2 = ribonucleotide reductase subunit M2.

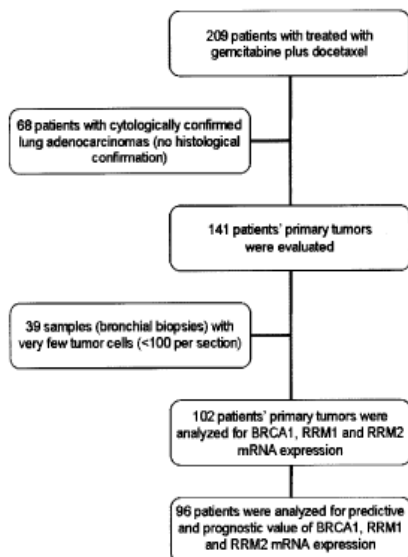
Στόχος 2β. Αξιολόγηση των επιπέδων έκφρασης mRNA των BRCA1, RRM1 και RRM2 από τα κακοήθη κύτταρα και συσχέτιση των επιπέδων αυτών με τη κλινική απάντηση σε 1^{ης} γραμμής Χ/Θ με docetaxel και gemcitabine σε ασθενείς με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΚΑΙ ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΚΒΑΣΗ

Στην πρωτότυπη τυχαιοποιημένη μελέτη (**Georgoulis et al., 2005**), 209 ασθενείς με Μη-Μικροκυτταρικό Καρκίνο του Πνεύμονα έλαβαν θεραπεία με gemcitabine και docetaxel. Από αυτούς οι 107 δεν συμπεριλήφθηκαν στη παρούσα μελέτη λόγω έλλειψης ιστού από τον όγκο (Εικόνα 4). Κλινικά δεδομένα και δείγματα του πρωτοπαθούς όγκου ήταν διαθέσιμα για 102 ασθενείς, οι οποίοι τελικά συμπεριλήφθηκαν στη παρούσα μελέτη. Ανάλυση των επιπέδων έκφρασης mRNA των γονιδίων BRCA1, RRM1 και RRM2 έγινε επιτυχώς σε 96 δείγματα (Εικόνα 4). Οι ιστολογικοί υπότυποι ήταν 81 αδενοκαρκινώματα, 10 από πλακώδες επιθήλιο και 5 μεγαλοκυτταρικά καρκινώματα. Τα χαρακτηριστικά των ασθενών φαίνονται στον Πίνακα 11. Στην αρχική μελέτη, το ποσοστό απάντησης ήταν 30%, ο χρόνος έως επιδείνωση 4 μήνες και η διάμεση επιβίωση 9 μήνες (**Georgoulis et al., 2005**). Τα αποτελέσματα για τους 96 ασθενείς που εκτιμήθηκαν στη παρούσα μελέτη ήταν παρόμοια: ποσοστό

απάντησης 30.5%, χρόνος έως επιδείνωση 4.2 μήνες και διάμεση επιβίωση 10.5 μήνες.



Εικόνα 4: Διάγραμμα της διαδικασίας λήψης αρχειακού υλικού από δείγματα όγκου εμβαπτισμένα σε παραφίνη, για την αξιολόγηση της έκφρασης mRNA RRM1 και RRM2

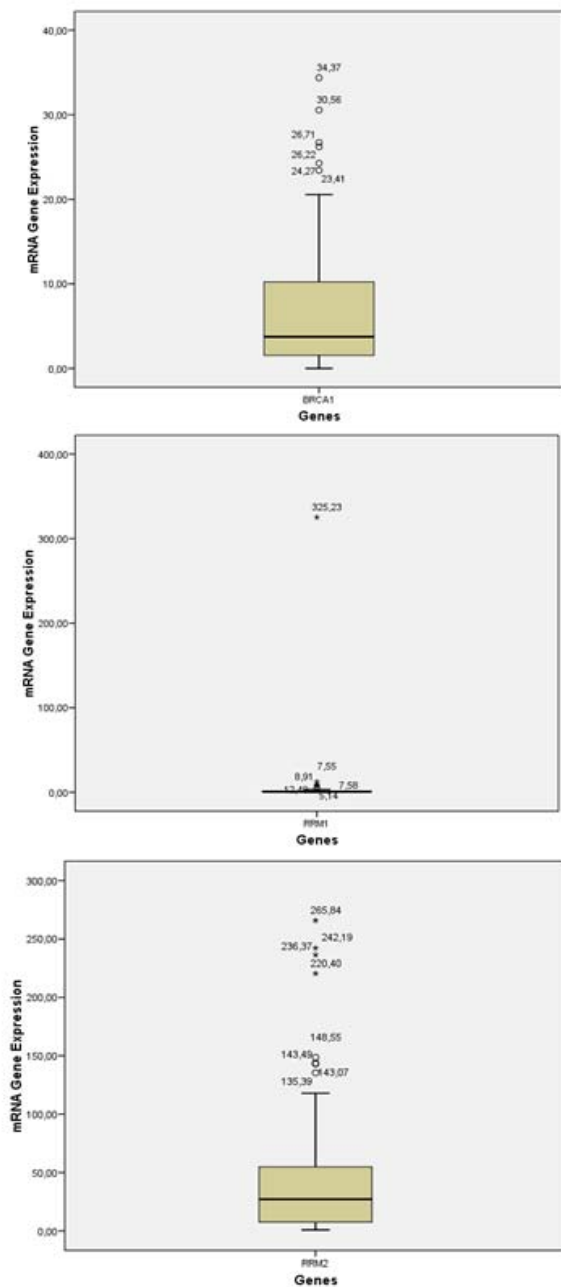
Πίνακας 11: Χαρακτηριστικά Ασθενών

| | N (%) | Median (range) |
|--------------------------------|----------|----------------------|
| Total patients | 96 (100) | |
| Gender | | |
| Male | 87 (90) | |
| Female | 9 (10) | |
| ECOG Performance Status | | |
| 0 | 62 (65) | |
| 1 | 28 (29) | |
| 2 | 6 (6) | |
| Stage | | |
| IIIB | 25 (26) | |
| IV | 71 (74) | |
| Age (years) | 96 | 60 (37-76) |
| BRCA1 median value | 96 | 3.64 (0-34.37) |
| BRCA1 by tertiles (T) | | |
| BRCA1 T1 | 32 | 1.09 (0-2.31) |
| BRCA1 T2 | 32 | 3.64 (2.33-7.81) |
| BRCA1 T3 | 32 | 11.30 (8.07-34.37) |
| RRM1 median value | 96 | 0.82 (0-325.23) |
| RRM1 by tertiles (T) | | |
| RRM1 T1 | 32 | 0.26 (0-0.44) |
| RRM1 T2 | 32 | 0.82 (0.45-1.10) |
| RRM1 T3 | 32 | 2.18 (1.14-325.23) |
| RRM2 median value | 96 | 27.16 (0.97-256.84) |
| RRM2 by tertiles (T) | | |
| RRM2 T1 | 32 | 4.97 (0.97-13.93) |
| RRM2 T2 | 32 | 27.16 (15.04-45.71) |
| RRM2 T3 | 32 | 89.96 (46.08-265.84) |

doi:10.1371/journal.pone.0003695.t001

2. ΕΠΙΠΕΔΑ ΕΚΦΡΑΣΗΣ BRCA1, RRM1 ΚΑΙ RRM2 m-RNA

Τα διάμεσα επίπεδα έκφρασης mRNA ήταν 3.64 (εύρος 0-34.37) για το BRCA1, 0.82 (εύρος 0-325.23) για το RRM1 και 27.16 (εύρος 0.97-256.84) για το RRM2 (Πίνακας 11). Τα επίπεδα έκφρασης δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Box plots που απεικονίζουν τα επίπεδα έκφρασης mRNA των BRCA1, RRM1 και RRM2

Δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ ηλικίας, φύλου, PS ή σταδίου νόσου και επιπέδων BRCA1, RRM1 και RRM2 mRNA. Σημαντικές συσχετίσεις παρατηρήθηκαν συνολικά μεταξύ BRCA1 και RRM1 ($r=0.27$; $p=0.008$), ενώ μη-σημαντική τάση προς συσχέτιση μεταξύ RRM1 και RRM2 ($r=0.19$; $p=0.06$) mRNA επιπέδων. Υπήρχε, επίσης, σημαντική αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ BRCA1 και RRM2 mRNA επιπέδων ($r=-0.25$; $p=0.02$). Στον πίνακα 11 φαίνονται, επίσης, τα επίπεδα έκφρασης του mRNA για τα τρία γονίδια ανά τριάδες.

3. ΕΚΦΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΚΑΙ ΑΠΑΝΤΗΣΗ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Ένα λογιστικό παλίνδρομο μοντέλο εφαρμόστηκε για κάθε γονίδιο ως συνεχής παράμετρος, με σκοπό τη πρόβλεψη απάντησης στη θεραπεία. Καθώς τα επίπεδα του BRCA1 αυξάνονταν, η πιθανότητα απάντησης αυξάνονταν, επίσης, σημαντικά (Odds ratio, OR=1.09; 95%CI: 1,02-1,16; $p=0,01$). Αντίθετα, καθώς τα επίπεδα του RRM2 αυξάνονταν, η πιθανότητα απάντησης μειώνονταν σημαντικά (OR=0.94; 95%CI: 0.91-0.97; $p=0.0001$). Μια παρόμοια αλλά όχι σημαντική τάση παρατηρήθηκε και για τα επίπεδα του RRM1 (OR=0.97; 95%CI, 0.77-1.23; $p=0.82$).

Όταν οι απαντητές ταξινομήθηκαν σύμφωνα με τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων σε τριάδες, η πλειονότητα των απαντητών εμφάνιζαν υψηλή BRCA1 και χαμηλή RRM2 έκφραση: 58.6% στην

υψηλότερη τριάδα έκφρασης BRCA1 ($p=0.002$) και 72.4% στη χαμηλότερη τριάδα έκφρασης του RRM2 ($p=0.0001$) (Πίνακας 12).

Πίνακας 12: Μονοπαραγοντική και πολύ παραγοντική ανάλυση για απάντηση στην θεραπεία

| | CR+PR N (%) | SD+PD N (%) | <i>p</i> | Univariate OR (95% CI) | <i>p</i> | Multivariate OR (95% CI) | <i>p</i> |
|----------------|-------------|-------------|----------|------------------------|----------|--------------------------|----------|
| BRCA1 | | | 0.002 | | | | |
| T1 | 8 (27.6) | 23 (34.8) | | 0.31 (0.11-0.89) | 0.03 | 0.54 (0.13-2.22) | 0.40 |
| T2 | 4 (13.8) | 28 (42.4) | | 0.13 (0.04-0.44) | 0.001 | 0.22 (0.05-1.01) | 0.05 |
| T3 | 17 (58.6) | 15 (22.7) | | 1 | | 1 | |
| RRM1 | | | 0.56 | | | | |
| T1 | 12 (41.4) | 20 (30.3) | | 1 | | 1 | |
| T2 | 9 (31) | 23 (34.8) | | 0.65 (0.23-1.87) | 0.43 | 1.43 (0.34-6.03) | 0.62 |
| T3 | 8 (27.6) | 23 (34.8) | | 0.58 (0.20-1.70) | 0.32 | 0.95 (0.22-4.13) | 0.94 |
| RRM2 | | | <0.001 | | | | |
| T1 | 21 (72.4) | 10 (15.2) | | 1 | | 1 | |
| T2 | 7 (24.1) | 25 (37.9) | | 0.13 (0.04-0.41) | <0.001 | 0.20 (0.06-0.73) | 0.02 |
| T3 | 1 (3.4) | 31 (47) | | 0.02 (0.002-0.13) | <0.001 | 0.02 (0.002-0.17) | <0.001 |
| ECOG PS | | | 0.02 | | | | |
| 0 | 24 (82.8) | 38 (57.6) | | 1 | | 1 | |
| 1-2 | 5 (17.2) | 28 (42.4) | | 0.28 (0.10-0.83) | 0.02 | 0.44 (0.11-1.69) | 0.23 |
| STAGE | | | 0.31 | | | | |
| III B | 10 (34.5) | 15 (22.7) | | 1 | | 1 | |
| IV | 19 (65.5) | 51 (77.3) | | 0.56 (0.21-1.46) | 0.23 | 0.45 (0.12-1.74) | 0.25 |

CR, complete response; PR, partial response; SD, stable disease; PD, progressive disease; OR, odds ratio; T, terates; PS, performance status.
doi:10.1371/journal.pone.0003695.t002

Η μονοπαραγοντική λογιστική παλίνδρομη ανάλυση αποκάλυψε πως η χαμηλή RRM2 έκφραση, ECOG PS 0 και υψηλή BRCA1 έκφραση σχετίζονταν σημαντικά με υψηλότερη πιθανότητα απάντησης (Πίνακας 12). Στη πολυπαραγοντική λογιστική παλίνδρομη ανάλυση αυτών των μεταβλητών μαζί με RRM1 και στάδιο νόσου, φάνηκε μόνο η χαμηλή έκφραση RRM2 ως ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας για απάντηση (Πίνακας 12).

4. ΕΚΦΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΚΑΙ ΧΡΟΝΟΣ ΕΩΣ ΕΠΙΔΕΙΝΩΣΗ

Η μονοπαραγοντική ανάλυση για το χρόνο έως επιδείνωση της νόσου αποκάλυψε πως η μόνη κλινική παράμετρος που σχετιζόταν ήταν το PS (Hazard Ratio [HR] για PS:1-2, 1.55; 95%CI: 0.99-2.41; $p=0,05$) (Πίνακας 13). Η μονοπαραγοντική ανάλυση για το χρόνο έως επιδείνωση, σύμφωνα με τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης ως συνεχείς μεταβλητές, έδειξε πως καθώς οι τιμές των RRM1 και RRM2 αυξάνονταν, ο κίνδυνος επιδείνωσης αυξάνονταν σημαντικά: RRM1 (HR, 1,02; 95% CI, 1,01-1,02; $p=0,001$), RRM2 (HR, 1,005; 95% CI, 1,001-1,008; $p=0,01$). Από την άλλη μεριά, καθώς τα επίπεδα του BRCA1 αυξάνονταν, ο κίνδυνος επιδείνωσης ελαττωνόταν (HR, 0,99; 95% CI, 0,95-1,02; $p=0,36$).

Όταν τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης κατηγοριοποιούνταν σε τριάδες, ο κίνδυνος επιδείνωσης ήταν σημαντικότερος στην ενδιάμεση και την υψηλότερη τριάδα για το RRM1 και RRM2 από ότι στη χαμηλότερη τριάδα: RRM1 ενδιάμεση τριάδα (HR, 1,20; 95% CI, 0,72-1,97; $p=0,49$), RRM1 υψηλότερη τριάδα (HR, 1,51; 95% CI, 0,91-2,51; $p=0,11$), RRM2 ενδιάμεση τριάδα (HR, 1,28; 95% CI, 0,77-2,13; $p=0,35$), RRM2 υψηλότερη τριάδα (HR, 1,93; 95% CI, 1,16-3,22; $p=0,01$) (Πίνακας 13). Ο κίνδυνος επιδείνωσης ήταν σημαντικότερος για τους ασθενείς της ενδιάμεσης και χαμηλής τριάδας του BRCA1 από ότι αυτών της υψηλής τριάδας: BRCA1 ενδιάμεση τριάδα (HR, 1,33; 95% CI, 0,80-2,22; $p=0,28$), BRCA1 χαμηλή τριάδα (HR, 1,51; 95% CI, 0,91-2,49; $p=0,11$). (Πίνακας

13). Ο χρόνος έως επιδείνωση της νόσου σύμφωνα με τη γονιδιακή έκφραση σε τριάδες φαίνεται στον Πίνακα 13.

Πίνακας 13: Μέσος χρόνος έως επιδείνωση ανάλογα με την έκφραση των γονιδίων και το στάδιο της νόσου

| | TTP mos (95% CI) | Log-rank p | Univariate HR (95% CI) | Cox p | Multivariate HR (95% CI) | Cox p |
|--------------|------------------|------------|------------------------|-------|--------------------------|-------|
| BRCA1 | | 0.25 | | | | |
| T1 | 3 (1.9-4.1) | | 1.51 (0.91-2.49) | 0.11 | 1.51 (0.86-2.65) | 0.15 |
| T2 | 3.6 (2.2-4.9) | | 1.33 (0.80-2.22) | 0.28 | 1.10 (0.62-1.95) | 0.74 |
| T3 | 5.5 (3.1-7.9) | | 1 | | 1 | |
| RRM1 | | 0.27 | | | | |
| T1 | 6 (0.2-11.8) | | 1 | | 1 | |
| T2 | 3.7 (0.6-6.6) | | 1.20 (0.72-1.97) | 0.49 | 1.39 (0.82-2.37) | 0.22 |
| T3 | 3.3 (2.2-4.4) | | 1.51 (0.91-2.51) | 0.11 | 1.72 (0.99-3) | 0.06 |
| RRM2 | | 0.03 | | | | |
| T1 | 8.7 (4.9-12.4) | | 1 | | 1 | |
| T2 | 3.6 (2-5.2) | | 1.28 (0.77-2.13) | 0.35 | 1.02 (0.57-1.80) | 0.95 |
| T3 | 2.7 (1.6-3.8) | | 1.93 (1.16-3.22) | 0.01 | 1.55 (0.89-2.71) | 0.12 |
| P5 | | 0.05 | | | | |
| 0 | 5.23 (3.99-6.48) | | 1 | | 1 | |
| 1-2 | 2.70 (1.99-3.41) | | 1.55 (0.99-2.41) | 0.05 | 1.62 (1.01-2.59) | 0.05 |
| STAGE | | 0.13 | | | | |
| IIIb | 5.50 (1.86-9.15) | | 1 | | 1 | |
| IV | 4.17 (3.05-5.28) | | 1.45 (0.89-2.36) | 0.13 | 1.43 (0.86-2.38) | 0.17 |

TTP, time to progression; HR, hazard ratio; T, tertile; P5, performance status.
doi:10.1371/journal.pone.0003695.t003

Ένα μοντέλο πολυπαραγοντικής ανάλυσης εφαρμόστηκε για τις παραμέτρους που εξετάστηκαν στη μονοπαραγοντική ανάλυση.

Όταν εξετάστηκαν όροι αλληλεπίδρασης για να ελεγχθεί το κατά πόσο αυτοί βελτίωναν σημαντικά την εφαρμογή, κανένας δεν ήταν σημαντικός, εκτός από το BRCA1*RRM1, το οποίο έδινε μια σημαντικότητα με $p=0,02$ στο μοντέλο χωρίς όρο αλληλεπίδρασης (Πίνακας 14). Το πολυπαραγοντικό μοντέλο επομένως, εφαρμόστηκε σε επίπεδα από το RRM1 (Πίνακας 15) και χωρίς το στάδιο νόσου. Σε αυτό το μοντέλο, οι ασθενείς της χαμηλότερης τριάδας του RRM2 συνέχιζαν να έχουν τον χαμηλότερο κίνδυνο επιδείνωσης, ανεξάρτητα από τα επίπεδα του RRM1.

Πίνακας 14: Αλληλεπιδράσεις για TTP

| | | Multivariate Analysis HR (95% CI) | Cox p |
|-------------------|----------------|--------------------------------------|-------|
| BRCA1 | | | |
| | T1 | 0.82 (0.34-2.01) | 0.67 |
| | T2 | 0.57 (0.19-1.73) | 0.32 |
| | T3 | 1 | |
| RRM1 | | | |
| | T1 | 1 | |
| | T2 | 0.37 (0.12-1.14) | 0.08 |
| | T3 | 1.62 (0.68-3.84) | 0.28 |
| RRM2 | | | |
| | T1 | 1 | |
| | T2 | 1.40 (0.75-2.61) | 0.30 |
| | T3 | 1.82 (1.01-3.27) | 0.05 |
| PS | | | |
| | 0 | 1 | |
| | 1-2 | 1.70 (1.05-2.75) | 0.03 |
| STAGE | | | |
| | IIIB | 1 | |
| | IV | 1.38 (0.82-2.32) | 0.22 |
| BRCA1*RRM1 | | | |
| | BRCA1T3*RRM1T1 | 1 | |
| | BRCA1T1*RRM1T2 | 5.46 (1.30-22.94) | 0.02 |
| | BRCA1T2*RRM1T2 | 7.06 (1.52-32.65) | 0.01 |
| | BRCA1T1*RRM1T3 | 1.54 (0.41-5.82) | 0.53 |
| | BRCA1T2*RRM1T3 | 0.78 (0.20-2.99) | 0.71 |

Πίνακας 15: Πολυπαραγοντική ανάλυση του TTP εφαρμοσμένη σε επίπεδα από το RRM1

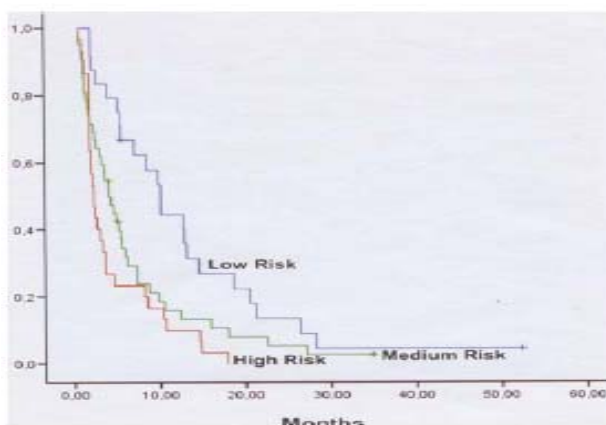
| | | RRM1 T1 | | RRM1 T2 | | RRM1 T3 | |
|--------------|-----|------------------|-------|-------------------|-------|------------------|-------|
| | | HR (95% CI) | Cox p | HR (95% CI) | Cox p | HR (95% CI) | Cox p |
| BRCA1 | | | | | | | |
| | T1 | 0.72 (0.23-2.23) | 0.57 | 4.59 (1.35-15.58) | 0.01 | 1.80 (0.63-5.10) | 0.27 |
| | T2 | 0.35 (0.09-1.38) | 0.13 | 4.72 (1.44-15.44) | 0.01 | 0.64 (0.24-1.74) | 0.38 |
| | T3 | 1 | | 1 | | 1 | |
| RRM2 | | | | | | | |
| | T1 | 1 | | 1 | | 1 | |
| | T2 | 2.44 (0.81-7.35) | 0.11 | 2.30 (0.74-7.15) | 0.15 | 1.15 (0.34-3.83) | 0.82 |
| | T3 | 1.21 (0.35-4.22) | 0.77 | 3.07 (0.98-9.59) | 0.05 | 1.55 (0.60-3.96) | 0.37 |
| PS | | | | | | | |
| | 0 | 1 | | 1 | | 1 | |
| | 1-2 | 2.27 (0.98-5.26) | 0.06 | 0.77 (0.31-1.92) | 0.58 | 2.98 (1.21-7.35) | 0.02 |

Οι ασθενείς κατηγοροποιήθηκαν σε τρεις ομάδες ανάλογα με τον κίνδυνο επιδείνωσης, βασισμένο στην αλληλεπίδραση που παρατηρήθηκε μεταξύ του RRM1 και BRCA1. Έτσι, 24 ασθενείς αποτελούσαν τη χαμηλού κινδύνου ομάδα (ενδιάμεσο BRCA1+χαμηλό RRM1, υψηλό BRCA1+χαμηλό RRM1, υψηλό BRCA1+ενδιάμεσο RRM1), 42 ασθενείς ανήκαν στην ενδιάμεσου κινδύνου ομάδα (χαμηλό BRCA1+χαμηλό RRM1, ενδιάμεσο BRCA1+υψηλό RRM1, υψηλό BRCA1+υψηλό RRM1) και 30 ασθενείς αποτελούσαν την υψηλού κινδύνου ομάδα (χαμηλό BRCA1+ενδιάμεσο RRM1, ενδιάμεσο BRCA1+ενδιάμεσο RRM1, χαμηλό BRCA1+υψηλό RRM1).

Ο διάμεσος χρόνος έως επιδείνωση ήταν 10,3 μήνες (95% CI, 7,65-12,62) για τους ασθενείς της ομάδας χαμηλού κινδύνου, 4,17 μήνες (95% CI, 2,90-5,44) για τους ασθενείς της ομάδας ενδιάμεσου κινδύνου και 2,30 μήνες (95% CI, 1,76-2,84) για τους ασθενείς της ομάδας υψηλού κινδύνου ($p=0,001$) (Πίνακες 15,16, Εικόνα 6).

Πίνακας 16: Ο διάμεσος χρόνος έως επιδείνωση εφαρμοσμένος σε επίπεδα από το RRM1

| RRM1 T1 | | | | RRM1 T2 | | | RRM1 T3 | | | |
|--------------|-----------|-----------|-------------------|---------|-----------|--------------------|---------|-----------|------------------|------|
| | | N (%) | TTP mos (95%CI) | p | N (%) | TTP mos (95%CI) | p | N (%) | TTP mos (95%CI) | p |
| BRCA1 | | | | 0.75 | | | 0.007 | | | 0.68 |
| | T1 | 16 (50) | 4.17 (3.71-4.62) | | 10 (31.3) | 2 (1.28-2.72) | | 6 (18.8) | 2.40 (1.08-3.72) | |
| | T2 | 6 (18.8) | 8.50 (0-17.42) | | 14 (43.8) | 2 (1.10-3.30) | | 12 (37.5) | 3.60 (1.13-6.07) | |
| | T3 | 10 (31.3) | 9.87 (2.69-17.05) | | 8 (25) | 12.80 (0-26.82) | | 14 (43.8) | 3.57 (0-7.85) | |
| RRM2 | | | | 0.49 | | | 0.06 | | | 0.76 |
| | T1 | 14 (43.8) | 9.87 (7.24-12.50) | | 7 (21.9) | 14.63 (6.23-23.04) | | 11 (34.4) | 4.97 (0.83-9.10) | |
| | T2 | 11 (34.4) | 4.33 (0.34-8.33) | | 13 (40.6) | 3.63 (1.52-5.75) | | 8 (25) | 3 (2.51-3.49) | |
| | T3 | 7 (21.9) | 3.20 (1.92-4.48) | | 12 (37.5) | 2.20 (1.52-2.88) | | 13 (40.6) | 3 (1.30-5.30) | |



Εικόνα 6: Χρόνος έως επιδείνωση ανάλογα με την ομάδα κινδύνου

5. ΕΚΦΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΚΑΙ ΕΠΙΒΙΩΣΗ

Στη μονοπαραγοντική ανάλυση για την επιβίωση, η μόνο σημαντική μεταβλητή ήταν το PS (HR για PS 1-2, 1,94; 95% CI, 1,21-3,12; $p=0,005$) (Πίνακας 17). Καθώς οι τιμές των RRM1 και RRM2 αυξάνονταν, ο κίνδυνος θανάτου αυξάνονταν επίσης: RRM1 (HR, 1,01; 95% CI, 1,00-1,02; $p=0,005$), RRM2 (HR, 1,004; 95% CI, 1,00-1,008; $p=0,06$). Αντίθετα, καθώς τα επίπεδα του BRCA1 αυξανόταν, ο κίνδυνος θανάτου μειώνονταν (HR, 0,99; 95% CI, 0,96-1,03; $p=0,60$). Όταν τα επίπεδα της γονιδιακής έκφρασης κατηγοριοποιήθηκαν σε τριάδες, το ίδιο μοντέλο αυξημένου κινδύνου θανάτου παρατηρήθηκε στα υψηλά επίπεδα τόσο του RRM1 όσο και του RRM2 και στα χαμηλά επίπεδα του BRCA1 (Πίνακας 17). Στο πολυπαραγοντικό μοντέλο που συμπεριλάμβανε όλες τις μεταβλητές της μονοπαραγοντικής ανάλυσης, μόνο το PS φάνηκε να είναι σημαντικός παράγοντας στην επιβίωση (Πίνακας 17).

Πίνακας 17: Μέση επιβίωση σύμφωνα με την έκφραση των γονιδίων, το PS και το στάδιο της νόσου

| | MS mos (95% CI) | Log-rank <i>p</i> | Univariate HR (95% CI) | Cox <i>p</i> | Multivariate HR (95% CI) | Cox <i>p</i> |
|--------------|---------------------|-------------------|------------------------|--------------|--------------------------|--------------|
| BRCA1 | | 0,37 | | | | |
| T1 | 12 (6,4–17,6) | | 1,28 (0,74–2,21) | 0,37 | 1,39 (0,75–2,56) | 0,29 |
| T2 | 8,5 (2,2–14,8) | | 1,51 (0,85–2,88) | 0,16 | 1,48 (0,79–2,79) | 0,22 |
| T3 | 12,7 (5,7–19,7) | | 1 | | 1 | |
| RRM1 | | 0,39 | | | | |
| T1 | 12 (5,7–18,3) | | 1 | | 1 | |
| T2 | 10,6 (5,3–15,8) | | 1,17 (0,68–2,02) | 0,57 | 1,37 (0,76–2,46) | 0,29 |
| T3 | 11,2 (2,9–19,5) | | 1,47 (0,85–2,56) | 0,17 | 1,73 (0,94–3,18) | 0,08 |
| RRM2 | | 0,48 | | | | |
| T1 | 15,2 (10,1–20,2) | | 1 | | 1 | |
| T2 | 9,3 (3,7–14,8) | | 1,15 (0,66–2,01) | 0,62 | 0,74 (0,39–1,40) | 0,35 |
| T3 | 6,6 (1,5–11,7) | | 1,40 (0,81–2,42) | 0,23 | 0,91 (0,49–1,71) | 0,77 |
| PS | | 0,005 | | | | |
| 0 | 15,17 (10,15–20,18) | | 1 | | 1 | |
| 1–2 | 6,30 (4,16–8,44) | | 1,94 (1,21–3,12) | 0,006 | 2,07 (1,25–3,43) | 0,005 |
| STAGE | | 0,10 | | | | |
| IIIb | 17,93 (2,25–33,62) | | 1 | | 1 | |
| IV | 10,27 (5,85–14,68) | | 1,57 (0,92–2,63) | 0,10 | 1,45 (0,85–2,47) | 0,18 |

MS, median survival; HR, hazard ratio; T, tertile; PS, performance status.
doi:10.1371/journal.pone.0003695.t004

6. ΕΚΦΡΑΣΗ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΚΑΙ 2^{ης} ΓΡΑΜΜΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

2^{ης} γραμμής θεραπεία χορηγήθηκε σε 31 ασθενείς, από τους οποίους το 90,3% έλαβε σχήμα βασισμένο σε cisplatin. Δεν υπήρχαν διαφορές στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων μεταξύ των ασθενών που έλαβαν και αυτών που δεν έλαβαν 2^{ης} γραμμής θεραπεία. Ο χρόνος έως επιδείνωση της νόσου για όλους τους 31 ασθενείς υπολογιζόμενος από την έναρξη της 2^{ης} γραμμής θεραπεία ήταν 3,40 μήνες (95% CI, 2,73–4,07). Σε αντίθεση με το μοντέλο που παρατηρήθηκε στην 1^{ης} γραμμής θεραπεία, τα χαμηλά επίπεδα του BRCA1 σχετίζονταν σημαντικά με χαμηλότερο κίνδυνο επιδείνωσης της νόσου στην 2^{ης} γραμμής θεραπεία. Ο διάμεσος χρόνος έως επιδείνωση ήταν 6,60 μήνες για τους ασθενείς της χαμηλότερης τριάδας, 2 μήνες για αυτούς της ενδιάμεσης και 2,40 μήνες για

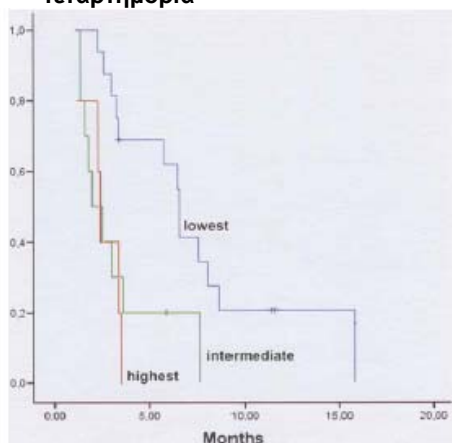
αυτούς της υψηλότερης τριάδας έκφρασης του BRCA1 ($p=0,004$) (Πίνακας 18, Εικόνα 7). Τόσο στη μονοπαραγοντική όσο και στη πολυπαραγοντική ανάλυση του χρόνου έως επιδείνωση της νόσου στους 31 ασθενείς που έλαβαν 2^{ης} γραμμής θεραπεία, ο μόνος σημαντικός παράγοντας που αποκαλύφθηκε ήταν η έκφραση του BRCA1 mRNA (Πίνακας 19).

Πίνακας 18: TTP μετά από θεραπεία 1^{ης} γραμμής σύμφωνα με τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης 31 ασθενών που λάμβαναν θεραπεία 2^{ης} γραμμής

| | N | TTP mos (95% CI) | p |
|--------------|----|-------------------|--------------|
| BRCA1 | | | 0.004 |
| T1 | 16 | 6.60 (6.42-6.78) | |
| T2 | 10 | 2.00 (0.92-3.09) | |
| T3 | 5 | 2.40 (2.19-2.62) | |
| RRM1 | | | 0.49 |
| T1 | 10 | 2.60 (1.67-3.53) | |
| T2 | 13 | 5.80 (1.64-9.96) | |
| T3 | 8 | 3.50 (2.67-4.33) | |
| RRM2 | | | 0.76 |
| T1 | 5 | 6.50 (0.11-12.90) | |
| T2 | 9 | 5.80 (0-12.23) | |
| T3 | 17 | 3 (1.92-4.08) | |

TTP, time to progression; T, tier/level.
doi:10.1371/journal.pone.0003695.t005

Εικόνα 7: TTP μετά από θεραπεία 1^{ης} γραμμής σύμφωνα με τα BRCA1 τεταρτημόρια



Πίνακας 19: Μονοπαραγοντική και πολυπαραγοντική ανάλυση του TTP μετά από θεραπεία 1^{ης} γραμμής σύμφωνα με τα επίπεδα γονιδιακής έκφρασης 31 ασθενών που λάμβαναν θεραπεία 2^{ης} γραμμής

| | | N | Univariate HR (95% CI) | Cox p | Multivariate HR (95% CI) | Cox p |
|--------------|-----|----|------------------------|-------|--------------------------|-------|
| BRCA1 | T1 | 16 | 1 | | 1 | |
| | T2 | 10 | 3.35 (1.33-8.44) | 0.01 | 4.37 (1.53-12.49) | 0.006 |
| | T3 | 5 | 4.78 (1.50-15.26) | 0.008 | 6.61 (1.86-23.50) | 0.004 |
| RRM1 | T1 | 10 | 1 | | 1 | |
| | T2 | 13 | 0.76 (0.32-1.85) | 0.55 | 0.47 (0.14-1.60) | 0.23 |
| | T3 | 8 | 0.54 (0.19-1.53) | 0.24 | 0.37 (0.10-1.35) | 0.13 |
| RRM2 | T1 | 5 | 1 | | 1 | |
| | T2 | 9 | 0.72 (0.21-2.49) | 0.61 | 1.22 (0.24-6.14) | 0.81 |
| | T3 | 17 | 1.01 (0.32-3.10) | 0.99 | 1.82 (0.42-8.01) | 0.43 |
| PS | 0 | 22 | 1 | | 1 | |
| | 1-2 | 9 | 1.61 (0.67-3.83) | 0.28 | 1.78 (0.64-4.91) | 0.27 |

HR, hazard ratio; PS, performance status.
doi:10.1371/journal.pone.0003695.t006

Γ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η προοπτική μελέτη φάσης II καταδεικνύει ότι ο φαρμακευτικός συνδυασμός docetaxel και gemcitabine ως 1^{ης} γραμμής Χ/Θ συνιστά ένα ενεργό χημειοθεραπευτικό σχήμα στους ηλικιωμένους ασθενείς με προχωρημένο αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα με ένα συνολικό ποσοστό ανταπόκρισης 31.2%, μια διάμεση TTP 4.1 μήνες και μια διάμεση ολική επιβίωση 9.4 μήνες. Αυτές οι παρατηρήσεις προτείνουν ξεκάθαρα ότι το docetaxel/gemcitabine σχήμα μπορεί να είναι μια αξιόλογη θεραπευτική επιλογή για αυτή την ομάδα των ασθενών

Η πλακώδης ιστολογία συνήθως είναι πιο επικρατούσα στους ηλικιωμένους αλλά είναι πιθανό ότι αυτό έχει αρχίσει να αλλάζει λόγω της απαγόρευσης του καπνίσματος και της επαγγελματικής έκθεσης. Ο πιο συχνός υποτύπος ΚΠ στις μέρες μας σε μη-καπνιστές εμφανίζεται να είναι το αδενοκαρκίνωμα όπως εμφανίζεται από αναθεώρηση 16 μελετών πριν το 1990 (υπολογίζεται περίπου 60%) (**Koo & Ho, 1990**). Στο μέλλον, ίσως αντιμετωπιστεί μια επιδημία αδενοκαρκινώματος πνεύμονα s-τύπου.

Βασιζόμενοι σε προηγούμενες δικές μας παρατηρήσεις όπου, ο συνδυασμός docetaxel/gemcitabine έδωσε σημαντικά καλύτερες αντικειμενικές ανταποκρίσεις σε αδενοκαρκίνωμα (43%) σε σύγκριση με

μη-αδενοκαρκίνωμα (28%), ενώ το αντίστροφο παρατηρήθηκε με το σχήμα cisplatin/docetaxel (23% vs 40%) (**Georgoulis et al., 2001**), αποφασίσθηκε ο συνδυασμός να μελετηθεί σε ηλικιωμένους ασθενείς που έπασχαν μόνο από αδενοκαρκίνωμα. Πρόσφατα, παρόμοιες διαφορές στην αποτελεσματικότητα όσον αφορά τα διάφορα Χ/Θ σχήματα στο αδενοκαρκίνωμα αναφέρθηκαν για τον συνδυασμό cisplatin/pemetrexed (**Scagliotti et al., 2007**).

Υπάρχουν μερικές θεραπευτικές επιλογές για τους ηλικιωμένους ασθενείς με προχωρημένο ΜΜΚΠ, που συμπεριλαμβάνοντας καλύτερη υποστηρικτική φροντίδα, μονο-χημειοθεραπεία με τρίτης γενιάς φάρμακο, συνδυασμό Χ/Θ που βασίζεται σε μη-πλατινούχα σχήματα, Χ/Θ με πλατίνα και νέοι βιολογικοί παράγοντες. Πράγματι, η ELVIS μελέτη επιβεβαίωσε ότι η μονοθεραπεία με vinorelbine βελτιώνει σημαντικά τη διάμεση συνολική επιβίωση και τη ποιότητα ζωής σε σύγκριση με την υποστηρικτική φροντίδα μόνο (27 εβδομάδες σε σχέση με 21 εβδομάδες, αντιστοίχως; $p = 0.04$) (**ELVIS, 1999**).

Σε ασθενείς μεγαλύτερους από 70 ετών, η gemcitabine πρόσφερε συνολικές απαντήσεις 18–38%, διάμεση επιβίωση 6.8–9 μήνες και μία προβλέψιμη και αποδεκτή τοξικότητα (**Araya et al., 2007, Santo et al., 2006**). Όσον αφορά τη docetaxel, μία πρόσφατη τυχαιοποιημένη μελέτη φάσης III (με 182 ασθενείς) έδειξε ότι η docetaxel βελτίωσε την ελεύθερη από πρόοδο νόσου διάστημα επιβίωση, το ποσοστό αντικειμενικής ανταπόκρισης και τα σχετιζόμενα με τη νόσο συμπτώματα σε σχέση με τη

vinorelbine (**Kudoh et al., 2006**). Εν τούτοις, η συνολική επιβίωση δεν βελτιώθηκε σημαντικά (14.3 μήνες σε σχέση με 9.9 μήνες, αντιστοίχως; $p=0.138$).

Είναι ακόμη ασαφές εάν ένας συνδυασμός χημειοθεραπευτικών σχημάτων είναι καλύτερος από μονοθεραπεία για τη θεραπεία του ΜΜΚΠ στους ηλικιωμένους.

Η χρήση συνδυασμών με cisplatin παραμένει αμφιλεγόμενη λόγω της εκσεσημασμένης μυελοτοξικότητας και του μεγαλύτερου κινδύνου για σχετιζόμενους με τη Χ/Θ θανάτους από τη χορήγηση cisplatin σε ηλικιωμένους σε σχέση με τους νεότερους ασθενείς (**Hutchins et al., 1999, Gridelli et al., 2003**). Η νεφροτοξικότητα της cisplatin μπορεί να ελαττωθεί με την υπερ-ενυδάτωση του ασθενούς. Αυτό όμως είναι δύσκολο να γίνει σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια, κάτι που είναι σύνηθες στους ηλικιωμένους με ΜΜΚΠ.

Το εφικτό δίο τέτοιων συνδυασμών ελέγχθηκε σε πρόσφατα δημοσιευμένες μελέτες MILES-2P (**Gridelli et al., 2007**). Αυτές οι μελέτες καθόρισαν τις συνιστώμενες δόσεις για τη cisplatin (60mg/m² και 40mg/m²) όταν συνδυάζεται με gemcitabine και vinorelbine, αντιστοίχως, και κατέδειξαν και οι δύο συνδυασμοί είναι πραγματοποιήσιμοι και δραστικοί. Όσον αφορά τα μη-πλατινούχα σχήματα, η πολυκεντρική μελέτη MILES (Multicenter Italian Lung Cancer in the Elderly Study) απέτυχε να καταδείξει κάποιο πλεονέκτημα επιβίωσης του συνδυασμού vinorelbine και gemcitabine σε σχέση με τη vinorelbine ή τη gemcitabine

ως μονοθεραπεία (**Gridelli et al., 2003**). Τα δεδομένα αποτελεσματικότητας του σχήματος docetaxel και gemcitabine που παρουσιάστηκαν στη παρούσα μελέτη συγκρίθηκαν επιτυχώς με την αναφερόμενη αποτελεσματικότητα του συνδυασμού vinorelbine με gemcitabine της μελέτης του Frasci (ORR 20% και διάμεση επιβίωση 7.3 μήνες) (**Frasci et al., 2001**) και της μελέτης MILES (ORR 21% και διάμεση επιβίωση 7 μήνες). Επιπλέον, η παρατηρούμενη συνολική επιβίωση με τον συνδυασμό docetaxel/gemcitabine αποτέλεσε το πρωταρχικό στόχο της μελέτης και έδειξε μια διάμεση συνολική επιβίωση τουλάχιστον 9 μήνες όπως και στη περίπτωση της μονοθεραπείας με vinorelbine στη μελέτη MILES; Αυτό το εύρημα υποστηρίζει τη σύγκριση σχήματος docetaxel/gemcitabine με vinorelbine ή gemcitabine μονοθεραπεία σε μια τυχαίοποιημένη μελέτη φάσης III (**Gridelli et al., 2007**). Επίσης τα αποτελέσματά μας είναι συνεπή όσον αφορά τη TTP με μια τυχαίοποιημένη μελέτη φάσης III που συγκρίνει ένα εναλλακτικό σχήμα εβδομαδιαίας χορήγησης docetaxel με docetaxel/gemcitabine σε ένα μικτό πληθυσμό με ηλικιωμένους ή φτωχής κλινικής κατάστασης ασθενείς (OS: 4.8 μήνες για το συνδυασμό vs 2.9 μήνες για τη μονοθεραπεία, $p=0.004$) (**Hainsworth et al., 2007**). Ωστόσο, σε αυτή τη μελέτη η διάμεση επιβίωση κάθε σχήματος ήταν απογοητευτική (docetaxel 5.1 μήνες vs docetaxel/gemcitabine 5.5 μήνες); Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο μεγάλο αριθμό ασθενών με κακή γενική κλινική κατάσταση που εντάχθηκαν στη μελέτη. Παράλληλα, τα αποτελέσματα της

αποτελεσματικότητας του σχήματος docetaxel/gemcitabine είναι συγκρίσιμα με αυτά που προκύπτουν από το ίδιο σχήμα σε τυχαιοποιημένες μελέτες που περιλαμβάνουν νεότερους ασθενείς άσχετα με την ιστολογία των όγκων τους (**Georgoulas et al., 2001, Kosmidis et al., 2002, Gridelli et al., 2003**).

Σε μία άλλη πρόσφατη μελέτη (**Tibaldi et al., 2008**), οι ερευνητές εξέτασαν την αποτελεσματικότητα και την ασφάλεια συνεχόμενης χορήγησης 3 κύκλων gemcitabine που ακολουθούνταν από 3 κύκλους docetaxel σε ηλικιωμένους ασθενείς. Αυτοί βρήκαν παρόμοια αποτελέσματα με τη μελέτη μας με ρυθμό απάντησης 16%, σταθερή νόσο 41%, διάμεση TTP 4.8 μήνες και επιβίωση 8.0 μήνες. Κάποιος θα μπορούσε να σχολιάσει σε αυτή τη μελέτη ότι 40% (24 από τους 56 ασθενείς) δεν έλαβαν τη προγραμματισμένη χορήγηση docetaxel πιθανόν λόγω προόδου της νόσου. Αυτό οδηγεί σε έναν επαναπροσδιορισμό των αποτελεσμάτων για την αποτελεσματικότητα της Χ/Θ. Επιπλέον, η ένταση της χορηγούμενης δόσης των φαρμάκων ήταν μικρότερη από ότι στη μελέτη μας ενώ τα ποσοστά για απαιτούμενες μειώσεις στις δόσεις ήταν περίπου οι ίδιες (10% και στις δύο μελέτες). Έτσι, ο υποτιθέμενος πιο συνετός τρόπος για τη χορήγηση του σχήματος docetaxel/gemcitabine δεν είναι καλύτερος ούτε όσον αφορά την αποτελεσματικότητα ούτε την ασφάλεια.

Το προφίλ ασφάλειας της erlotinib αναδεικνύει αυτή τη θεραπεία σαν μια υποψήφια πρώτης γραμμής μονοθεραπεία για ηλικιωμένο

πληθυσμό. Σε μία μελέτη φάσης II (**Jackman et al., 2007**), ο Jackman και οι συνεργάτες του χορήγησαν μονοθεραπεία με erlotinib σε 80 ασθενείς ≥ 70 χρονών που είχαν λάβει προηγουμένως θεραπεία για προχωρημένο ΜΜΚΠ. Ο πρωταρχικός σκοπός ήταν η διάμεση επιβίωση. Το κλινικό πλεονέκτημα ήταν 54%. Η διάμεση επιβίωση ήταν 10.9 μήνες—ένα αποτέλεσμα συγκρίσιμο με τη μελέτη μας. Η τοξικότητα ήταν περιορισμένη συνολικά και συμπεριλάμβανε διάρροια και εξάνθημα σε ποσοστό περίπου 5%. Μια κριτική που θα μπορούσε να γίνει είναι ότι υπήρχε μεροληψία κατά τη διάρκεια της επιλογής.

Οι ασθενείς που θεωρούνταν κατάλληλοι διέθεταν έναν κλινικό φαινότυπο που προβλέπει την απάντηση στη θεραπεία με per os TKI. Πράγματι, το 50% των ασθενών ήταν γυναίκες, το 64% είχαν αδenoκαρκίνωμα, και μόνο 6% ήταν πρόσφατοι καπνιστές. Αυτά τα κλινικά χαρακτηριστικά προβλέπουν μια κλινική απάντηση στο erlotinib. Οι αναστολείς EGFR τυροσίνης θα μπορούσαν να συγκριθούν με Χ/Θ σε έναν ηλικιωμένο μη-θεραπευμένο πληθυσμό όπου ο έλεγχος της νόσου και τα συμπτώματα του όγκου και της θεραπείας ήταν οι σημαντικοί στόχοι. Η κριτική αυτής της μελέτης συνίσταται στην υψηλή δόση docetaxel και στη προφυλακτική χρήση G-CSF η οποία αυξάνει το κόστος της θεραπείας. Είναι σίγουρο ότι χαμηλότερες δόσεις της docetaxel ή άλλα πλάνα για τη χορήγηση docetaxel θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν.

Ωστόσο, στη μελέτη αυτή η κύρια ερώτηση ήταν να αξιολογήσει εάν θα μπορούσε να επιβεβαιωθεί η αρχική παρατήρηση στο αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα. Κατά συνέπεια χρησιμοποιήθηκε η ίδια ακριβώς Χ/Θ όπως στην αρχική μελέτη (**Georgoulas et al., 2001**) παρά το κόστος της θεραπείας. Βασιζόμενοι στα προηγούμενα και τα τωρινά δεδομένα, δεν πιστεύουμε ότι η υψηλή δόση docetaxel με G-CSF είναι υποχρεωτική για τη θεραπεία του ΜΜΚΠ άσχετα με την ηλικία του ασθενούς.

Ο μέχρι τώρα αποδεκτός καθορισμός των ηλικιωμένων που είναι >70 χρόνων φαίνεται να είναι ο πιο κατάλληλος, καθώς η επίπτωση των σχετιζόμενων με την ηλικία αλλαγών αρχίζει να αυξάνει μετά την ηλικία της έβδομης δεκαετίας της ζωής, (**Gridelli et al., 2007, Balducci et al., 2000**). Μια σημαντική θεώρηση είναι ότι η αύξηση της ηλικίας είναι μια ετερογενής διαδικασία.

Εάν οι συστάσεις της SIOG πρέπει να ακολουθούνται θα ήταν αναγκαίο να χρησιμοποιηθούν μια γηριατρική κλίμακα κατάθλιψης, η κλίμακα “Folstein Mini Mental Status score” και ένα τεστ κλινικής κατάστασης όπως “Get Up and Go test”, “ADEL” και ιδιαίτερα “IADL” (**Extermann et al., 2005**), με σκοπό την εξατομίκευση της θεραπείας σε αυτόν τον πληθυσμό. Το Charlson score, ένα ειδικό εργαλείο διαστρωμάτωσης ηλικιωμένων που συνδυάζει ηλικία και συνοσηρότητα απέτυχε να δώσει επαρκές βάρος σε συγκεκριμένες νοσηρές καταστάσεις, όπως μια μέτρια προς σοβαρή νεφρική ανεπάρκεια η οποία είναι

συχνότερη σε αυτόν τον πληθυσμό (**Charlson et al., 1994**). Δυστυχώς αυτό δεν έγινε στη παρούσα μελέτη καθώς τη στιγμή που σχεδιάστηκε η μελέτη τέτοια λειτουργικά εργαλεία δεν είχαν γίνει ευρέως αποδεκτά. Το προφίλ τοξικότητας του σχήματος docetaxel/gemcitabine ήταν αποδεκτό και μπορούσε να διευθετηθεί με προβλέψιμη και αναστρέψιμη τοξικότητα, που ήταν παρόμοιο με εκείνο που παρατηρήθηκε σε άλλες προηγούμενες μελέτες (**Georgoulis et al., 2001, Georgoulis et al., 2005**).

Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση ήταν επίσης το εύρημα ότι η τοξικότητα του σχήματος docetaxel/gemcitabine ήταν ανεξάρτητη από τη γενική κλινική κατάσταση του ασθενούς. Αυτό είναι συνεπές με τα ευρήματα μιας πρόσφατης μελέτης που δείχνουν ότι η κλινική κατάσταση δεν συσχετίζεται με το Charlson score (**LeCaer et al., 2007**). Αυτές οι παρατηρήσεις υποστηρίζουν ξεκάθαρα την ανάγκη για ένα γηριατρικό λειτουργικό προσδιορισμό των ασθενών τη στιγμή της αρχικής κλινικής εκτίμησης, χρησιμοποιώντας έναν απλοποιημένο γηριατρικό προσδιορισμό.

Συμπερασματικά, τα ευρήματα της παρούσας μελέτης καταδεικνύουν ότι ο συνδυασμός docetaxel/gemcitabine είναι ένα δραστικό χημειοθεραπευτικό σχήμα σε ηλικιωμένους ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα παρά το γεγονός ότι απέτυχε να δείξει αποκλειστική αποτελεσματικότητα σε αυτόν τον τύπο ΚΠ. Πρόσφατες φαρμακογενωμικές μελέτες έχουν δείξει ότι η αποτελεσματικότητα διαφόρων Χ/Θ συσχετίζεται με την έκφραση διαφόρων γονιδίων από τον

όγκο που συμμετέχουν στην επιδιόρθωση του DNA ή στο μεταβολισμό των φαρμάκων. Με βάση τη παρατήρηση αυτή προχώρησε η περαιτέρω εκτίμηση του χημειοθεραπευτικού συνδυασμού docetaxel/gemcitabine με βάση το πρότυπο έκφρασης διαφόρων γονιδίων σε ασθενείς με ΜΜΚΠ.

Η μελέτη της έκφρασης των RRM1 και RRM2 mRNA σε αδενοκαρκίνωμα του πνεύμονα καταδεικνύει για πρώτη φορά τη θετική συσχέτιση ανάμεσα στη mRNA έκφραση των γονιδίων αυτών και της απάντησης στο συνδυασμό docetaxel/gemcitabine. Χαμηλά επίπεδα έκφρασης του mRNA της RRM2 συσχετίστηκαν με σημαντικά υψηλότερο ρυθμό απάντησης σε σύγκριση με ασθενείς με υψηλά επίπεδα έκφρασης του mRNA της RRM2. Πράγματι, μόνο 2 (9%) από τους 22 ασθενείς με υψηλά επίπεδα έκφρασης mRNA της RRM2 απάντησαν στο συνδυασμό docetaxel και gemcitabine. Επιπλέον, η πολυπαραγοντική μελέτη αποκάλυψε ότι η έκφραση mRNA της RRM2 ήταν ένας ανεξάρτητος προβλεπτικός παράγοντας για την απάντηση στη θεραπεία ($p=0.002$). Η πιθανότητα για απάντηση σε ασθενείς με χαμηλά επίπεδα έκφρασης mRNA της RRM2 ήταν 31.5 φορές υψηλότερη από ότι σε ασθενείς με υψηλά επίπεδα έκφρασης mRNA της RRM2. Επίσης, ασθενείς με RRM1 mRNA έκφραση στο χαμηλότερο τεταρτημόριο πετυχαίνουν ένα σημαντικά υψηλότερο TTP ($p=0.044$) και συνολική επιβίωση ($p=0.02$) και έδειξαν μια τάση για υψηλότερο ρυθμό απάντησης ($p=0.06$), σε σύγκριση με τους ασθενείς με RRM1 mRNA έκφραση στο υψηλότερο τεταρτημόριο.

Επίσης, ασθενείς με χαμηλή έκφρασης mRNA και των δύο υποομάδων, RRM1 και RRM2, παράγουν το μέγιστο όφελος για το συνδυασμό docetaxel/gemcitabine, με σημαντικά υψηλότερες απαντήσεις ($p=0.049$), TTP ($p=0.003$) και συνολική επιβίωση ($p=0.031$). Παρά το γεγονός ότι χρειάζεται προσοχή στην ερμηνεία αυτών των αποτελεσμάτων λόγω του μικρού αριθμού ασθενών που εκτιμήθηκαν, τα αποτελέσματά μας προτείνουν ότι το μοριακό προφίλ του πρωτοπαθούς όγκου θα μπορούσε να είναι ένας δείκτης για τη θεραπευτική απάντησης και τη κλινική έκβαση των ασθενών με αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα που θεραπεύτηκαν με docetaxel/gemcitabine. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης είναι παρόμοια με τα αποτελέσματα που έχουν αναφερθεί από άλλες μελέτες που καταδεικνυαν ότι η έκφραση mRNA της RRM1 από τα καρκινικά κύτταρα συσχετιζόταν με τη κλινική απάντηση στο συνδυασμό docetaxel/gemcitabine σε ασθενείς με MMKP σταδίου IV (**Rosell et al., 2003, Rosell et al., 2004; Ceppi et al, 2006**). Επιπρόσθετα, έχει δημοσιευτεί αναστολή της έκφρασης mRNA της RRM2 in vitro με τη χρήση της RNA παρέμβασης για ενισχυμένη χημειοευαισθησία του αδενοκαρκινώματος του παγκρέατος στη gemcitabine (**Duxbury et al., 2003, Duxbury et al., 2004**). Εκτός από το γνωστό ρόλο της RRM2 στη διατήρηση της ακεραιότητας του DNA, μερικές μελέτες έχουν αναφέρει ότι η RRM2 έχει περαιτέρω λειτουργίες που επηρεάζουν τον διηθητικό φαινότυπο. Αυξημένη RRM1 και RRM2 δραστηριότητα έχουν αναγνωριστεί σε ιδιαίτερα μεταστατικά καρκινικά κύτταρα (**Schallreuter et**

al., 1992), ενώ η υπερέκφραση της RRM2 σε κύτταρα από ανθρώπινο στοματικό καρκίνωμα έχει δείξει ότι συσχετίζεται με αυξημένη διηθητική ικανότητα (**Zhou et al., 1998**), πιθανόν μέσω NF-κB και MMP-9 (**Duxbury and Whang., 2007**).

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι η αποτελεσματικότητα του docetaxel/gemcitabine σε ασθενείς με αδenoκαρκίνωμα πνεύμονα συσχετίζεται με την έκφραση mRNA των RRM1 και RRM2, καταδεικνύοντας τη σημασία της εξατομικευμένης θεραπείας. Καθώς αυτή περιέλαβε μόνον ασθενείς με αδenoκαρκίνωμα πνεύμονα, παραμένει ασαφές εάν αυτές οι παρατηρήσεις θα ήταν επίσης ακριβείς για ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα, ενώ το μέγεθος του δείγματος επιβάλλει ιδιαίτερη προσοχή για την άμεση κλινική εφαρμογή των αποτελεσμάτων. Ο ρόλος των RRM1 και RRM2 θα πρέπει να ερευνηθεί περαιτέρω με ένα επαρκές από άποψη στατιστικής δύναμης ανεξάρτητο set δειγμάτων. Παράλληλα, απαιτούνται περαιτέρω προοπτικές μελέτες που χρησιμοποιούν gemcitabine σε συνδυασμό με άλλα φάρμακα προκειμένου να διευκρινιστεί περαιτέρω η σχέση της συν-έκφρασης των γονιδίων RRM1 και RRM2 και της χημειοευαισθησίας του όγκου.

Μελετήθηκε επίσης η συσχέτιση της κλινικής ανταπόκρισης στον συνδυασμό docetaxel/gemcitabine σε ασθενείς με NSCLC-ανεξαρτήτου ιστολογικού τύπου—που εντάχθηκαν στο πλαίσιο ενός συγκεκριμένου

θεραπευτικού πρωτοκόλλου. Η μελέτη διαπίστωσε μια ανάστροφη σχέση ανάμεσα στην έκφραση mRNA της RRM2 και της απάντησης σε gemcitabine και docetaxel σε ασθενείς με προχωρημένο ΜΜΚΠ. Ασθενείς με χαμηλά επίπεδα έκφρασης mRNA RRM2 πετυχαίνουν ένα σημαντικά υψηλότερο ρυθμό απάντησης και TTP από ότι εκείνοι με υψηλή RRM2 έκφραση. Επίσης, η έκφραση mRNA της RRM2 αποκαλύφθηκε ως ένας ανεξάρτητος παράγοντας πρόβλεψης της απάντησης. Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν τα προηγούμενα αποτελέσματα μας σε μια μικρότερη ομάδα ασθενών με αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα που θεραπεύτηκαν με το ίδιο σχήμα (**Souglakos et al., 2008**). Παρόλο που τα διάμεσα επίπεδα RRM2 ήταν διαφορετικά στις 2 μελέτες, πιθανόν λόγω μικρών διαφορών στους πληθυσμούς ασθενών ή σε μερικά βήματα στην εξαγωγή RNA και στην αντίδραση ποσοτικής PCR, η σχέση ανάμεσα στα επίπεδα mRNA και τα κλινικά αποτελέσματα ήταν παρόμοια και στις 2 μελέτες. Είναι ενδιαφέρον ότι διαγονιδιακά ποντίκια ανέπτυξαν αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα αλλά όχι άλλους όγκους στην υπερέκφραση RRM2 (**Xu et al., 2008**). Σε προηγούμενες αναδρομικές μελέτες (**Rosell et al., 2003, Rosell et al., 2004**), διαπιστώθηκε ότι υψηλά επίπεδα RRM1 προβλέπουν μακρύτερη επιβίωση σε ασθενείς με ΜΜΚΠ σταδίου IV που θεραπεύονταν με gemcitabine/cisplatin αλλά όχι σε εκείνους που θεραπεύονταν με σχήματα βασισμένα στη cisplatin αλλά χωρίς gemcitabine.

Η περιορισμένη αποτελεσματικότητα των Χ/Θ συνδυασμών ενσαρκώνεται στο μεταστατικό ΜΜΚΠ, όπου ο χρόνος TTP κυμαίνεται από 5.2 σε 5.5 μήνες, όπως οι συνδυασμοί docetaxel/cisplatin (**Fossella et al., 2003**) ή νέοι παράγοντες όπως remetrexed (αναστολέας των TS και DHFR)/cisplatin (**Scagliotti et al., 2008**).

Έτσι, παρά την αναδρομική φύση της μελέτης αυτής, ένα χρονικό διάστημα TTP διάρκειας 10 μηνών σε 24 απο τους 96 ασθενείς με χαμηλού κινδύνου φαρμακευτικό προφίλ (υψηλά BRCA1 και χαμηλά RRM1 επίπεδα), που θεραπεύτηκαν με docetaxel/gemcitabine, απεικονίζουν ένα υποσχόμενο νέο ορόσημο που αξίζει περαιτέρω εκτίμηση σε προοπτικές μελέτες με εξατομικευμένη Χ/Θ. Αυτά τα ευρήματα είναι παρόμοια με εκείνα που βρέθηκαν σε ασθενείς με ΜΜΚΠ με EGFR μεταλλάξεις που έλαβαν αναστολείς EGFR τυροσινικής κινάσης. Στη μοναδική προοπτική μελέτη που ανέφερε θεραπεία με gefitinib σε 31 ασθενείς με ΜΜΚΠ με EGFR μεταλλάξεις, διαπιστώθηκε ένα TTP διάστημα 9.2 μηνών (**Sequist et al., 2008**). Για αυτή τη μελέτη, δεν μπορούμε να καθορίσουμε εάν η έκφραση mRNA των BRCA1, RRM1 or RRM2 θα μπορούσε να έχει έναν προγνωστικό όπως και προβλεπτικό ρόλο. Σε ένα πρώιμο στάδιο, σε χειρουργημένους ασθενείς με ΜΜΚΠ που δεν έχουν λάβει Χ/Θ, η έκφραση mRNA του BRCA1 ήταν ο μόνος ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας (**Rosell et al., 2007**). Παρομοίως, υψηλή έκφραση mRNA της BRCA1-αλληλοεπιδρώσας πρωτεΐνης BACH1/Brip1 έχει βρεθεί σε επιθετικό καρκίνο του μαστού

(Eelen et al., 2008). Ακόμη, το BRCC36 έχει δείξει να είναι παρόν σε ένα σύμπλοκο BRCA1-RAP80 (Sobhian et al., 2007) και υπερεκφράζεται σε καρκίνο του μαστού όπου αυτό συμβάλλει σε αντίσταση στην ακτινοβολία (Chen et al., 2006). Αυτό τονίζει τη πιθανότητα ότι το BRCA1, μόνο του ή σε συνδυασμό με μερικούς άλλους αλληλοεπιδρώντες παράγοντες, μπορεί να συνδυάζεται με φτωχή πρόγνωση όπως η αντίσταση στη cisplatin ή άλλους βλαπτικούς παράγοντες για το DNA.

Συμπερασματικά, τα ευρήματα μας καταδεικνύουν ότι η αποτελεσματικότητα του συνδυασμού gemcitabine/docetaxel μπορεί να βελτιωθεί όταν εξατομικεύεται ανάλογα με τα επίπεδα έκφρασης mRNA των BRCA1, RRM1 και RRM2. Θα ήταν ενδιαφέρον να μπορούσαμε να θεωρήσουμε ότι το BRCA1 θα μπορούσε να γίνει ένας δείκτης πρόβλεψης για την εξατομίκευση των remetrexed και cisplatin σε ασθενείς με χαμηλά BRCA1 επίπεδα, καθώς το BRCA1 θα μπορούσε να είναι ένας αναπληρωτής των επιπέδων DHFR και TS (Deeb et al., 2007, Bae et al., 2005). Προοπτικές μελέτες εξατομικευμένης Χ/Θ βασισμένες στην έκφραση αυτών των γονιδίων θα πρέπει να πραγματοποιηθούν.

Ο δυνητικά προβλέψιμος ρόλος της έκφρασης mRNA των RRM1 και RRM2 επιβάλλει την εξέταση τους ιδιαίτερα σε κακοήθειες όπου η θεραπεία με gemcitabine χρησιμοποιείται κατά κανόνα, όπως ο παγκρεατικός καρκίνος. Τέλος, προοπτικές μελέτες χρειάζονται για να διευκρινίσουν τη σημασία της έκφρασης του mRNA των RRM1 και RRM2

στην εξατομικευμένη θεραπευτική αντιμετώπιση ασθενών με μεταστατικό ΜΜΚΠ.

V. ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Ολοκληρώνοντας τους ειδικούς σκοπούς που έθεσε, η παρούσα διατριβή κατέληξε στα εξής συμπεράσματα:

1) Κατέδειξε μέσω μιας προοπτικής μελέτης φάσης II ότι ο φαρμακευτικός συνδυασμός docetaxel και gemcitabine ως 1^{ης} γραμμής Χ/Θ συνιστά ένα δραστικό χημειοθεραπευτικό σχήμα στους ηλικιωμένους ασθενείς με προχωρημένο αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα με ένα συνολικό ποσοστό απάντησης 31.2%, ένα ποσοστό αύξησης του όγκου 53.3%, μια διάμεση ΤΤΡ 4.1 μήνες και μια διάμεση ολική επιβίωση 9.4 μήνες. Με βάση τις παρατηρήσεις αυτές, προτείνει ξεκάθαρα ότι ο συνδυασμός docetaxel/gemcitabine μπορεί να είναι μια αξιόλογη θεραπευτική επιλογή για αυτή την ομάδα των ασθενών

2) Κατέδειξε τη θετική συσχέτιση ανάμεσα στην έκφραση mRNA της υποομάδας RRM2 της ριβονουκλεοτιδικής ρεντουκτάσης και της απάντησης στον Χ/Θ συνδυασμό docetaxel/ gemcitabine σε ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα. Χαμηλά επίπεδα έκφρασης mRNA της RRM2

συσχετίστηκαν με σημαντικά υψηλότερο ρυθμό απάντησης σε σύγκριση με ασθενείς με υψηλά επίπεδα έκφρασης mRNA της RRM2.

3) Απέδειξε ξανά την ύπαρξη συσχέτισης (για την ακρίβεια ανάστροφης συσχέτισης) ανάμεσα στην έκφραση mRNA της RRM2 και της απάντησης σε Χ/Θ με docetaxel/gemcitabine και επιβεβαίωσε τα αρχικά αποτελέσματα και σε ασθενείς με προχωρημένο ΜΜΚΠ ανεξάρτητα ιστολογικού τύπου. Ασθενείς με χαμηλά επίπεδα έκφρασης mRNA RRM2 πέτυχαν ένα σημαντικά υψηλότερο ρυθμό απάντησης και TTP από ότι εκείνοι με υψηλή RRM2 έκφραση.

Οι μελέτες που πραγματοποιήθηκαν για την εκπόνηση των στόχων αυτής της διατριβής και οδήγησαν σε αυτά τα συμπεράσματα καταγράφηκαν και δημοσιεύτηκαν στα ακόλουθα διεθνή επιστημονικά περιοδικά ως εξής:

1) Boukovinas I, Souglakos J, Hatzidaki D, Kakolyris S, Ziras N, Vamvakas L, Polyzos A, Geroyianni A, Agelidou A, Agelaki S, Kalbakis K, Kotsakis A, Mavroudis D, Georgoulis V.: Docetaxel plus gemcitabine as front-line chemotherapy in elderly patients with lung adenocarcinomas: a multicenter phase II study. *Lung Cancer*. (2009) ;63(1):77-82.

2) Souglakos J, Boukovinas I, Taron M, Mendez P, Mavroudis D, Tripaki M, Hatzidaki D, Koutsopoulos A, Stathopoulos E, Georgoulis V, Rosell R.: Ribonucleotide reductase subunits M1 and M2 mRNA expression levels and clinical outcome of lung adenocarcinoma patients treated with docetaxel/gemcitabine. *Br J Cancer*. (2008) 20;98(10):1710-5.

3) Boukovinas I, Papadaki C, Mendez P, Taron M, Mavroudis D, Koutsopoulos A, Sanchez-Ronco M, Sanchez JJ, Trypaki M, Staphopoulos E, Georgoulas V, Rosell R, Souglakos J. Tumor BRCA1, RRM1 and RRM2 mRNA expression levels and clinical response to first-line gemcitabine plus docetaxel in non-small-cell lung cancer patients. PLoS One (2008); 3(11): e3695. Epub 2008 Nov 11..

Πέρα από τους περιορισμούς που περιγράφονται διεξοδικά στις επιμέρους συζητήσεις των αποτελεσμάτων κάθε μελέτης, θα πρέπει να τονίσουμε γενικότερα ότι είναι απαραίτητη η σφαιρικότερη προσέγγιση του φαρμακογενωμικού υπόβαθρου του καρκίνου του πνεύμονα. Συγκεκριμένα πέρα από τη καταγραφή της έκφρασης του mRNA διαφόρων πρωτεϊνικών ενδοκυττάρων ενζύμων που θα μπορούσαν να λειτουργήσουν ως δείκτες πρόβλεψης στη χημειοθεραπεία, επιβάλλεται να εντοπιστούν συγκεκριμένοι γενετικοί τόποι στο DNA που επηρεάζουν ρυθμιστικά την έκφραση αυτών και να διευκρινιστεί εάν υπάρχει λειτουργική σύνδεση των επιπέδων mRNA με τη πρωτεϊνική έκφραση. Οι γενετικοί τόποι που εξετάζονται κυρίως ως πιθανοί για τη μετατροπή της mRNA έκφρασης διαφόρων μεσολαβητών στη πρόβλεψη της απάντησης της Χ/Θ είναι κοινοί γενετικοί πολυμορφισμοί που χαρακτηρίζονται από την εναλλαγή μιας βάσης από μια άλλη στην αλληλουχία του DNA (Single Nucleotide Polymorphisms-SNPs). Οι πολυμορφισμοί αυτοί μπορεί να αντιστοιχούν σε περιοχές που κωδικοποιούν κάποια πεπτιδική αλυσίδα ή σε ενδογονιδιακές ή προγονιδιακές περιοχές, ρυθμιστικές για τη

μεταγραφή της γενετικής πληροφορίας που κωδικοποιείται σε αυτό το γονίδιο. Οι SNPs που αντιστοιχούν σε περιοχές που κωδικοποιούν κάποια πεπτιδική αλυσίδα μπορεί να είναι συνώνυμοι-σιωπηλοί που δεν προκαλούν αλλαγή αμινοξέος στη κωδικοποιούμενη πολυπεπτιδική αλυσίδα ή μη-συνώνυμοι που οδηγούν στη δημιουργία διαφορετικής σειράς αμινοξέων στη κωδικοποιούμενη πολυπεπτιδική αλυσίδα. Η ρύθμιση της μεταγραφής και της έκφρασης mRNA επηρεάζεται επίσης από κάποια πρόσφατα χαρακτηρισμένα μόρια RNA που καλούνται microRNA.

Με δεδομένο ότι είναι δύσκολος ο σχεδιασμός μεγάλων προοπτικών γενετικών μελετών για τη πρόβλεψη της χημειοθεραπευτικής αντιμετώπισης του ΚΠ επιβάλλεται η συγκέντρωση και η σύνθεση όλης της διαθέσιμης γενετικής πληροφορίας καθώς επίσης και η γενωμική σύγκριση με των δεδομένων που προέρχονται από μελέτες γενετικής συσχέτισης (genetic association studies-GAS) και μελέτες συσχέτισης ευρέως γονιδιώματος (genome wide association studies-GWAS). Τα δεδομένα των γενετικών μελετών θα πρέπει να παρουσιάζονται με τέτοιο τρόπο ώστε να συμπεριλαμβάνονται σε τεχνικές μετα-ανάλυσης και συγκεντρωτικής μετα-ανάλυσης, συμβάλλοντας στην εξαγωγή πιο έγκυρων αθροιστικών αποτελεσμάτων. Για να έχουμε μια ολοκληρωμένη φαρμακογενωμική προσέγγιση θα πρέπει να μελετηθεί ακόμη πέρα από τη γενετική και mRNA απεικόνιση, η πρωτεϊνική έκφραση των αντίστοιχων μελετούμενων δεικτών για τη πρόγνωση του Κ/Π μετά από

X/Θ. Η πρωτεϊνική έκφραση μπορεί να εντοπιστεί με ανοσοϊστοχημεία η ανοσοφθορισμό και να προσδιοριστεί ποσοτικά με τεχνικές όπως η Western blot ή η ELISA.

Τέλος, η ύπαρξη ενός τόσο πολύπλοκου γενετικού υπόβαθρου, όπως περιγράφηκε παραπάνω, κάθε μεμονωμένου ασθενή και η διαθεσιμότητα διαφόρων αποτελεσματικών θεραπευτικών προσεγγίσεων στο πεδίο της X/Θ του ΚΠ προτείνει μια πιο εξατομικευμένη διαχείριση των ασθενών με ΚΠ και ιδιαίτερα των πιο ηλικιωμένων εξ αυτών. Είναι ουσιαστικό να προσδιοριστούν κατάλληλα προσωπικά και κυτταρικά χαρακτηριστικά για την επιλογή κατάλληλου συνδυασμού X/Θ ή για την αλλαγή σχημάτων σε ασθενείς που η X/Θ δεν είναι αποτελεσματική. Νέες εναλλακτικές στρατηγικές εξατομικευμένες στο γενετικό υπόβαθρο κάθε ασθενούς θα πρέπει να ισορροπούν τα πλεονεκτήματα όπως η παράταση της επιβίωσης και η καλύτερη κλινική πρόγνωση και τα μειονεκτήματα όπως η τοξικότητα και οι παρενέργειες κάθε X/Θ. Παράλληλα, υπάρχει η ανάγκη περισσότερο από ποτέ για γενετικό διαχωρισμό κατάλληλων υποσυνόλων ασθενών που μπορεί να ωφελούνται περισσότερο από μια συγκεκριμένη θεραπεία όπως ο υπο-εξέταση συνδυασμός docetaxel με gemcitabine από άλλα υποσύνολα ασθενών που μπορεί να ωφελούνται από διάφορα άλλα χημειοθεραπευτικά σχήματα, θέτοντας νέους φαρμακογενετικούς κανόνες στην εκλογή της X/Θ στο ΜΜΚΠ.

VI. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ: ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΤΟΥ ΥΠΟΨΗΦΙΟΥ ΔΙΔΑΚΤΟΡΑ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ ΚΑΙ ΣΥΝΑΦΩΝ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΩΝ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΩΝ

1. Armaou S, Konstantopoulou I, Anagnostopoulos T, Razis E, Boukovinas I, Xenidis N, Fountzilias G, Yannoukakos D. Novel genomic rearrangements in the BRCA1 gene detected in Greek breast/ovarian cancer patients. *Eur J Cancer*. 2007 Jan;43(2):443-53. Epub 2006 Dec 14. PubMed PMID: 17174087.
2. Barbetakis N, Asteriou C, Boukovinas I, Tsilikas C. eComment: The role of lymph node dissection in pulmonary resection for metastases from colorectal cancer. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2009 Oct;9(4):644. PubMed PMID: 19773238.
3. Barbetakis N, Samanidis G, Paliouras D, Mavroudi E, Boukovinas I, Tsilikas C. Distant forearm muscle metastasis from squamous cell lung carcinoma. *Tuberk Toraks*. 2008;56(1):109-12. PubMed PMID: 18330765.
4. Barbetakis N, Samanidis G, Paliouras D, Boukovinas I, Kiziridou A, Tsilikas C. A rare cause of mediastinal mass: Primary liposarcoma. *J BUON*. 2008 Jul-Sep;13(3):429-31. PubMed PMID: 18979562.
5. Barbetakis N, Samanidis G, Paliouras D, Boukovinas I, Asteriou C, Stergiou E, Laschos K, Tsilikas C. Paraneoplastic pemphigus regression after thymoma resection. *World J Surg Oncol*. 2008 Aug 12;6:83. PubMed PMID: 18699992; PubMed Central PMCID: PMC2527607.
6. Boukovinas I, Androulakis N, Vamvakas L, Papakotoulas P, Ziras N, Polyzos A, Kalykaki A, Kotsakis A, Xenidis N, Gioulmbasanis I, Mavroudis D, Georgoulis V. Sequential gemcitabine and cisplatin followed by docetaxel as first-line treatment of advanced urothelial carcinoma: a multicenter phase II study of the Hellenic Oncology Research Group. *Ann Oncol*. 2006 Nov;17(11):1687-92. Epub 2006 Sep 12. PubMed PMID: 16968872.
7. Boukovinas I, Papadaki C, Mendez P, Taron M, Mavroudis D, Koutsopoulos A, Sanchez-Ronco M, Sanchez JJ, Trypaki M, Staphopoulos E, Georgoulis V, Rosell R, Souglakos J. Tumor BRCA1, RRM1 and RRM2 mRNA expression levels and clinical response to first-line gemcitabine plus docetaxel in non-small-cell lung cancer patients. *PLoS One* 2008; 3(11): e3695. Epub 2008 Nov 11. PubMed PMID: 19002265; PubMed Central PMCID: PMC2579656.
8. Boukovinas I, Kosmidis P. Treatment of non-small cell lung cancer patients with performance status2 (PS2). *Lung Cancer*. 2009 Jan;63(1):10-5. Epub 2008 Jun 30. Review. PubMed PMID: 18586349.
9. Boukovinas I, Souglakos J, Hatzidaki D, Kakolyris S, Ziras N, Vamvakas L, Polyzos A, Geroyianni A, Agelidou A, Agelaki S, Kalbakis K, Kotsakis A, Mavroudis D, Georgoulis V. Docetaxel plus gemcitabine as front-line

chemotherapy in elderly patients with lung adenocarcinomas: a multicenter phase II study. *Lung Cancer*. 2009 Jan;63(1):77-82. Epub 2008 May 27. PubMed PMID: 18508158.

10. Georgoulas V, Kouroussis C, Agelidou A, Boukovinas I, Palamidis P, Stavrinidis E, Polyzos A, Syrigos K, Veslemes M, Toubis M, Ardavanis A, Tselepatiotis E, Vlachonikolis I; Lung Cancer Committee of the Hellenic Oncology Research Group. Irinotecan plus gemcitabine vs irinotecan for the second-line treatment of patients with advanced non-small-cell lung cancer pretreated with docetaxel and cisplatin: a multicentre, randomised, phase II study. *Br J Cancer*. 2004 Aug 2;91(3):482-8. PubMed PMID: 15238986; PubMed Central PMCID: PMC2409833.

11. Georgoulas V, Androulakis N, Kotsakis A, Hatzidaki D, Syrigos K, Polyzos A, Agelidou A, Varthalitis I, Ziras N, Agelidou M, Chandrinou V, Boukovinas I, Geroyianni A, Vamvakas L, Mavroudis D. Docetaxel versus docetaxel plus gemcitabine as front-line treatment of patients with advanced non-small cell lung cancer: a randomized, multicenter phase III trial. *Lung Cancer*. 2008 Jan;59(1):57-63. Epub 2007 Aug 31. PubMed PMID: 17765354.

12. Kalykaki A, Papakotoulas P, Tsousis S, Boukovinas I, Kalbakis K, Vamvakas L, Kotsakis A, Vardakis N, Papadopoulou P, Georgoulas V, Mavroudis D; Hellenic Oncology Research Group. Gemcitabine plus oxaliplatin (GEMOX) in pretreated patients with advanced ovarian cancer: a multicenter phase II study of the Hellenic Oncology Research Group (HORG). *Anticancer Res*. 2008 Jan-Feb;28(1B):495-500. PubMed PMID: 18383891.

13. Kosmidis PA, Kalofonos HP, Christodoulou C, Syrigos K, Makatsoris T, Skarlos D, Bakogiannis C, Nicolaidis C, Bafaloukos D, Bamias A, Samantas E, Xiros N, Boukovinas I, Fountzilas G, Dimopoulos MA. Paclitaxel and gemcitabine versus carboplatin and gemcitabine in patients with advanced non-small-cell lung cancer. A phase III study of the Hellenic Cooperative Oncology Group. *Ann Oncol*. 2008 Jan;19(1):115-22. Epub 2007 Oct 15. PubMed PMID: 17938425.

14. Kosmidis PA, Dimopoulos MA, Syrigos K, Nicolaidis C, Aravantinos G, Boukovinas I, Pectasides D, Fountzilas G, Bafaloukos D, Bacoyiannis C, Kalofonos HP. Gemcitabine versus gemcitabine-carboplatin for patients with advanced non-small cell lung cancer and a performance status of 2: a prospective randomized phase II study of the Hellenic Cooperative Oncology Group. *J Thorac Oncol*. 2007 Feb;2(2):135-40. PubMed PMID: 17410029.

15. Kyrgidis A, Vahtsevanos K, Koloutsos G, Andreadis C, Boukovinas I, Teleioudis Z, Patrikidou A, Triaridis S. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: a case-control study of risk factors in breast cancer patients. *J Clin Oncol*. 2008 Oct 1;26(28):4634-8. Epub 2008 Jun 23. PubMed PMID: 18574158.

16. Pallis AG, Polyzos A, Boukovinas I, Agelidou A, Lamvakas L, Tsiadaki X, Agelidou M, Pavlakou G, Chandrinou V, Kakolyris S, Christophyllakis C,

Kentepozidis N, Giassas S, Androulakis N, Agelaki S, Georgoulas V. Pooled analysis of elderly patients with non-small cell lung cancer treated with front line docetaxel/gemcitabine regimen: the Hellenic Oncology Research Group experience. *J Thorac Oncol*. 2008 May;3(5):505-10. PubMed PMID: 18449003.

17. Polyzos A, Malamos N, Boukovinas I, Adamou A, Ziras N, Kalbakis K, Kakolyris S, Syrigos K, Papakotoulas P, Kouroussis C, Karvounis N, Vamvakas L, Christophyllakis C, Athanasiadis A, Varthalitis I, Georgoulas V, Mavroudis D. FEC versus sequential docetaxel followed by epirubicin/cyclophosphamide as adjuvant chemotherapy in women with axillary node-positive early breast cancer: a randomized study of the Hellenic Oncology Research Group (HORG). *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Jan;119(1):95-104. Epub 2009 Jul 28. PubMed PMID: 19636702.

18. Ray-Coquard I, Le Cesne A, Michallet V, Boukovinas I, Ranchere D, Thiesse P, Baty V, Blay JY. [Gastro-intestinal stromal tumors: news and comments]. *Bull Cancer*. 2003 Jan;90(1):69-76. Review. French. PubMed PMID: 12609807.

19. Sioutopoulou DO, Kampas LI, Gerasimidou D, Valeri RM, Boukovinas I, Tsavdaridis D, Destouni CT. Diagnosis of metastatic tumors in cerebrospinal fluid samples using thin-layer cytology. *Acta Cytol*. 2008 May-Jun;52(3):304-8. PubMed PMID: 18540294.

20. Souglakos J, Boukovinas I, Taron M, Mendez P, Mavroudis D, Tripaki M, Hatzidaki D, Koutsopoulos A, Stathopoulos E, Georgoulas V, Rosell R. Ribonucleotide reductase subunits M1 and M2 mRNA expression levels and clinical outcome of lung adenocarcinoma patients treated with docetaxel/gemcitabine. *Br J Cancer*. 2008 May 20;98(10):1710-5. Epub 2008 Apr 15. PubMed PMID: 18414411; PubMed Central PMCID: PMC2391126.

21. Souglakos J, Syrigos K, Potamianou A, Polyzos A, Boukovinas I, Androulakis N, Kouroussis Ch, Vardakis N, Christophilakis Ch, Kotsakis A, Georgoulas V. Combination of irinotecan (CPT-11) plus oxaliplatin (L-OHP) as first-line treatment in locally advanced or metastatic gastric cancer: a multicentre phase II trial. *Ann Oncol*. 2004 Aug;15(8):1204-9. PubMed PMID: 15277259.

22. Vahsevanos K, Kyrgidis A, Verrou E, Katodritou E, Triaridis S, Andreadis CG, Boukovinas I, Koloutsos GE, Teleioudis Z, Kitikidou K, Paraskevopoulos P, Zervas K, Antoniadis K. Longitudinal cohort study of risk factors in cancer patients of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *J Clin Oncol*. 2009 Nov 10;27(32):5356-62. Epub 2009 Oct 5. PubMed PMID: 19805682.

23. Ziras N, Potamianou A, Varthalitis I, Syrigos K, Tsousis S, Boukovinas I, Tselepatiotis E, Christofillakis C, Georgoulas V. Multicenter phase II study of gemcitabine and oxaliplatin (GEMOX) as second-line chemotherapy in colorectal cancer patients pretreated with 5-fluorouracil plus irinotecan. *Oncology*. 2006;70(2):106-14. Epub 2006 Apr 25. PubMed PMID: 16645323.

24. Ziotopoulos P, Androulakis N, Mylonaki E, Chandrinos V, Zachariadis E, Boukovinas I, Agelidou A, Kentepozidis N, Ignatiadis M, Vossos A, Georgoulas V; for the Lung Cancer Committee of the Hellenic Oncology Research Group (HORG). Front-line treatment of advanced non-small cell lung cancer with irinotecan and docetaxel: a multicentre phase II study. *Lung Cancer*. 2005 Oct;50(1):115-22. PubMed PMID: 15993981.

VII. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Adjei AA. Clinical studies of pemetrexed and gemcitabine combinations. *Ann Oncol*; 17 (Suppl 5): v29-v32, 2006.

Ahrendt SA, Hu Y, Buta M, et al. p53 mutations and survival in stage I non-small-cell lung cancer: results of a prospective study. *J Natl Cancer Inst*;95:961-70,2003.

Alberg AJ, Brock MV, Samet JM. Epidemiology of lung cancer: looking to the future. *J Clin Oncol* ; 23: 3175-3185,2005.

Alberg AJ, Ford JG, Samet JM. Epidemiology of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* ; 132:29S-55S,2007.

Alberg AJ, Samet JM. Epidemiology of lung cancer. *Chest* ; 123: 21S- 49S, 2003.

Alberola V, Camps C, Provencio M, et al. Cisplatin plus gemcitabine versus a cisplatin-based triplet versus nonplatinum sequential doublets in advanced non-small-cell lung cancer: a Spanish Lung Cancer Group phase III randomized trial. *J Clin Oncol*; 21: 3207-3213,2003

Araya T, Kasahara K, Kimura H, Shibata K, Kita T, Shirasaki H, et al. Biweekly administration of gemcitabine plus vinorelbine in elderly patients with advanced non-small cell lung cancer: multicenter phase II trial. *Lung Cancer*;56:371-376, 2007.

Ardizzoni A, Boni L, Tiseo M, et al. Cisplatin- versus carboplatin-based chemotherapy in first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer: an individual patient data meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* ; 99: 847-857,2007.

Azzoli C, Baker S, Temin S, et al: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update on Chemotherapy for Stage IV Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Clin Oncol* ; 27: 6251-6266,2009.

Bae I, Rih JK, Kim HJ, Kang HJ, Haddad B, et al. BRCA1 regulates gene expression for orderly mitotic progression. *Cell Cycle* 4: 1641-1666, 2005.

Balducci L. Geriatric oncology: challenges for the new century. *Eur J Cancer*;36(14):1741-54, 2000.

Barata F, Parente B, Teixeira E, et al. Optimal duration of chemotherapy in non-small cell lung cancer: multicenter, randomized, prospective clinical trial comparing 4 vs. 6 cycles of carboplatin and gemcitabine. *J Thorac Oncol* ; 2(Suppl 4):S666,2007.

Battafarano RJ, Piccirillo JF, Meyers BF, et al. Impact of comorbidity on survival after surgical resection in patients with stage I non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg*; 123: 280 -287,2002.

Beadsmoore CJ, Screaton NJ. Classification, staging and prognosis of lung cancer. *Eur J Radiol* ; 45: 8 -17,2003.

Belani CP, Brodowicz T, Ciuleanu T, et al: Maintenance pemetrexed (Pem) plus best supportive care (BSC) versus placebo (Plac) plus BSC: A randomized phase III study in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol* 27:18s, 2009 (suppl; abstr CRA8000).

Belani CP, Lee JS, Socinski MA, et al: Randomized phase III trial comparing cisplatin-etoposide to carboplatin-paclitaxel in advanced or metastatic non-small cell lung cancer. *Ann Oncol* 16:1069-1075, 2005.

Billelo KS, Murin S, Matthay RA. Epidemiology, etiology, and prevention of lung cancer. *Clin Chest Med* ; 23:1-25,2002.

Billingham LJ, Cullen MH. The benefits of chemotherapy in patient subgroups with unresectable non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*; 12: 1671-1675,2001.

Blanchon F, Grivaux M, Asselain B, et al. 4-year mortality in patients with non-small cell lung cancer: development and validation of a prognostic index. *Lancet Oncol*; 7: 829 - 836,2006.

Boffetta P. Epidemiology of environmental and occupational cancer. *Oncogene* ; 23: 6392- 6403,2004.

Bosetti C, Levi F, Lucchini F, Negri E, La Vecchia C. Lung cancer mortality in European women: recent trends and perspectives. *Ann Oncol*; 16: 1597-1604,2005.

Boyle P, Dresler C. Preventing the lung cancer epidemic. *Ann Oncol* ;16:1565-1566,2005.

Braga E, Senchenko V, Bazov I, et al. Critical tumor-suppressor gene regions on chromosome 3p in major human epithelial malignancies: allelotyping and quantitative real-time PCR. *Int J Cancer*;100: 534-41,2002.

Bray F, Tyczynski JE, Parkin DM. Going up or coming down? The changing phases of the lung cancer epidemic from 1967 to 1999 in the 15 European Union countries. *Eur J Cancer*; 40: 96 -125,2004.

Bremnes RM, Sundstrom S, Aasebo U, Kaasa S, Hatlevoll R, Aamdal S. The value of prognostic factors in small cell lung cancer: results from a randomised multicenter study with minimum 5 year follow-up. *Lung Cancer*; 39: 303-313,2003.

Brooks DR, Austin JH, Heelan RT, et al. Influence of type of cigarette on peripheral versus central lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 14: 576 -581,2005.

Brooks DR, Klint A, Dickman PW, Stahle E, Lambe M. Temporal trends in non-small cell lung cancer survival in Sweden. *Br J Cancer* ; 96: 519 -522,2007.

Brundage MD, Davies D, Mackillop WJ. Prognostic factors in non- small cell lung cancer: a decade of progress. *Chest*; 122: 1037- 1057,2002.

Cappuzzo F, Coudert B, Wierzbicki R, et al: Efficacy and safety of erlotinib as first-line maintenance in NSCLC following non-progression with chemotherapy: results from the phase III SATURN study. WCLC - 13th World Conference on Lung Cancer, abstr A2.1

Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, et al. Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst*; 97:643-655,2005.

Cappuzzo F, Magrini E, Ceresoli GL, et al. Akt phosphorylation and gefitinib efficacy in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst*; 96:1133-41,2004.

Cellerino R, Tummarello D, Guidi F, et al. A randomized trial of alternating chemotherapy versus best supportive care in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* ; 9: 1453-1461,1991.

Ceppi P, Volante M, Novello S, Rapa I, Danenberg KD, Danenberg PV, Cambieri A, Selvaggi G, Saviozzi S, Calogero R, Papotti M, Scagliotti GV. ERCC1 and RRM1 gene expressions but not EGFR are predictive of shorter survival in advanced non-small-cell lung cancer treated with cisplatin and gemcitabine. *Ann Oncol* 17: 1818-1825, 2006.

Ceppi P, Volante M, Saviozzi S, et al: Squamous cell carcinoma of the lung compared with other histotypes shows higher messenger RNA and protein levels for thymidylate synthase. *Cancer*; 107:1589-1596, 2006.

Ceresoli GL, Gregorc V, Cordio S, et al. Phase II study of weekly paclitaxel as second-line therapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*: 44: 231-239,2004.

Cerfolio RJ, Bryant AS, Scott E, et al. Women with pathological stage I, II and III non-small cell lung cancer have better survival than men. *Chest*; 130: 1796 - 1802,2006.

Chabaliere C, Lamare C, Racca C, Privat M, Valette A, et al. BRCA1 downregulation leads to premature inactivation of spindle checkpoint and confers paclitaxel resistance. *Cell Cycle* 5: 1001-1007, 2006.

Chang GC, Tsai CM, Chen KC, et al. Predictive factors of gefitinib antitumor activity in East Asian advanced non-small cell lung cancer patients. *J Thorac Oncol*; 1: 520-525,2006.

- Chang TC, Yu D, Lee YS, et al. Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat Genet*; 40:43-50,2008
- Charloux A, Hedelin G, Dietemann A, et al. Prognostic value of histology in patients with non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*: 17: 123-134,1997.
- Charlson M, Szatrowski TP, Peterson J, Gold J. Validation of a combined comorbidity index. *J Clin Epidemiol*;47:1245-51, 1994.
- Chen X, Arciero CA, Wang C, Broccoli D, Godwin AK. BRCC36 is essential for ionizing radiation-induced BRCA1 phosphorylation and nuclear foci formation. *Cancer Res* 66: 5039-5046, 2006.
- Ciuleanu TE, Brodowicz T, Belani CP, et al. Maintenance pemetrexed plus best supportive care (BSC) versus placebo plus BSC: a phase III study. *J Clin Oncol* ; 26 (20 suppl):8011,2008.
- Civenni G, Holbro T, Hynes NE. Wnt1 and Wnt5a induce cyclin D1 expression through ErbB1 transactivation in HC11 mammary epithelial cells. *EMBO Rep*; 4: 166-171,2003
- Clinical practice guidelines for the treatment of unresectable non-small-cell lung cancer. Adopted on May 16, 1997 by the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol* ; 15: 2996-3018,1997.
- Cobo M, Isla D, Massuti B, et al. Customizing cisplatin based on quantitative excision repair cross-complementing 1 mRNA expression: a phase III trial in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*; 25: 2747-2754,2007
- Comella P, Filippelli G, De Cataldis G, et al. Efficacy of the combination of cisplatin with either gemcitabine and vinorelbine or gemcitabine and paclitaxel in the treatment of locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer: a phase III randomised trial of the Southern Italy Cooperative Oncology Group SICOG 0101). *Ann Oncol*;18:324-330,2007.
- Costa DB, Kobayashi S, Tenen DG, et al. Pooled analysis of the prospective trials of gefitinib monotherapy for EGFR-mutant non-small-cell lung cancers. *Lung Cancer*; 58:95-103,2007
- Cox DR. Regression models and life tables. *J R Stat Soc B*;34:187-220, 1972.
- Dabholkar M, Vionnet J, Bostick-Bruton F, et al. Messenger RNA levels of XPAC and ERCC1 in ovarian cancer tissue correlate with response to platinum-based chemotherapy. *J Clin Invest*; 94:703-708,1998
- Darby S, Hill D, Auvinen A, et al. Radon in homes and risk of lung cancer: collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies. *BMJ* ; 330: 223-226,2005.

Deeb KK, Michalowska AM, Yoon CY, Krummey SM, Hoenerhoff MJ, et al. Identification of an integrated SV40 T/t-antigen cancer signature in aggressive human breast, prostate, and lung carcinomas with poor prognosis. *Cancer Res* 67: 8065-8080, 2007.

Delbado C, Michielis S, Syz N, et al: Benefits of adding a drug to a single agent or a 2-agent chemotherapy regimen in advanced non-small cell lung cancer. *JAMA*; 292:470-484,2004

Duxbury MS, Ito H, Benoit E, Zinner MJ, Ashley SW, Whang EE. Retrovirally mediated RNA interference targeting the M2 subunit of ribonucleotide reductase: A novel therapeutic strategy in pancreatic cancer. *Surgery* 136: 261-269, 2004.

Duxbury MS, Ito H, Benoit E, Zinner MJ, Ashley SW, Whang EE. RNA interference targeting focal adhesion kinase enhances pancreatic adenocarcinoma gemcitabine chemosensitivity. *Biochem Biophys Res Commun* 311: 786-792, 2003

Duxbury MS, Whang EE. RRM2 induces NF-kappaB-dependent MMP-9 activation and enhances cellular invasiveness. *Biochem Biophys Res Commun* 354: 190 -196, 2007.

Eelen G, Vanden Bempt I, Verlinden L, Drijkoningen M, Smeets A, et al. Expression of the BRCA1-interacting protein Brip1/BACH1/FANCI is driven by E2F and correlates with human breast cancer malignancy. *Oncogene* 27: 4233-4241, 2008.

El Maalouf G, Rodier JM, Faivre S, Raymond E. Could we expect to improve survival in small cell lung cancer? *Lung Cancer*; 57: S30 -S34,2007.

Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs-microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*; 6:259-69,2006

Extermann M, Aapro MS, Bernabei R, Cohen HJ, Droz JP, Lichtman S, et al. Use of comprehensive assessment in older cancer patients: recommendations from the task force on GCA of the International Society of Geriatric Oncology (SIOG). *Crit Rev Oncol Hematol*;55:241-52, 2005.

Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol*; 18: 581-592,2007.

Fidias P, Dakhil S, Lyss.A, et al: Phase III Study of Immediate Compared With Delayed Docetaxel After Front-Line Therapy With Gemcitabine Plus Carboplatin in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: *J Clin Oncol* ; 27: 591-598,2009

Finkelstein DM, Ettinger DS, Ruckdeschel JC. Long-term survivors in metastatic non-small-cell lung cancer: an Eastern Cooperative Oncology Group Study. *J Clin Oncol*; 4: 702-709,1986.

Fossella F, Pereira JR, von Pawel J, et al: Randomized, multinational phase III study of docetaxel plus platinum combinations versus vinorelbine plus cisplatin for advanced non-small cell lung cancer: The TAX 326 study group. *J Clin Oncol*; 21:3016-3024, 2003

Fossella F, Pereira JR, von Pawel J, et al: Randomized, multinational, phase III study of docetaxel plus platinum combinations versus vinorelbine plus cisplatin for advanced non-small-cell lung cancer: The TAX 326 study group. *J Clin Oncol*; 21: 3016-3024, 2003

Fossella F, Pereira JR, von Pawel J, Pluzanska A, Gorbounova V, et al. Randomized, multinational, phase III study of docetaxel plus platinum combinations versus vinorelbine plus cisplatin for advanced non-small-cell lung cancer: the TAX 326 study group. *J Clin Oncol* 21: 3016-3024, 2003.

Frasci G, Lorusso V, Panzza N, Comella P, Nicollela G, Bianco A, et al. gemcitabine plus vinorelbine yield better survival outcome than vinorelbine alone in elderly patients with advanced non-small cell lung cancer. A Southern Italy Cooperative Oncology Group (SICOG) phase III trial. *Lung Cancer*;34:65069, 2001.

Freidlin B, Breathnach OS, Johnson BE. A model to select regimens for phase III trials for patients with advanced-stage non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*;9:917-923, 2003.

Fukuoka M, Masuda N, Furuse K, et al. A randomized trial in inoperable non-small-cell lung cancer: vindesine and cisplatin versus mitomycin, vindesine, and cisplatin versus etoposide and cisplatin alternating with vindesine and mitomycin. *J Clin Oncol*; 9: 606-613,1991.

Fukuoka M, Yano S, Giaccone G, et al. Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial) [corrected]. *J Clin Oncol*; 21: 2237-2246,2003.

Furuta T, Ueda T, Aune G, et al. Transcription-coupled nucleotide excision repair as a determinant of cisplatin sensitivity of human cells. *Cancer Res*; 62:4899-4902,2002

Gabrielson E. Worldwide trends in lung cancer pathology. *Respirology* ; 11: 533-538,2006.

Gallardo E, Navarro A, Vinolaw N, et al. MiR-34a as a prognostic marker of relapse in surgically resected non-small-cell lung cancer. *Carcinogenesis*;30: 1903-9,2009

Gatzemeier U, Pluzanska A, Szczesna A, et al. Phase III study of erlotinib in combination with cisplatin and gemcitabine in advanced non-small-cell lung cancer: The Tareceva Lung Cancer Investigation Trial. *J Clin Oncol* ;25:1545-1552,2007.

Georgoulas V, Ardavanis A, Tsiafaki X, Agelidou A, Mixalopoulou P, et al. Vinorelbine plus cisplatin versus docetaxel plus gemcitabine in advanced nonsmall-cell lung cancer: a phase III randomized trial. *J Clin Oncol* 23: 2937-2945, 2005.

Georgoulas V, Papadakis E, Alexopoulos A, et al: Platinum-based and non-platinum-based chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: A randomised multicentre trial. *Lancet*; 357: 1478-1484, 2001

Ghaffar H, Sahin F, Sanchez-Cepedes M, et al. LKB1 protein expression in the evolution of glandular neoplasia of the lung. *Clin Cancer Res*;9:2998-3003,2003.

Giaccone G, Gallegos Ruiz M, Le Chevalier T, et al. Erlotinib for frontline treatment of advanced non-small-cell lung cancer: a phase II study. *Clin Cancer Res*; 12: 6049-55,2006

Giaccone G, Herbst RS, Manegold C, et al. Gefitinib combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial-INTACT 1. *J Clin Oncol* ; 22:7 77-784,2004.

Giovannetti E, Mey V, Nannizzi S, et al. Cellular and pharmacogenetics foundation of synergistic interaction of pemetrexed and gemcitabine in human non-small-cell lung cancer cells. *Mol Pharmacol*; 68:110-118,2005

Giovannetti E, Mey V, Nannizzi S, et al: Cellular and pharmacogenetics foundation of synergistic interaction of pemetrexed and gemcitabine in human non-small-cell lung cancer cells. *Mol Pharmacol*; 68:110-118, 2005

GLOBOCAN 2002: Cancer incidence, mortality and prevalence world- wide [database online]. IARC CancerBase No. 5. Version 2. 0. IARC Press; 2004. Available at <http://www-dep.iarc.fr/>.

Govindan R, Page N, Morgensztern D, et al. Changing epidemiology of small-cell lung cancer in the United States over the last 30 years: analysis of the surveillance, epidemiologic, and end results database. *J Clin Oncol*; 24: 4539 - 4544,2006.

Gray N. The consequences of the unregulated cigarette. *Tob Control* ;15: 405-408,2006.

Gridelli C, Gallo C, Shepherd FA, Illiano A, Piantedosi F, Robbiati SF, et al. Gemcitabine plus vinorelbine compared with cisplatin plus vinorelbine or cisplatin plus gemcitabine for advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial of the Italian GEMVIN Investigators and the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol*;21:3025-34, 2003.

Gridelli C, Langer C, Maione P, Rossi A, Schild SE. Lung cancer in the elderly. *J Clin Oncol*;25:1898-907, 2007.

Gridelli C, Maione P, Illiano A, Piantedosi FV, Favaretto A, Bearz A, et al. Cisplatin plus gemcitabine or vinorelbine for elderly patients with advanced non-small lung cancer: the MILES-2P studies. *J Clin Oncol*;25:4663-9, 2007.

Gridelli C, Perrone F, Gallo C, Cigolari S, Rossi A, Piantedosi F, et al. Chemotherapy for elderly patients with advanced non-small cell lung cancer: the Multicenter Italian Lung Cancer in the Elderly study (MILES) phase III randomized trial. *J Natl Cancer Inst*;95:362-72, 2003.

Gridelli C. Elderly lung cancer patients: what treatment strategies? *Expert Rev Anticancer Ther*;7(10):1331-4, 2007.

Gungor N, Godschalk RW, Pachen DM, et al. Activated neutrophils inhibit nucleotide excision repair in human pulmonary epithelial cells: role of myeloperoxidase. *FASEB J* ; 21: 2359-2367, 2007

Hainsworth J, Spigel D, Farley C, Shipley DL, Bearden JD, Gandhi J, et al. Weekly docetaxel versus docetaxel/gemcitabine in the treatment of elderly or poor performance status patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer*;110(9):2027-34, 2007

Han SW, Kim TY, Hwang PG, et al. Predictive and prognostic impact of epidermal growth factor receptor mutation in non-small-cell lung cancer patients treating with gefitinib. *J Clin Oncol*; 23:2493-501, 2005

Hanna N, Lilenbaum R, Ansari R, et al: Phase II trial of cetuximab to patients with previously treated non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*; 24: 5253-5258, 2006

Hanna N, Shepherd FA, Fossella FV, et al. Randomized phase III trial of pemetrexed versus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer previously treated with chemotherapy. *J Clin Oncol* ; 22: 1589-1597, 2004.

Hanna N, Shepherd FA, Fossella FV, et al: Randomized phase III trial of pemetrexed versus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer previously treated with chemotherapy. *J Clin Oncol*; 22: 1589-1597, 2004

Hausmann HJ. Smoking and lung cancer: future research directions. *Int J Toxicol* ; 26: 353-364, 2007.

He B, Reguart N, You L, et al. Blockade of Wnt-1 signaling induces apoptosis in human colorectal cancer cells containing downstream mutations. *Oncogene* ; 24:3054-8, 2005.

Herbst RS, Giaccone G, Schiller JH, et al. Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial-INTACT 2. *J Clin Oncol*; 22: 785-79, 2004.

Hirsch FR, Scagliotti GV, Langer CJ, et al. Epidermal growth factor family of receptors in preneoplasia and lung cancer: perspectives for targeted therapies. *Lung Cancer*;41(suppl 1):S29-S42,2003.

Hoang T, Xu R, Schiller JH, et al. Clinical model to predict survival in chemo-naïve patients with advanced non-small-cell lung cancer treated with third-generation chemotherapy regimens based on Eastern Cooperative Oncology Group data. *J Clin Oncol*; 23: 175-183,2005.

Hotta K, Matsuo K, Ueoka H, et al: Addition of platinum compounds to a new agent in patients with advanced non-small cell lung cancer: A literature-based meta-analysis of randomized trials. *Ann Oncol*; 15:1782-1789,2004

Huang C, Liu D, Nakano J, et al: E2F-1 overexpression associated with TS and surviving gene expressions in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*; 25: 426s, 2007 (suppl, abstr 7669)

Huang EH, Liao Z, Cox JD, et al. Comparison of outcomes for patients with unresectable, locally advanced non-small-cell lung cancer treated with induction chemotherapy followed by concurrent chemoradiation vs. concurrent chemoradiation alone. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*; 68: 779-785,2007.

Husain A, He G, Venkatraman ES, et al. BRCA1 up-regulation is associated with repair-mediated resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II). *Cancer Res*; 58:1120-1123,1998

Husain A, He G, Venkatraman ES, Spriggs DR (1998) BRCA1 up-regulation is associated with repair-mediated resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II). *Cancer Res* 58: 1120-1123.

Hutchins LF, Unger JM, Crowley J, Coltman Jr CA, Albain KS. Underrepresentation of patients 65 years of age or older in cancer treatment trials. *N Engl J Med*;341:20611-7, 1999.

International Agency for Research on Cancer. Tobacco Smoke and Involuntary Smoking, Vol 83. Lyon, France: IARC; 200229.

Itaya T, Yamaoto N, Ando M, et al. Influence of histological type, smoking history and chemotherapy on survival after first-line therapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Sci*; 98: 226-230,2007.

Ito S, Kuraoka I, Chymkowitz P, et al. XPG stabilizes TFIIH, allowing transactivation of nuclear receptors: implications for Cockayne syndrome in XP-G/CS patients. *Mol Cell*; 26:231-243,2007

Jackman DM, Johnson BE. Small-cell lung cancer. *Lancet* ; 366: 1385-1396,2005.

Jackman DM, Yeap BY, Lindeman NI, Fidias P, Rabin MS, Temel J, et al. Phase II clinical trial of chemotherapy-naïve patients > or =70 years of age

treated with erlotinib for advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*;25: 760-6, 2007.

Janne PA, Gurubhagavatula S, Yeap BY, et al. Outcomes of patients with advanced non-small cell lung cancer treated with gefitinib (ZD1839, Iressa) on an expanded access study. *Lung Cancer*; 44: 221-230,2004.

Jemal A, Clegg LX, Ward E, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2001, with a special feature regarding survival. *Cancer*; 101: 3-27,2004.

Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer Statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* ; 57: 43- 66,2007.

Johnson DH, Fehrenbacher L, Novotny WF, et al: Randomized phase II trial comparing bevacizumab plus carboplatin and paclitaxel with carboplatin and paclitaxel alone in previously untreated locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*; 22; 2184-2191,2004

Johnson JR, Cohen M, Sridhara R, et al. Approval summary for erlotinib for treatment of patients with locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer after failure of at least one prior chemotherapy regimen. *Clin Cancer Res*; 11: 6414-6421,2005.

Kaneda H, Tamura K, Kurata T, et al. Retrospective analysis of the predictive factors associated with the response and survival benefit of gefitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*: 46: 247-254,2004.

Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc*;53:457-481, 1958.

Kelly K, Crowley J, Bunn PA Jr, et al: Randomized phase III trial of paclitaxel plus carboplatin versus vinorelbine plus cisplatin in the treatment of patients with advanced non-small-cell lung cancer: A Southwest Oncology Group trial. *J Clin Oncol*; 19: 3210-3218, 2001

Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, et al. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell*; 121:823-35,2005.

Kim KS, Jeong JY, Kim YC, et al. Predictors of the response to gefitinib in refractory non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*; 11: 2244-2251,2005.

Kim TY, Yang SH, Lee SH, et al. A phase III randomized trial of combined chemoradiotherapy versus radiotherapy alone in locally advanced non-small-cell lung cancer. *Am J Clin Oncol* ; 25: 238-243,2002.

Kitaguchi S, Takeshima Y, Nishisaka T, et al. Proliferative activity, p53 expression and loss of heterozygosity on 3p, 9p and 17p in atypical adenomatous hyperplasia of the lung. *Hiroshima J Med Sci*;47:17-25,1998.

Kitamura H, Kameda Y, Nakamura N, et al. Atypical adenomatous hyperplasia and bronchoalveolar lung carcinoma. Analysis by morphometry and the expressions of p53 and carcinoembryonic antigen. *Am J Surg Pathol*;20:553-62,1996

Kodama K, Higashiyama M, Yokouchi H, et al. Prognostic value of ground-glass opacity found in small lung adenocarcinoma on high-resolution CT scanning. *Lung cancer*; 33:17-25,2001

Koo LC, Ho JH-C. Worldwide epidemiological patterns of lung cancer in not smokers. *Int J Epidemiol*;19(Suppl. 1):s14-23, 1990.

Kosmidis P, Mylonakis N, Fountzilias G, et al. A prospective randomized phase III study in non-small-cell lung cancer comparing cisplatin, ifosfamide, vinblastine (VIP) versus cisplatin, ifosfamide and etoposide (VIP-16). *Ann Oncol*; 7: 517-520,1996.

Kosmidis P, Mylonakis N, Nicolaidis C, et al: Paclitaxel plus carboplatin versus gemcitabine plus paclitaxel in advanced non-small-cell lung cancer: A phase III randomized trial. *J Clin Oncol*; 20: 3578-3585, 2002

Koyi H, Hillerdal G, Branden E. Patient's and doctors' delays in the diagnosis of chest tumours. *Lung Cancer*; 35: 53-57,2002.

Krause DS, Van Etten RA. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N Engl J Med*;353:172-87,2005.

Kris MG, Natale RB, Herbst RS, et al. Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: A randomized trial. *JAMA*; 290: 2149-2158,2003.

Kroep JR, Loves WJ, van der Wilt CL, et al. Pretreatment deoxycytidine kinase levels predict in vivo gemcitabine sensitivity. *Mol Cancer Ther* 1:371-376, 2002

Kudoh S, Takeda K, Nakagawa K, Takada M, Katakami N, Matsui K, et al. Phase III study of docetaxel compared with vinorelbine in elderly patients with advanced non-small-lung cancer: results of the West Japan Thoracic Oncology Group Trial (WJTOG 9904). *J Clin Oncol*;24:3657-3663, 2006.

Kumar MS, Erkeland SJ, Pester RE, et al. Suppression of non-small cell lung tumor development by the let-7 microRNA family. *Proc Natl Acad Sci USA*;105: 3903-8,2008

Lafarge S, Sylvain V, Ferrara M, Bignon YJ (2001) Inhibition of BRCA1 leads to increased chemoresistance to microtubule-interfering agents, an effect that involves the JNK pathway. *Oncogene* 20: 6597-6606.

Laine JP, Egly JM. Initiation of DNA repair mediated by a stalled RNA polymerase II. *EMBO J*; 25: 387-397,2006

- Lam WK, White NW, Chan-Yeung MM. Lung cancer epidemiology and risk factors in Asia and Africa. *Int J Tuberc Lung Dis* ; 8: 1045-1057,2004.
- Lam WK. Lung cancer in Asian women-the environment and genes. *Respirology* ; 10: 408 - 417,2005.
- Landi MT,Zhao Y,Rotunno M, et al. MicroRNA expression differentiates histology and predicts survival of lung cancer. *Clin Cancer Res* ;16: 430-41,2010
- LeCaer H, Barlesi F, Robinet G, et al. An open multicenter phase II trial of weekly docetaxel for advanced-stage non-small-cell lung cancer in elderly patients with significant comorbidity and/or poor performance status: The GFPC 02-02b study. *Lung Cancer*: 57: 72-78,2007.
- LeCaer H, Fournel P, Jullian H, Chouaid C, Letreut J, Thomas P, et al. An open multicenter phase II trial of docetaxel-gemcitabine in Charlson score and performance status selected elderly patients with stage IIIB-IV non-small-cell lung cancer: the GFRC 02-02a study. *Crit Rev Oncol Hematol*;64(1):73-81, 2007.
- Lerman MI,Minna JD. The 630-kb lung cancer homozygous deletion region on human chromosome 2p21.3: identification and evaluation of the resident candidate tumor suppressor genes.The International Lung Cancer Chromosome 3p21.3 Tumor Suppressor Gene Consortium. *Cancer Res* ; 60:6116-33,2000
- Lilenbaum RC, Langenberg P, Dickersin K: Single agent versus combination chemotherapy in patients with advanced non-small cell lung carcinoma. *Cancer*; 82:116-126,2004
- Lin WC, Chiu CH, Liou JL, et al. Gefitinib as front-line treatment in Chinese patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*;; 54: 193-199,2006.
- Lord RV, Brabender J, Gandara D, et al. Low ERCC1 expression correlates with prolonged survival after cisplatin plus gemcitabine chemotherapy in non-small cell lung cancer.*Clin Cancer Res*; 8: 2286-2291,2002
- Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*;350:2129-2139,2004.
- Lynch TJ, Patel T, Dreisbach L, et al. A randomized multicenter phase III study of cetuximab in combination with Taxane/Carboplatin versus Taxane/ Carboplatin alone as first-line treatment for patients with advanced/metastatic Non-small cell lung cancer (NSCLC): B3-03. *J Thorac Oncol*; 2:S340-1,2007.
- Mackay J, Eriksen M, Shafey O. The tobacco atlas. 2nd ed. Atlanta, GA: American Cancer Society; 2006.

Manegold C, Thatcher N. Survival improvement in thoracic cancer: Progress from the last decade and beyond. *Lung Cancer*; 57: S3-S5,2007.

Marchetti A, Martella C, Felicioni L, et al. EGFR mutations in non-small-cell lung cancer: analysis of a large series of cases and development of a rapid and sensitive method for diagnostic screening with potential implications on pharmacologic treatment. *J Clin Oncol* ;23:857- 65,2005.

Markou A, Tsaroucha EG, Kaklamanis L, et al. Prognostic value of mature microRNA-21 and microRNA-205 overexpression in non-small-cell lung cancer by quantitative real-time PCR. *Clin Chem*; 54: 1696-704,2008

Martins SJ, Pereira JR. Clinical factors and prognosis in non-small cell lung cancer. *Am J Clin Oncol* ; 22: 453-457,1999.

Martoni A, Marino A, Sperandi F, et al. Multicentre randomised phase III study comparing the same dose and schedule of cisplatin plus the same schedule of vinorelbine or gemcitabine in advanced non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer*; 41: 81-92,2005.

Martoni A, Marino A, Sperandi F, et al: Multicentre randomized phase III study comparing the same dose and schedule of cisplatin plus the same schedule of vinorelbine or gemcitabine in advanced non small cell lung cancer. *Eur J Cancer*; 41: 81-92,2005.

Matakidou A, Eisen T, Houlston RS. Systematic review of the relationship between family history and lung cancer risk. *Br J Cancer* ; 93:825- 833,2005.

Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med*; 3: e442,2006.

Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, McDonald ER 3rd, Hurov KE, et al. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* 316: 1160-1166, 2007.

Metzger R, Leichman CG, Danenberg KD, et al. ERCC1 mRNA levels complement thymidylate synthase mRNA levels in predicting response and survival for gastric cancer patients receiving combination cisplatin and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol*;16: 309-316,1998

Miller AB, Hoogstraten B, Staquet M, Winkler A. Reporting results of cancer treatment. *Cancer*;47:207-214, 1981.

Miller V, O'Connor P, Soh C, et al: A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase IIIb trial (ATLAS) comparing bevacizumab (B) therapy with or without erlotinib (E) after completion of chemotherapy with B for first-line treatment of locally advanced, recurrent, or metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Clin Oncol* 27:18s, 2009 (suppl; abstr LBA8002)

Miller VA, Kris MG, Shah N, et al. Bronchioalveolar pathologic subtype and smoking history predict sensitivity to gefitinib in advanced non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol*; 22: 1103-1109,2004.

Nakanishi K, Kawai T, Kumaki F, et al. Survivin expression in atypical adenomatous hyperplasia of the lung. *Am J Clin Pathol*;120:712-719,2003

National Cancer Institute: Common Toxicity Criteria (CTC) v2.0.
<http://ctep.cancer.gov/reporting/ctc.html>.

National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Non-Small Cell Lung Cancer. 2009,Version 2.

Neugut AI, Jacobson JS. Women and lung cancer: gender equality at a crossroad?. *JAMA*; 296: 218 -219,2006.

Nitadori J, Inoue M, Iwasaki M, et al. Association between lung cancer Incidence and family history of lung cancer: data from a large-scale Population-based cohort study, the JPHC Study. *Chest* ; 130: 968 - 975,2006.

Nogushi M, Morikawa A, Kawasaki M, et al. Small adenocarcinoma of the lung. Histologic characteristics and prognosis. *Cancer*; 75: 2844-2852,1995

Nomura M, Shigematsu H, Li L, et al. Polymorphisms, mutations, and amplifications of the EGFR in non-small-cell lung cancers, *PLoS Med*; 4: e125, 2007

Non-Small Cell Lung Cancer Collaborative Group. Chemotherapy in non-small cell lung cancer: A meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomized clinical trials. *BMJ*; 311:899-909, 1995

Nordquist LT, Simon GR, Cantor A, Alberts WM, Bepler G. Improved survival in never-smokers vs current smokers with primary adenocarcinoma of the lung. *Chest*; 126: 347-351,2004

NSCLC Meta-Analyses Collaborative Group: Chemotherapy in addition to supportive care improves survival in advanced Non-small-Cell Lung cancer: A systematic review and meta-analysis of individual patient data from 16 randomized controlled trials. *J Clin Oncol*; 26:4617-4625, 2008

Okabe T, Kubota K, Tamura T, et al. Prognostic factors affecting survival on pretreated patients with locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC)-Subgroup analysis in a randomized Ph II study of pemetrexed 500 mg/m² and 1000 mg/m² [abstract]. *Eur J Cancer Suppl* ; 5: 376,2007.

Paesmans M, Sculier JP, Lecomte J, et al. Prognostic factors for patients with small cell lung carcinoma: analysis of a series of 763 patients included in 4 consecutive prospective trials with a minimum follow-up of 5 years. *Cancer*; 89: 523-533,2000.

Paez JG, Janne PA, Lee JC, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*; 304:1497-1500,2004.

Pao W, Miller V, Zakowski M, et al. EFG receptor gene mutations are common in lung cancers from never smokers and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib nad erlotinib. *Proc Natl Acad Sci USA*; 101: 13306-11,2004

Pao W, Wang TY, Riely GJ, et al. KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS Med*;2:e17,2005.

Park J, Park BB, Kim JY, et al. Gefitinib (ZD1839) monotherapy as a salvage regimen for previously treated advanced non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*; 10: 4383-4388,2004.

Park JO, Kim SW, Ahn JS, et al. Phase III trial of two versus four additional cycles in patients who are nonprogressive after two cycles of platinum-based chemotherapy in non small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*; 25: 5233-5239,2007.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* ; 55: 74 -108,2005.

Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol*; 2: 533-543,2001.

Peace LR. A time correlation between cigarette smoking and lung cancer. *Statistician* ; 34: 371-381,1985.

Pirker R, Pereira JR, Szczesna A, et al: Cetuximab plus chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer (FLEX): an open-label randomized phase III trial. *Lancet*;373 (9674): 1525-31, 2009 .

Pujol J-L, Breton J-L, Gervais R, et al. Gemcitabine-docetaxel versus cisplatin-vinorelbine in advanced or meastatic non-small-cell lung cancer: a phase III study addressing the case for cisplatin. *Ann Oncol*;16:602-610,2005.

Quinn JE, James CR, Stewart GE, Mulligan JM, White P, et al. BRCA1 mRNA Expression Levels Predict for Overall Survival in Ovarian Cancer after Chemotherapy. *Clin Cancer Res* 13: 7413-7420, 2007.

Quinn JE, Kennedy RD, Mullan PB, et al. BRCA1 functions as a differential modulator of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res*; 63:6221-6228, 2003

Quinn JE, Kennedy RD, Mullan PB, Gilmore PM, Carty M, et al. BRCA1 functions as a differential modulator of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 63: 6221-6228, 2003.

Ramalingam S, Pawlish K, Gadgeel S, Demers R, Kalemkerian GP. Lung cancer in young patients: analysis of a Surveillance, Epidemiol- ogy and End Results database. *J Clin Oncol*; 16: 651- 657,1998.

Raponi M, Dossey L, Jatkoa T, et al. MicroRNA classifiers for predicting prognosis of squamous cell lung cancer. *Cancer Res*;69: 5776-83,2009

Rapp E, Pater JL, Willan A, et al. Chemotherapy can prolong survival in patients with advanced non-small-cell lung cancer-report of a Canadian multicenter randomized trial. *J Clin Oncol*; 6: 633-641,1988.

Raz DJ, He B, Rosell R, Jablons DM. Current concepts in bronchioloalveolar carcinoma biology. *Clin Cancer Res*;12:3698-3704, 2006.

Reck M, von Pawel J, Zatloukal P, et al: Phase III trial of cisplatin plus gemcitabine with either placebo or bevacizumab as first-line therapy for nonsquamous non-small cell lung cancer: AVAIL. *J Clin Oncol* ; 27:1227-1234,2009

Riely GJ, Marks J, Pao W, et al. KRAS mutations in non-small-cell lung cancer. *Proc Am Thoracic Soc*; 201-5,2009

Riely GJ, Politi KA, Miller VA, et al. Update on epidermal growth factor receptor mutations in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*;12:7232-7241,2006.

Ries LAG, Melbert D, Krapcho M, et al., eds. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2004. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2007. Available at: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2004/.

Rosell R, Danenberg KD, Alberola V, Bepler G, Sanchez JJ, Camps C, Provencio M, Isla D, Taron M, Diz P, Artal A. Ribonucleotide reductase messenger RNA expression and survival in gemcitabine/cisplatin-treated advanced non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res* 10: 1318-1325, 2004.

Rosell R, Danenberg KD, Alberola V, et al. Ribonucleotide reductase messenger RNA expression and survival in gemcitabine/cisplatin-treated advanced non-small cell lung cancer patients. *Clin Cancer Res*;10:1318-1325,2004

Rosell R, Scagliotti G, Danenberg KD, et al. Transcripts in pretreatment biopsies from a three-arm randomized trial in metastatic non-small-cell lung cancer. *Oncogene*; 22: 3548-3553,2003.

Rosell R, Scagliotti G, Danenberg KD, Lord RV, Bepler G, Novello S, Cooc J, Crino L, Sanchez JJ, Taron M, Boni C, De Marinis F, Tonato M, Marangolo M, Gozzelino F, Di Costanzo F, Rinaldi M, Salonga D, Stephens C. Transcripts in pretreatment biopsies from a three-arm randomized trial in metastatic non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 22:3548- 3553, 2003.

Rosell R, Skrzypski M, Jassem E, Taron M, Bartolucci R, et al. BRCA1: A Novel Prognostic Factor in Resected Non-Small-Cell Lung Cancer. *PLoS ONE* 2: e1129, 2007.

Rosell R, Felip E, Taron M, et al. Gene expression as a predictive marker of outcome in stage IIB-IIIA-IIIB non-small cell lung cancer after induction gemcitabine-based chemotherapy followed by resectional surgery. *Clin Cancer Res*; 10: 4215s-4219s, 2004

Rudd RM, Gower NH, Spiro SG, et al. Gemcitabine plus carboplatin versus mitomycin, ifosfamide, and cisplatin in patients with stage IIB or IV non-small-cell lung cancer: A phase III randomized study of the London Lung Cancer Group. *J Clin Oncol* ; 23: 142-153, 2005.

Rudd RM, Gower NH, Spiro SG, et al: Gemcitabine plus carboplatin versus mitomycin, ifosfamide, and cisplatin in patients with stage IIB or IV non small cell lung cancer: A phase III randomized study of the London cancer group. *J Clin Oncol*; 23:142-153, 2005

Ryu JS, Lee HJ. Effects of comorbidity and smoking on the survival of lung cancer patients. *J Clin Oncol*; 24: 5468 -5469, 2006.

Sakurai H, Asamura H, Watanabe S, Suzuki K, Tsuchiya R. Clinico- pathologic features of peripheral squamous cell carcinoma of the lung. *Ann Thorac Surg* ; 78: 222-227, 2004.

Salomaa ER, Sallinen S, Hiekkänen H, Liippo K. Delays in the diagnosis and treatment of lung cancer. *Chest*; 128: 2282-2288, 2005.

Salon C, Merdzhanova G, Brambilla C, et al: E2F-1, Skp2 and cyclin E oncoproteins are upregulated and directly correlated in high-grade neuroendocrine lung tumors. *Oncogene*; 26:6927-6936, 2007

Sandler A, Gray R, Perry MC, et al: Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*; 355: 2542-2550, 2006

Santo A, Genestreti G, Terzi A, Azzoni P, Sava T, Manno P, et al. Gemcitabine (GEM) and vindesine (VDS) in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): a phase II study in elderly or poor performance status patients. *Lung Cancer*; 53:355-360, 2006.

Sasco AJ, Secretan MB, Straif K. Tobacco smoking and cancer: a brief review of recent epidemiological evidence. *Lung Cancer* ; 45:S3-S9, 2004.

Saynak M, Aksu G, Fayda M, et al. The results of concomitant and sequential chemoradiotherapy with cisplatin and etoposide in patients with locally advanced non-small cell lung cancer. *J BUON*; 10: 213-218, 2005.

Scagliotti G, von Pawel P, Biesma J, Vansteenkiste B, Manegold J, Simms C, et al. Phase III study of pemetrexed plus cisplatin in chemo-naïve patients with locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Thor Oncol* 2007; 2(August (8)) [PRS-03 abstract].

Scagliotti GV, De Marinis F, Rinaldi M, et al. Phase III randomized trial comparing three platinum-based doublets in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*; 20: 4285-4291, 2002

Scagliotti GV, De Marinis F, Rinaldi M, et al: Phase III randomized trial comparing three platinum-based doublets in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*; 20: 4285-4291, 2002

Scagliotti GV, De MF, Rinaldi M, et al. Phase III randomized trial comparing three platinum-based doublets in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*; 20: 4285-4291, 2002.

Scagliotti GV, Parikh P, von Pawel J, Biesma B, Vansteenkiste J, et al. Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naïve patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 26: 3543-3551, 2008.

Scagliotti V, Parikh P, von Pawel J, et al: Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naïve patients with advanced stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*; 26; 3543-3551, 2008

Schallreuter KU, Elgren TE, Nelson Jr LS, MacFarlan S, Yan-Sze I, Hogenkamp HP. Ribonucleotide diphosphate reductase from human metastatic melanoma. *Melanoma Res* 2: 393-400, 1992.

Schiller JH, Harrington D, Belani CP, et al: Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*; 356:92-98, 2002

Schulz KF, Grimes DA. Multiplicity in randomised trials II: subgroup and interim analyses. *Lancet*; 365:1657-1661, 2005.

Sculier JP, Lafitte JJ, Lecomte J, et al. A phase III randomised trial comparing sequential chemotherapy using cisplatin-based regimen and paclitaxel to cisplatin-based chemotherapy alone in advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*; 18:1037-1042, 2007.

Sederholm C, Hillerdal G, Lamberg K, et al: Phase III trial of gemcitabine plus carboplatin versus single agent gemcitabine in the treatment of locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer: The Swedish lung cancer study group. *J Clin Oncol*; 23:8380-8388, 2005

Sequist LV, Martins RG, Spigel D, Grunberg SM, Spira A, et al. Firstline gefitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring somatic EGFR mutations. *J Clin Oncol* 26: 2442-2449, 2008.

Seve P, Mackey JR, Isaac S, et al. cN-II expression predicts survival in patients receiving gemcitabine for advanced non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 49:363-370,2005

Shaw A, Yeap B, Mino-Kenudson M, et al. Clinical Features and Outcome of Patients With Non-Small-Cell Lung Cancer Who Harbor EML4-ALK. *J Clin Oncol*; 27: 4247-4253,2009

Shepherd FA, Dancey J, Ramlau R, et al: Prospective randomized trial of docetaxel versus best supportive care in patients with non-small-cell lung cancer previously treated with platinum-based chemotherapy. *J Clin Oncol*; 18: 2095-2103, 2000

Shepherd FA, Rodrigues Pereira J, Ciuleanu T, et al: Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*; 353: 123-132, 2005

Shepherd FA, Rodrigues PJ, Ciuleanu T, et al. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*; 353:123-132,2005.

Shibuya K, Inoue M, Lopez AD. Statistical modeling and projections of lung cancer mortality in 4 industrialized countries. *Int J Cancer* ; 117: 476 - 485,2005.

Shinkai T, Eguchi K, Sasaki Y, et al. A prognostic-factor risk index in advanced non-small-cell lung cancer treated with cisplatin-containing combination chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol*; 30: 1-6,1992.

Shirota Y, Stoecklacher J, Brabender J, et al. ERCC1 and thymidylate synthase mRNA levels predict survival for colorectal cancer patients receiving combination oxaliplatin and fluorouracil chemotherapy. *J Clin Oncol*;19: 4298-4304,2001

Sigmond J, Backus HH, Wouters D, et al: Induction of resistance to the multitargeted antifolate pemetrexed (ALIMTA) in WiDr human colon cancer cells is associated with thymidylate synthase overexpression. *Biochem Pharmacol*; 66:431-438, 2003

Simon G, Sharma A, Li X, et al. Feasibility and efficacy of molecular analysis-directed individualized therapy in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*; 25: 2741-2746,2007

Smit EF, van Meerbeeck JPAM, Lianes P, et al. Three-arm randomized study of two cisplatin-based regimens and paclitaxel plus gemcitabine in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Lung Cancer Group-EORTC 08975. *J Clin Oncol* ; 21: 3909-3917,2003.

Smith IE, O'Brien ME, Talbot DC, et al. Duration of chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: a randomized trial of three versus six courses of mitomycin, vinblastine, and cisplatin. *J Clin Oncol* ; 19: 1336 -1343,2001.

- Sobhian B, Shao G, Lilli DR, Culhane AC, Moreau LA, et al. RAP80 targets BRCA1 to specific ubiquitin structures at DNA damage sites. *Science* 316: 1198-1202, 2007.
- Socinski MA, Morris DE, Masters GA, et al. Chemotherapeutic management of stage IV non-small cell lung cancer. *Chest* ; 123: 226S-243S,2003.
- Socinski MA, Schell MJ, Peterman A, et al. Phase III trial comparing a de?ned duration of therapy versus continuous therapy followed by second-line therapy in advanced-stage IIIB/IV non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*; 20: 1335-1343,2002
- Soda M, Choi YL, Enomoto M, et al: Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 448:561-566, 2007
- Soh, J, Toyooka S, Ichihara S, et al. Sequential molecular changes during multistage pathogenesis of small peripheral adenocarcinomas of the lung. *J Thorac Oncol*;3:340-347,2008
- Soon Y, Stockler M, Askie I, et al: Duration of Chemotherapy for Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Trials *J Clin Oncol*;27; 3277-3283, 2009
- Sordella R, Bell DW, Haber DA, Settleman J. Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. *Science*; 305:1163-1167,2004
- Sowers R, Toguchida T, Qin J, et al: mRNA expression levels of E2F transcription factors correlate with dihydrofolate reductase, reduced folate carrier, and thymidylate synthase mRNA expression in osteosarcoma. *Mol Cancer Ther* ; 2: 535-541, 2003
- Stathopoulos GP, Veslemes M, Georgatou N, et al. Front-line paclitaxel-vinorelbine versus paclitaxel-carboplatin in patients with advanced non-small-cell lung cancer: a randomized phase III trial. *Ann Oncol*; 15: 1048-1055,2004.
- Subramanian J, Govindan R. Lung cancer in never smokers: a review. *J Clin Oncol* ; 25: 561-570,2007.
- Sudo T, Nitta M, Saya H, Ueno NT. Dependence of paclitaxel sensitivity on a functional spindle assembly checkpoint. *Cancer Res* 64: 2502-2508, 2004.
- Sun S, Schiller JH, Gazdar AF. Lung cancer in never smokers-a different disease. *Nat Rev Cancer* ; 7: 778 -790,2007.
- Takamizawa J, Konichi H, Yanagasiwava K, et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res*; 64: 3753-6,2004

Takamochi K, Ogura T, Suzuki K, et al. Loss of heterozygosity on chromosomes 9q and 16p in atypical adenomatous hyperplasia concomitant with adenocarcinoma of the lung. *Am J Pathol*;159:1941-1948,2001.

Tammemagi CM, Neslund-Dudas C, Simoff M, Kvale P. Smoking and lung cancer survival: the role of comorbidity and treatment. *Chest* ; 125: 27-37,2004.

Tan X, Apte U, Micsenyi A, et al. Epidermal growth factor receptor: a novel target of the Wnt/ β -catenin pathway in liver. *Gastroenterology*;129: 285-302,2005.

Tang X, Shigematsu H, Bekele BN, et al. EGFR tyrosine kinase domain mutations are detected in histologically normal respiratory epithelium in lung cancer patients. *Cancer Res*; 65:7568-7572,2005.

Taron M, Rosell R, Felip E, et al. BRCA1 mRNA expression levels as an indicator of chemoresistance in lung cancer. *Hum Mol Genet*; 13:2443-2449,2004

Thatcher N, Chang A, Parikh P, et al. Gefitinib plus best supportive care in previously treated patients with refractory advanced non-small-cell lung cancer: results from a randomised, placebo-controlled, multicentre study (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer). *Lancet*; 366: 1527-1537,2005.

The Elderly Lung Cancer Vinorelbine Italian Study group. Effects of vinorelbine on quality of life and survival of elderly patients with advanced non-small cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst*;91:66-72, 1999.

Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, et al. New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst* 92: 205-216, 2000.

Thun MJ, Henley SJ, Calle EE. Tobacco use and cancer: an epidemiologic perspective for geneticists. *Oncogene* ; 21: 7307-7325,2002.

Thun MJ, Lally CA, Flannery JT, Calle EE, Flanders WD, Heath CW r. Cigarette smoking and changes in the histopathology of lung cancer. *J Natl Cancer Inst*;89:1 580 -1586,1997.

Tibaldi C, Vasile E, Antonuzzo A, DiMarsico R, Fabbri A, Innocenti F, et al. First line chemotherapy with planned sequential administration gemcitabine followed by docetaxel in elderly advanced non-small cell lung cancer patients: a multicenter phase II study. *Br J Cancer*;98:558-63, 2008.

Tominaga M, Sueoka N, Irie K, et al. Detection and discrimination of preneoplastic and early stages of lung adenocarcinoma using hnRNP B1 combined with the cell cycle-related markers p16, cyclin D1, and Ki-67. *Lung Cancer*;40:45-53,2003.

Travis W, Garg K, Franklin W, et al. Evolving Concepts in the Pathology and Computed Tomography Imaging of Lung Adenocarcinoma and Bronchioloalveolar Carcinoma. *J Clin Oncol* ; 23: 3279-3287,2005

Travis WD, Brambilla E, Müller-Hermelink HK, et al: Pathology and Genetics: Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. Lyon, IARC, 2004

Travis WD, Colby TV, Corrin B, et al: Histological Typing of Lung and Pleural Tumours, 3rd ed. Berlin, Springer, 1999

Tremeau-Bravard A, Riedl T, Egly JM, et al. Fate of RNA polymerase II stalled at a cisplatin lesion. *J Biol Chem*; 279:7751-7759,2004

Tsao AS, Liu D, Lee JJ, Spitz MM, Hong WK. Smoking affects treatment outcomes in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer*; 106: 2428 -2436,2006.

Tyczynski JE, Bray F, Aareleid T, et al. Lung cancer mortality patterns in selected Central, Eastern and Southern European countries. *Int J Cancer*; 109: 598 - 610,2004

U.S. Department of Health and Human Services. The health consequences of involuntary exposure to tobacco smoke: a report of the Surgeon General. Atlanta, GA: Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health; 2006. Available at: <http://www.surgeongeneral.gov/library/secondhandsmoke/>.

U.S. Department of Health and Human Services. The health consequences of smoking: a report of the Surgeon General. Atlanta: US- DHHS, Centers for Disease Control and Prevention, Coordinating Center for Health Promotion, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health; 2004. Available at: <http://www.surgeongeneral.gov/library/smoking-consequences/>.

Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon GJ, et al. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev*; 20:515-24,2006

Veronesi A, Magri MD, Tirelli U, et al. Chemotherapy of advanced non-small-cell lung cancer with cyclophosphamide, adriamycin, methotrexate, and procarbazine versus cisplatin and etoposide. A randomized study. *Am J Clin Oncol* ; 11: 566-571,1988.

Videtic GM, Stitt LW, Dar AR, et al. Continued cigarette smoking by patients receiving concurrent chemoradiotherapy for limited stage small-cell lung cancer is associated with decreased survival. *J Clin Oncol*; 21: 1544 -1549,2003.

Visbal AL, Williams BA, Nichols FC III, et al. Gender differences in non-small-cell lung cancer survival: an analysis of 4,618 patients diagnosed between 1997 and 2002. *Ann Thorac Surg*; 78: 209 - 215,2004.

von Plessen C, Bergman B, Andresen O, et al. Palliative chemotherapy beyond three courses conveys no survival or consistent quality-of-life benefits in advanced non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer*; 95: 966 -973,2006.

Wakelee HA, Chang ET, Gomez SL, et al. Lung cancer incidence in never smokers. *J Clin Oncol* ; 25: 472- 478,2007.

Wang R, Lagakos SW, Ware JH, et al. Statistics in medicine-reporting of subgroup analyses in clinical trials. *N Engl J Med*;357:2189-2194,2007.

Warren CW, Jones NR, Eriksen MP, Asma S. Patterns of global tobacco use in young people and implications for future chronic disease burden in adults. *Lancet*;367:749 -753,2006.

Weiss GJ, Rosell R, Fossella F, et al. The impact of induction chemotherapy on the outcome of second-line therapy with pemetrexed or docetaxel in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol*; 18: 453-460,2007.

Weiss W. Cigarette smoking and lung cancer trends. A light at the end of the tunnel? *Chest*; 111: 1414 -1416,1997.

Westra WH. Early glandular neoplasia of the lung. *Respir Med*;1:163-169,2000.

Wijnhoven SW, Hoogervorst EM, de Waard H, et al. Tissue specific mutagenic and carcinogenic responses in NER defective mouse models. *Mutat Res* ; 614:77-94,2007

Wislez M, Beer D, Wistuba I, et al. Molecular biology, genomics, and proteomics in bronchioloalveolar carcinoma. *J Thorac Oncol*; 1:S8-S12,2006

World Health Organization. Global burden of disease 2002 estimates (revised). Available at: <http://www.who.int/healthinfo/bodestimates/en/index.html>.

World Health Organization. WHO Report on the Global Tobacco Epidemic, 2008: The MPOWER package. Geneva: WHO; 2008. Available at: http://www.who.int/tobacco/mpower/mpower_report_full_2008.Pdf.

World Health Organization: Histological Typing of Lung Tumours, 1st ed. Geneva, World Health Organization, 1967

World Health Organization: Histological Typing of Lung Tumours. 2nd ed. Geneva, World Health Organization, 1981

Wu JY,Wu SG,Yang CH, et al. Lung cancer with epidermal growth factor receptor exon 20 mutations is associated with poor gefitinib treatment response. *Clin Cancer Res*;14: 4877-82,2008

Xu X, Page JL, Surtees JA, Liu H, Lagedrost S, et al. Broad overexpression of ribonucleotide reductase genes in mice specifically induces lung neoplasms. *Cancer Res* 68: 2652-2660, 2008.

Yanaihara N, Caplan N, Bowman E, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*; 9:189-98,2006

Yang CH, Shih JY, Chen KC, et al. Survival outcome and predictors of gefitinib antitumor activity in East Asian chemo-naïve patients with advanced nonsmall cell lung cancer. *Cancer*; 107: 1873-1882,2006.

Yang L, Parkin DM, Li L, Chen Y. Time trends in cancer mortality in China: 1987-1999. *Int J Cancer*; 106: 771-783,2003.

Yang P, Cerhan JR, Vierkant RA, et al. Adenocarcinoma of the lung is strongly associated with cigarette smoking: further evidence from a prospective study of women. *Am J Epidemiol* ; 156: 1114 -1122,2002.

Yatabe Y, Kosaka T, Takahashi T, et al. EGFR mutation is specific for terminal respiratory unit type adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol*;29:633-639,2005.

Yoshida Y, Shibata T, Kokubu A, et al. Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in atypical adenomatous hyperplasia and bronchioloalveolar carcinoma of the lung. *Lung Cancer*; 50:1-8,2005.

You L, He B, Xu Z, et al. Inhibition of Wnt-2-mediated signaling induces programmed cell death in non-small-cell lung cancer cells. *Oncogene*; 23: 6170-6174,2004

Yu SL, Chen HY, Chang GC, et al. MicroRNA signature predicts survival and relapse in lung cancer. *Cancer Cell*;13 :48-57,2008

Zell JA, Ou SH, Ziogas A, Anton-Culver H. Epidemiology of bronchioloalveolar carcinoma: improvement in survival after release of the 1999 WHO classification of lung tumors. *J Clin Oncol*;23:8396-8405,2005.

Zheng Z, Chen T, Li X, et al: DNA synthesis and repair genes RRM1 and ERCC1 in lung cancer. *N Engl J Med*; 356:800-808, 2007.

Zhou BS, Tsai P, Ker R, Tsai J, Ho R, Yu J, Shih J, Yen Y. Overexpression of transfected human ribonucleotide reductase M2 subunit in human cancer cells enhances their invasive potential. *Clin Exp Metastasis* 16: 43-49, 1998.