

Marcin Skrzypski

**MOLEKULARNE CZYNNIKI ROKOWNICZE
U CHORYCH OPEROWANYCH Z POWODU
NIEDROBNOKOMÓRKOWEGO RAKA PŁUCA**

Praca na stopień doktora nauk medycznych
Promotor: Prof. dr hab. med. Ewa Jassem

Praca wykonana w:

1. Katalońskim Instytucie Onkologii (Institut Catala d'Oncologia),
Barcelona, Hiszpania
2. Klinice Alergologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
3. Klinice Onkologii i Radioterapii Gdańskiego Uniwersytetu
Medycznego

Praca finansowana przez:

1. Komitet Badań Naukowych (Grant promotorski Nr 2P05C 02430)
2. Praca statutowa Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, ST- 23

Gdańsk 2009

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP	4
1.1 WYSTĘPOWANIE I LECZENIE RAKA PŁUCA W POLSCE	4
1.2 MOLEKULARNE MARKERY ROKOWNICZE W NIEDROBNOKOMÓRKOWYM RAKU PŁUCA	6
1.3 MOLEKULARNE TECHNIKI OZNACZANIA EKSPRESJI GENÓW NA ETAPIE TRANSKRYPCJI	7
1.4 PODSTAWA WYBORU GENÓW DO ANALIZY EKSPRESJI	8
2. CEL NAUKOWY	17
2.1. CELE SZCZEGÓŁOWE	17
3. UZASADNIENIE PODJĘCIA BADAŃ	18
4. MATERIAŁ I METODY	19
5. WYNIKI	36
5.1 ANALIZY JEDNOCZYNNIKOWE	36
5.2 GENEROWANIE „OPTYMALNEGO” MODELU ROKOWNICZEGO W GRUPIE UCZĄCEJ - ANALIZA WIELOCZYNNIKOWA	41
5.3 WERYFIKACJA WYNIKÓW ZE ZBIORU UCZĄCEGO W ZBIORZE WALIDACYJNYM	44
5.4 MODEL ROKOWNICZY OPARTY NA WYBRANYCH GENACH	45
5.5 ROKOWNICZY MODEL ŁĄCZONY (MODEL ZREDUKOWANY)	47
5.6 MODELE 5-GENOWY I 2-GENOWY - ANALIZY W PODGRUPACH Z UWZGLĘDNIENIEM ŚREDNICY GUZA - PONIŻEJ I POWYŻEJ 40 MM	49
6. DYSKUSJA	51
6.1 METODY OCENY EKSPRESJI GENÓW OPARTE NA BADANIU ILOŚCI mRNA A METODY IMMUNOHISTOCHEMICZNE NASILENIA EKSPRESJI BIAŁKA	51
6.2 OCENA EKSPRESJI GENÓW NA PODSTAWIE LICZBY KOPII mRNA – PLATFORMY MIKROMACIERZY OLIGONUKLEOTYDOWYCH VERSUS METODA ILOŚCIOWEJ RT-PCR	52

6.3 SYGNATURY EKSPRESJI GENÓW W NIEDROBNOKOMÓRKOWYM RAKU PŁUCA OPARTE NA METODZIE MIKROMACIERZY OLIGONUKLEOTYDOWYCH	53
6.4. ROKOWNICZE PROFILE EKSPRESJI GENÓW OPARTE NA METODZIE ILOŚCIOWEJ RT-PCR	57
6.5 POTENCJALNE ZASTOSOWANIE OCENY EKSPRESJI GENÓW METODĄ RT-PCR W MATERIALE ARCHIWALNYM UTRWALONYM W FORMALINIE I PARAFINIE	58
6.6 GENY ISTOTNE Z PUNKTU WIDZENIA OKREŚLENIA ROKOWANIA CHORYCH NA RAKA PŁASKONABŁONKOWEGO	59
6.7 NOWE FORMY SYSTEMOWEGO LECZENIA UZUPEŁNIAJĄCEGO LECZENIE CHIRURGICZNE W NDRP	62
7. WNIOSKI	66
8. STRESZCZENIE	67
9.SUMMARY	69
10. ZAŁĄCZNIK	71
11. PIŚMIENNICTWO	81

1. Wstęp

1.1 Występowanie i leczenie raka płuca w Polsce

W Polsce, podobnie jak w większości rozwiniętych krajów, rak płuca jest najczęstszą przyczyną zgonów z powodu nowotworów [1]. Rocznie w naszym kraju notuje się około 20 000 zachorowań, przy czym 80% przypadków stanowi niedrobnokomórkowy rak płuca (ndrp). W Polsce najczęstszym typem histologicznym ndrp jest rak płaskonabłonkowy [2], a następnie kolejno wymienia się rak gruczołowy i wielkokomórkowy.

Najskuteczniejszą metodą leczenia ndrp jest radykalny zabieg operacyjny, jednak odległe wyniki są niezadowalające – jedynie 30-40% operowanych chorych przeżywa 5 lat [3]. Wyniki te dotyczą ogółu operowanych chorych, natomiast w grupie z niższym stopniem zaawansowania nowotworu (stopnie IA i IB) odsetek wyleczeń jest wyższy [2] i wynosi odpowiednio 66% i 53%. Przyczyną niepowodzenia leczenia chirurgicznego jest najczęściej nawrót nowotworu w postaci odległych przerzutów.

W dwóch metaanalizach z 1995 i 2008 roku wykazano, że pooperacyjna chemioterapia zawierająca cis-platynę prowadzi do około pięcioprocentowej poprawy wyleczeń [4, 5]. W polskich warunkach oznacza to około 150 dodatkowo uratowanych chorych rocznie. Niestety zastosowanie uzupełniającej chemioterapii u wszystkich chorych poddanych doszczętej resekcji płucnej oznacza, że około 3000 z nich otrzymałoby to toksyczne i kosztowne leczenie bez żadnej korzyści. W tej sytuacji konieczny wydaje się taki dobór chorych do leczenia uzupełniającego, aby związana z nim korzyść była jak najwyższa.

Z powodu ograniczonej wartości klinicznych czynników rokowniczych, wyniki leczenia chirurgicznego w poszczególnych przypadkach są trudne do przewidzenia. U chorych w tym samym stopniu zaawansowania nowotworu ocenionym na podstawie badania histopatologicznego i o tych samych „konwencjonalnych” czynnikach rokowniczych, takich jak: wiek, płeć, stan sprawności czy ubytek masy ciała, występuje zróżnicowane ryzyko miejscowej wznowy i tworzenia się przerzutów. Obecna kwalifikacja do uzupełniającej chemioterapii oparta jest na ocenie zaawansowania choroby według skali TNM -

do takiego leczenia są kwalifikowani chorzy w stopniu II i IIIA, nadal nie ma jednak dowodów na korzyść z takiego postępowania u chorych w stopniu I. Rola chemioterapii uzupełniającej w stopniu IA ndrp jest poznana w ograniczonym stopniu, bowiem chorzy w tym stadium rzadko uczestniczyli w prospektywnych badaniach, jednak zbiorcza analiza sugeruje raczej niekorzystny efekt chemioterapii w tej podgrupie [5]. W badaniu CALGB 9633 nie wykazano natomiast poprawy całkowitego przeżycia u chorych w stopniu IB; znamienne przedłużenie całkowitego przeżycia wykazano jedynie w nieplanowanej początkowo analizie w podgrupie chorych, u których średnica guza przekraczała 4 cm [6]. Z drugiej strony nawrót nowotworu (najczęściej w formie odległych przerzutów) po doszczętnym zabiegu operacyjnym stwierdza się u 25% chorych z zaawansowaniem IA i 40% chorych z zaawansowaniem IB [7-9]. Można zatem przypuszczać, że ta grupa chorych wysokiego ryzyka odległego nawrotu w I stopniu zaawansowania mogłaby odnieść korzyść z uzupełniającej chemioterapii.

Jak wspomniano wcześniej duże prospektywne badania III fazy dostarczyły bezsprzecznych dowodów na korzyść związaną ze stosowaniem uzupełniającej chemioterapii w grupie chorych na ndrp w II i III stopniu zaawansowania. Wyniki metaanalizy LACE wykazały istotnie mniejsze ryzyko nawrotu u chorych otrzymujących leczenie uzupełniające (HR=0.83 w II stopniu i HR=0.83 w III stopniu) [5]. Z drugiej strony u około 40% chorych w stopniu II i u około 20% chorych w stopniu IIIA nie dochodzi do nawrotu odległego po doszczętniej resekcji guza i ci chorzy nie odnoszą dodatkowej korzyści z leczenia uzupełniającego [10]. W tej sytuacji znaczna grupa chorych w stopniach II i IIIA kwalifikowanych do uzupełniającego leczenia wyłącznie na podstawie czynników klinicznych otrzymuje chemioterapię, która nie przynosi korzyści klinicznej.

Wskazanie podgrup chorych o różnym ryzyku odległego nawrotu, a zatem różnym rokowaniu, przy zastosowaniu molekularnych testów mogłoby się stać podstawą bardziej racjonalnej kwalifikacji chorych na ndrp do pooperacyjnej chemioterapii.

1.2 Molekularne markery rokownicze w niedrobnokomórkowym raku płuca

W molekularnych testach rokowniczych wykorzystuje się różne materiały biologiczne, takie jak płwocina, surowica, tkankowe bioptaty guza lub materiał pooperacyjny. Pierwsze analizy obejmowały przede wszystkim zaburzenia na poziomie DNA - występowanie mutacji w genach supresorowych (takich jak *P53*) lub mutacji aktywujących w obrębie protoonkogenów (na przykład w obrębie genu *K-ras*). Wyniki tych prac nie były jednoznaczne [11-14]. Trudności w interpretacji rokowniczego występowania mutacji wynikają między innymi z faktu, że występują one w wielu obszarach genu, i w związku z tym w zróżnicowany sposób warunkują czynność kodowanego białka. Podsumowaniem badań nad *P53* była metaanaliza z roku 2000, w której wykazano, że mutacje w tym genie nie miały znaczenia rokowniczego dla chorych na raka płaskonabłonkowego, a jedynie dla raka gruczołowego [15]. Podobne rozbieżności dotyczą genu *K-ras* - część prac wskazuje na niekorzystny wpływ jego mutacji na przeżycie chorych na ndrp, ale inne nie potwierdzają tej zależności [16]. Obok mutacji aktywujących w onkogenach, wykazano związek pomiędzy gorszym rokowaniem chorych na niezaawansowanego ndrp a amplifikacją kopii genu *EGFR* [17]. W ostatnich dwóch dekadach dokonano oceny rokowniczego znaczenia molekularnych zaburzeń wielu pojedynczych genów lub ich grup. Analizowano także innego rodzaju zaburzenia w obrębie DNA, takie jak utrata heterozygotyczności lub hipermetylacja regionów promotorowych [18, 19]. Żadne z tych badań nie pozwoliło na określenie użytecznego klinicznie rokowniczego testu opartego na analizie pojedynczych genów.

Poza zaburzeniami na poziomie DNA, przedmiotem intensywnych badań było rokownicze znaczenie zaburzeń ekspresji poszczególnych genów z użyciem metod immunohistochemicznych. Między innymi oceniano takie białka jak cyklina E, śródbłonkowy czynnik wzrostu A, p53, p16(INK4A), p27(kip1) i beta-katenina [20]. Podobnie jak w przypadku testów molekularnych, w badaniach tych nie wykazano klinicznego znaczenia analizy ekspresji genów za pomocą metod immunohistochemicznych [21].

1.3 Molekularne techniki oznaczania ekspresji genów na etapie transkrypcji

W ostatnich kilku latach udoskonalono techniki umożliwiające ilościowe badanie ekspresji genów na poziomie transkrypcji w tkankach nowotworowych. Metody RT-PCR oraz mikromacierze oligonukleotydowe stwarzają możliwość jednoczesnej analizy kopii mRNA dla setek, a nawet tysięcy genów. Najnowsze badania prowadzone z wykorzystaniem wymienionych technik przyniosły wyniki, które mogą przyczynić się do zmodyfikowania klasyfikacji histologicznej i zaawansowania raka płuca o dodatkowe kryteria molekularne [22, 23]. Na przykład wykazano istnienie kilku „molekularnych” podtypów gruczołowego raka płuca, różniących się od siebie rokowaniem [23-25]. Z kolei, w odniesieniu do płaskonabłonkowego raka płuca wyodrębniono (z użyciem technologii mikromacierzy oligonukleotydowych) trzy profile ekspresji genów związane z rokowaniem. [26-28]. Wyniki tych prac dają nadzieję, że w przyszłości będzie można kwalifikować chorych na raka płaskonabłonkowego z wysokim ryzykiem nawrotu do uzupełniającego leczenia na podstawie profilu ekspresji genów.

Platformy mikromacierzy oligonukleotydowych stanowią użyteczne narzędzie do oceny ekspresji niemal całego genomu w badanym materiale z guza. Stwarza to możliwość wyodrębnienia zbiorów genów, których charakterystyczny profil ekspresji związany jest z cechami klinicznymi, na przykład: skłonnością guza do tworzenia odległych przerzutów lub miejscowego naciekania. Jest to jednak metoda kosztowna i skomplikowana, co w znacznym stopniu ogranicza możliwość jej stosowania w codziennej praktyce laboratoryjnej.

Wśród technologii stosowanych do analizy ekspresji genów, ilościowa RT-PCR charakteryzuje się najwyższą czułością i swoistością, a także w najszerszym zakresie umożliwia wykrywanie różnic w ekspresji genów (ang. *dynamic range*) [29, 30]. Ponadto wykazano, że metoda ta jest odpowiednia dla analizy ekspresji genów w materiale archiwalnym (w tkankach utrwalonych w formalinie i przechowywanych w blokach parafinowych), który w codziennej praktyce jest najpowszechniej dostępny. Wyżej wspomniane cechy ilościowej RT-PCR powodują, że metoda ta mogłaby być stosowana w rutynowej laboratoryjnej diagnostyce. Istotne jest również, że RT-PCR pozwala na równoczesną ocenę ekspresji nawet kilkuset genów, co czyni zeń idealne narzędzie umożliwiające walidację szeregu genów wyodrębnionych metodą mikromacierzy

oligonukleotydowych [31]. Należy podkreślić, że w przypadku ndrp rokownicze profile rzadko obejmują dużą liczbę genów. Na przykład w jednym z badań wykazano potencjalne rokownicze znaczenie analizy ekspresji 3 genów w ocenie ryzyka nawrotu w płaskonabłonkowym raku płuca [32].

1.4 Podstawa wyboru genów do analizy ekspresji

Wyboru genów do analizy w niniejszej pracy dokonano na podstawie dostępnych badań podstawowych oraz analiz z zastosowaniem techniki mikromacierzy oligonukleotydowych. Rozważano przede wszystkim te geny, których zwiększona lub zmniejszona ekspresja związana była we wcześniejszych badaniach z wysokim ryzykiem nawrotu [33]. Analizowano także geny związane z różnymi zjawiskami molekularnymi w komórce i jej mikrośrodowisku (ang. *microenvironment*), takimi jak zmiana fenotypu z nabłonkowego na mezenchymalny (ang. *epithelial to mesenchymal transition*), odpowiedź nowotworu na hipoksję oraz wzrost migracyjnego potencjału komórek raka. Poszczególne geny dobrano tak, żeby możliwa była ocena jak największej liczby "molekularnych ścieżek" związanych z tworzeniem przerzutów. Na podstawie dotychczasowych badań następujące procesy molekularne uznano za potencjalnie istotne dla progresji ndrp:

[1] Oddziaływanie pomiędzy komórkami nabłonkowymi tkanki nowotworowej a składnikami podścieliska (macierzą zewnątrzkomórkową i makrofagami)

Parakrynną aktywność komórek nowotworowych pobudza komórki podścieliska guza (m.in. makrofagi typu TAM (ang. *tumor associated macrophages*) do wytwarzania cytokin przyspieszających wzrost, hamujących apoptozę oraz nasilających tworzenie naczyń krwionośnych [34-36]. W efekcie parakrynną aktywność komórek podścieliska wspomaga niepohamowany wzrost guza. Dodatkowo do wzrostu nowotworu przyczynia się stan "miejscowej immunosupresji" wywołany nieprawidłową czynnością makrofagów.

Jednym z czynników wytwarzanych parakrynnie przez epitelialne komórki raka jest czynnik wzrostu kolonii makrofagów CSF1 (ang. *colony stimulating factor*

for macrophages). Jest to czynnik chemotaktyczny dla monocytów krwi obwodowej, które pod jego wpływem wnikają w obręb nowotworu i ulegają różnicowaniu do makrofagów typu TAM. Wykazano, że obecność tych komórek jest związana z gorszym rokowaniem w wielu nowotworach [37, 38]. Makrofagi te (TAM lub M2), jak wspomniano wyżej, zamiast przeciwdziałać wzrostowi nowotworu, wydzielają czynniki wzmagające jego wzrost i progresję [37, 39]. Dochodzi do tego między innymi poprzez wydzielanie przez nie naskórkowego czynnika wzrostu (ang. *epithelial growth factor* - EGF), który wiążąc się z receptorem na powierzchni komórek nowotworowych, wyzwała w nich zdolność do migracji [40]. Ponadto, w ten sposób aktywowane komórki nowotworowe wydzielają CSF-1, który rekrutuje kolejne monocyty oraz pobudza je do różnicowania się w kierunku TAM oraz dalszej produkcji EGF. Opisana wzajemna parakrylna stymulacja jest niezbędna dla wzbudzenia ukierunkowanej migracji komórek nowotworowych oraz „intrawazacji” (zdolności do przechodzenia z tkanki nowotworowej do światła naczyń) [41-43]. Wykazano, że makrofagi najliczniej naciekają inwazyjny front guza, zaś w częściach wewnętrznych okolicy naczyń krwionośnych [44]. Taka lokalizacja makrofagów powoduje wyższe stężenie EGF wokół naczyń krwionośnych, co ukierunkowuje intrawazację komórek nowotworowych zgodnie z gradientem EGF. Interakcje pomiędzy komórkami nowotworowymi a składnikami podścieliska w obrębie guza, prowadzące do wytworzenia „inwazyjnego” fenotypu, zdolnego do naciekania zdrowego mięszu płuca i intrawazacji są zatem potencjalnie istotnym elementem progresji. Istnieją doniesienia o możliwościach terapeutycznego blokowania oddziaływań pomiędzy makrofagami i komórkami nowotworowymi za pomocą nowych cząsteczek [45]. W obrazach mikroskopowych obszarów sąsiadujących z masą guza obserwuje się często pojedyncze komórki naciekające podścielisko lub naczynia. Komórki te mają odmienną morfologię w porównaniu z „klasycznymi” nabłonkowatymi komórkami nowotworowymi – przypominają komórki linii mezenchymalnej (fibroblastoidalne). Uważa się, że zmiany fenotypu z epitelialnego na mezenchymalny (ang. *epithelial to mesenchymal transition* – EMT) także zależą od swoistej aktywacji szlaków molekularnych, których ocena może mieć rokownicze znaczenie [46].

[2] Zmiana fenotypu z nabłonkowego na mezenchymalny (EMT) i związany z tym agresywny przebieg choroby

Komórki raka o morfologii mezenchymalnej charakteryzują się zanikiem wiązań międzykomórkowych, utratą apikalno-bazalnej polarności oraz wysokim potencjałem migracji. Umożliwia im to oddzielenie się od głównej masy guza i naciekanie otoczenia. EMT – zjawisko fizjologiczne w okresie embriogenezy – uważa się obecnie za kluczowe dla progresji zaburzenie molekularne, warunkujące tworzenie odległych przerzutów. Molekularne mechanizmy EMT nie zostały w pełni wyjaśnione, jednak powszechnie przyjmuje się, że ich markerem jest utrata ekspresji E-kadheryny. Białko to stanowi fizyczną podstawę połączeń międzykomórkowych oraz warunkuje polarność komórek nabłonkowych. Opisano szereg kinazowych receptorów oraz aktywujących je ligandów zapoczątkowujących EMT, takich jak insulinopodobny czynnik wzrostu I (ang. *insulin-like growth factor* - IGF1), receptor dla czynnika wzrostu fibroblastów (ang. *fibroblast growth factor receptor* - FGFR) oraz kinazy Met i SRC [47, 48]. Wśród tych czynników jest także naskórkowy czynnik wzrostu (EGF). Wykazano, że po aktywacji receptora dla EGF dochodzi między innymi do utraty ekspresji białek charakterystycznych dla fenotypu nabłonkowego (brak ekspresji E-kadheryny i β -kateniny) i jednocześnie do pojawienia się ekspresji białek markerowych dla typu mezenchymalnego, takich jak wimentyna i N-kadheryna [49]. Doświadczalnie indukowana ekspresja tej ostatniej powoduje nieuporządkowany wzrost transfekowanych komórek raka płaskonabłonkowego oraz represję E-kadheryny [50]. W realizacji procesu EMT zainicjowanego szlakami przekąźniczymi kinaz receptorowych uczestniczą ponadto niedawno zidentyfikowane czynniki transkrypcyjne, na przykład białko Twist. Wykazano także, że zjawisko EMT jest dodatkowo nasilane poprzez pobudzenie receptora alfa5beta1 przez fibronektynę (FN1), która jest składnikiem macierzy międzykomórkowej. Gen dla fibronektyny został ostatnio zidentyfikowany jako jeden z 6 genów związanych z rokowaniem chorych na rozlanego chłoniaka wielokomórkowego linii B (DCLCL) [51].

[3] Powstawanie „agresywnego” fenotypu na drodze innych ścieżek molekularnych

EMT nie wyczerpuje całości zjawisk warunkujących zwiększony potencjał migracji komórek nowotworowych i tworzenia przerzutów. Istnieją raki, które pomimo złośliwego przebiegu nie wykazują utraty ekspresji E-kadheryny ani nie mają w pełni wyrażonego fenotypu mezenchymalnego. Przy zachowanych połączeniach międzykomórkowych, obserwuje się komórkowe formacje naciekowe, składające się z grup lub warstw komórek (ang. *collective invasion*). Istnieją dowody, że wspomniany proces jest realizowany na poziomie molekularnym poprzez aktywność białka podoplaniny [52, 53]. W funkcjonalnej analizie mechanizmów progresji wykazano, że obecność podoplaniny jest wystarczająca dla wytworzenia się inwazyjnego fenotypu, który nie wykazuje cech EMT, charakteryzuje się natomiast: nasilonym powstawaniem filopodiów i polaryzacji komórkowej, nasilonym rozprzestrzenianiem się komórek wzdłuż β -integryn i elementów macierzy międzykomórkowej, ich nasiloną inwazyjnością, głównie poprzez aktywację metaloproteinaz (ang. *metaloproteinases* - *MMPs*). Podobnie, jak w przypadku TAM, zwiększona ekspresja podoplaniny występuje w inwazyjnym froncie nowotworu [54]. Metaloproteinazy wykazują zdolności trawienia elementów błony podstawnej i macierzy międzykomórkowej, co umożliwia łatwiejsze rozprzestrzenianie się komórek nowotworowych w otaczających tkankach. Spośród licznej rodziny tych enzymów do badania włączono metaloproteinazę 9 (MMP9) oraz czynnik związany z aktywacją MMPs - PAI-1 [55, 56]. Innym genem potencjalizującym mobilność komórek raka jest *vil2*; jego produkt – ezryna stanowi fizyczne połączenie pomiędzy błoną komórkową a cytoszkieletem [57]. Białko to jest zaangażowane w reorganizację filamentów cytoszkieletu oraz tworzenie mikrowypustek cytoplazmatycznych ułatwiających ruch komórkom nowotworowym. Możliwe, że za ten efekt odpowiedzialne jest oddziaływanie ezryny z białkami RhoGDI, które blokują aktywność białek Rho [58]. Związanie RhoGDI przez ezrynę wypiera je z kompleksu z białkami Rho, które pozostając w nim są nieaktywne. Uwolnione Rho wiążą się z GTP i zapoczątkowują zmiany w cytoszkielecie predysponujące komórkę do migracji. Ponadto RhoGDI przeciwdziała wiązaniom pomiędzy RhoGTPazami a ich efektorami, takimi jak białka GAP.

Z uwagi na złożoną regulację „potranslacyjną” analiza ekspresji białek Rho na poziomie mRNA wydaje się niecelowa. Bardziej odpowiednia w tym względzie wydaje się ocena ekspresji białek hamujących tą ‘ścieżkę’ molekularną, takich jak ezryna i RhoGDI beta [59]. Analogicznie, celowa wydaje się także ocena aktywatorów tej ścieżki. Ezryna aktywowana jest przez fosforylację, m.in. przez kinazę c-Met. W niniejszym badaniu analizowano ligand dla c-Met - czynnik wzrostu hepatocytów (ang. *hepatocyte growth factor* - HGF) [60]. W pracach dotyczących mięsaków z komórek prążkowanych ekspresja ezryny okazała się warunkiem *sine qua non* powstawania odległych przerzutów [61]. Innym genem, którego ekspresja wyzwała większą zdolność do mobilności komórek nowotworowych jest *ANLN* (ang. *human analogue of aniline*). Jest to ludzki analog białka aniliny u *Drosophila melanogaster*, które wiąże się z filamentami aktyny - istotny podczas cytokinezy oraz prawdopodobnie niezbędny do migracji komórek nowotworowych [62]. Aktywność ANLN jest regulowana przez kluczową dla progresji wielu nowotworów ścieżkę zależną od AKT, zaś wśród jego efektorów jest białko RHOA, jeden z węzłowych elementów regulujących organizację cytoszkieletu. W analizach immunohistochemicznych jądrowa lokalizacja ANLN była związana z gorszym rokowaniem chorych na ndrp [62]. W innym badaniu ekspresji białek w poszczególnych częściach guza wykazano, że w inwazyjnych fragmentach nowotworu warianty składania 3. i 6. receptora CD44 były wykrywane rzadziej niż we fragmentach nienaciekających guza. Z uwagi na silną zależność pomiędzy występowaniem wariantu 3. i 6. do niniejszej analizy włączono tylko jeden transkrypt - dla wariantu 6. CD44.

[4]. Adaptacja do hipoksji i jej molekularne konsekwencje jako czynnik sprzyjający tworzeniu odległych przerzutów

Komórki wzrastającego nowotworu narażone są na stres wynikający z niedotlenienia. Adaptacja do przeżycia w środowisku ubogim w tlen obejmuje wytworzenie mechanizmów obronnych, w tym m.in. tworzenie nowych naczyń krwionośnych. Kluczowym czynnikiem w tym procesie jest aktywność czynnika HIF1 α (ang. *hypoxia inducible factor 1 alfa*), który w wyniku działania hipoksji ulega stabilizacji i uruchamia ekspresję genów wyzwalających metabolizm anaerobowy, angiogenezę oraz naciekanie. Ze względu na liczne modyfikacje

„potranslacyjne” białka HIF1 α , analiza jego ekspresji na poziomie mRNA wydaje się niewłaściwa. Z tego powodu w niniejszym badaniu do analizy wybrano białka efektorowe, których ekspresja jest markerem aktywności „szlaku hipoksyjnego” zależnego od HIF1 α : anhidrazę węglanową 9 (ang. *carbonic anhydrase 9 - CA9*) [63], kinazę fosfoglicerynianową 1 (ang. *phosphoglycerate kinase 1 - PGK1*), śródbłonkowy czynnik wzrostu C (ang. *vascular endothelial growth factor C - VEGF C*) oraz czynnik regulujący aktywność HIF1 α – hydroksylazę prolilową 4 (ang. *prolyl hydroxylase - PH4*). Hydroksylacja HIF1 α przez ten enzym powoduje lizosomalną degradację HIF1 α w warunkach prawidłowego utlenowania (normoksji). Brak tlenu (hipoksja) obniża aktywność reakcji PH-4, co stabilizuje HIF1 α i wyzwala jego czynność transkrypcyjną. Nadekspresja hydroksylazy prolilowej w guzie może być zatem wyrazem adaptacji do hipoksji. Można przypuszczać, że komórki raka utrzymują w ten sposób aktywność HIF1 α na poziomie, przy którym jego aktywność transkrypcyjna jest korzystna dla nowotworu. W jednym z badań opartych na mikromacierzach oligonukleotydowych u chorych na ndrp wykazano niekorzystne rokownicze znaczenie ekspresji *VEGFR3* [64]. Aktywacja tego receptora przez łączenie się z jego ligandem – VEGF-C – powoduje nasilenie angiogenezy i limfangiogenezy [64]. Innym znanym czynnikiem proangiogenym jest interleukina-8 (ang. *interleukine-8 - IL-8*), której znaczenie polega głównie na aktywacji chemotaksji neutrofilii i komórek śródbłonkowych [65]. Ekspresja tych 2 genów była analizowana w badaniu jako potencjalny marker aktywności mechanizmów proangiogennych.

Innym efektem aktywacji transkrypcyjnej HIF1 α jest receptor chemokinowy 4 (ang. *chemokine receptor 4 - CXCR4*). Wykazano, że oddziaływanie pomiędzy CXCR4 i jego ligandem CXCL12 (ang. *chemokine ligand 12*) ułatwia przeżycie komórek raka piersi i raka nerki w ogniskach odległych przerzutów [66].

Pomimo aktywnych mechanizmów tworzenia unaczynienia, sieć naczyń krwionośnych zaopatrująca guz w tlen i substancje odżywcze jest niedoskonała, co dodatkowo nasila powstawanie klonów nowotworowych zaadaptowanych do wzrostu w warunkach hipoksji. Podstawowym źródłem energii dla tych komórek jest beztlenowy metabolizm glukozy. Konsekwencją wykorzystania beztlenowego katabolizmu glukozy jest nie tylko większa odporność na hipoksję, ale również większa tendencja do ekspansji tych klonów. W badaniu

ekspresji genów mikromacierzami oligonukleotydowymi oraz w analizie ekspresji białek wykazano, że wysoka ekspresja kinazy fosfoglicerynianowej 1 (ang. *phosphoglycerate kinase* - *PGK1* - jeden z podstawowych enzymów glikolitycznych) jest związana ze złym rokowaniem chorych na ndrp [67]. Warto wspomnieć, że zjawisko nasilonej glikolizy beztlenowej w obecności tlenu zostało zaobserwowane kilkadziesiąt lat temu przez laureata nagrody Nobla, Otto Warburga [68, 69]. Innym genem potencjalnie istotnym dla progresji chorób nowotworowych jest izomeraza fosfoglukozowa (ang. *phosphoglucose isomerase* - GPI). Oprócz funkcji glikolitycznej, poza cytozolem białko to pełni rolę cytokiny wzmagającej mobilność komórek nowotworowych [70], stąd w piśmiennictwie anglosaskim określa się je także mianem *autocrine motility factor* - AMF. Ponadto wykazano, że wysoka ekspresja *GPI/AMF* promuje zjawisko EMT, a z kolei komórki HT1080 mięsaka MHF transfekowane siRNA hamującym ekspresję *GPI/AMF* zmieniały fenotyp z mezenchymalnego na epitelialny [71].

[5]. Wzrost komórek nowotworowych niezależny od kontaktu z podłożem jako cecha potencjalnie umożliwiająca ich przetrwanie w krążeniu

Zjawisko apoptozy wywołanej przez utratę kontaktu z podłożem nosi nazwę *anoikis*. Istnieją klony komórek nowotworowych, które charakteryzują się opornością na *anoikis*. W badaniach *in vitro* stwierdzono w tych komórkach zwiększoną ekspresję receptorów o typie kinaz tyrozynowych dla neurotrofin (NTRK) [72]. Można zatem zakładać, że nadekspresja tych czynników w komórkach ndrp, umożliwiająca wzrost w zawieszynie bez kontaktu z podłożem i przeżycie w krążeniu, mogłaby się wiązać z większym potencjałem do tworzenia odległych przerzutów. Nazwa TRK (ang. *tropomyosin-related kinase* - *TRK*) odnosi się do budowy onkogenu TrkA (NTRK1), który składa się z 7 lub 8 eksonów tropomiozyny oraz łańcucha przezbłonowego z cytoplazmatyczną resztą kinazową. Pełnią one ważne funkcje w komórkach układu nerwowego, między innymi warunkują proliferację i różnicowanie neuronów, wzrost aksonalny i dendrytyczny, jak również wpływają na *remodelling* i plastyczność komórki poprzez regulację cytoszkieletu. Uważa się, że poza nadmierną aktywacją kinaz receptorów dla neurotrofin, również zwiększona ekspresja genu

S100P wiąże się z opornością komórek nowotworowych na *anoikis*. Białko *S100* należy do rodziny białek wiążących jony wapniowe, opisywanych w patomechanizmach wielu procesów chorobowych, m.in. w nowotworzeniu [73]. W badaniu analizującym rolę *S100P* w raku trzustki wykazano związek pomiędzy jego nadekspresją a zwiększoną proliferacją, migracją i inwazyjnością oraz wydłużonym przeżyciem komórek nowotworu *in vitro* i *in vivo*. Ponadto wykazano, że zaburzenia w obrębie *S100P* były związane z agresywnym przebiegiem gruczolakoraka płuca [74]. W związku z tym *S100P*, jako gen potencjalnie związany z rokowaniem u chorych na raka płaskonabłonkowego został włączony do niniejszej analizy.

[6]. Tworzenie mikroagregatów z komórek nowotworowych, płytek krwi i leukocytów jako istotny element w tworzeniu odległych przerzutów

Na błonie komórkowej krążących płytek krwi i leukocytów obecne są selektyny – białka umożliwiające im zakotwiczenie na śródbłonku tkanek docelowych. Wiele typów komórek nowotworowych, podobnie jak komórki śródbłonka, posiada na swojej powierzchni ligandy dla selektyn. Związanie selektyn z ligandem powoduje powstawanie kongregatów nowotworowo-płytkowych i nowotworowo-leukocytarnych. Takie formacje mogą sprzyjać tworzeniu przerzutów w mechanizmie podobnym jak w przypadku zatorowości płucnej [75]. Komórki guza wykazujące wyższą ekspresję ligandów dla selektyn zgodnie z powyższym założeniem miałyby większy potencjał do przemieszczania się na drodze krwionośnej do odległych miejsc organizmu. W przypadku potwierdzenia klinicznego znaczenia tego zjawiska, istnieje możliwość blokowania interakcji pomiędzy płytkami a komórkami raka poprzez zastosowanie heparyny. Wykazano ostatnio, że heparyna stosowana w profilaktyce żyłnej choroby zatorowo-zakrzepowej przeciwdziała wiązaniu się selektyn obecnych na płytkach z ich ligandami obecnymi na powierzchni komórek raka [76].

Do analizy ekspresji włączono transkrypt ligandu dla selektyny-P oraz dla selektyny-L zakładając, że nasilenie ich ekspresji może być wskaźnikiem nasilenia procesu tworzenia mikrozatorów komórkowych.

Wybierając geny do niniejszej analizy szczególną uwagę zwrócono na

doniesienie porównujące wyniki ekspresji genów z 3 badań mikromacierzowych dotyczących rokowania chorych na ndrp [33]. Wskazano 14 genów, których ekspresja była istotnie związana z przeżyciem całkowitym chorych na ndrp i których współczynniki regresji w analizie Coxa były większe niż 0,3 oraz miały ten sam znak. Obok wspomnianych wyżej *VEGF C*, *selektyny-L* oraz *Rho GDI β*, z tej grupy genów do niniejszej analizy wybrano także gen *Syntaxin1A*. Jego produkt jest białkiem błonowym związanym z transportem amin biogennych w komórkach neuroendokrynych oraz w komórkach drobnokomórkowego raka płuca [77]. Ponadto syntaksyna 1A ulega nadekspresji w bardziej agresywnych formach raka okrężnicy i raka nerki [78]. Opisano także syntaksynę 2 (w 70% homologiczna z syntaksyną 1A), której wysoka ekspresja wiąże się ze zwiększonym potencjałem nowotworowej transformacji w gruczole piersiowym u myszy [79]. Do momentu zamknięcia listy genów wybranych do niniejszej analizy opublikowano jedno badanie zastosowania testu mikromacierzy w celu określenia profilu ekspresji genów związanych z rokowaniem chorych z typem płaskonabłonkowym ndrp [26]. Autorzy wyodrębnili 2 grupy chorych na płaskonabłonkowego raka, których odróżniała odmienna ekspresja 432 genów. Z uwagi na podobne założenie – dążenie do maksymalnego ujednoczenia badanej grupy pod względem typu histologicznego – do niniejszego badania włączono 2 z tych genów: *KIAA0974* i *CD47*. Długi łańcuch RNA oznaczony jako *KIAA0974*, którego sekwencję wyznaczono na podstawie klonowania cDNA w trakcie realizacji *genome project*, koduje hipotetyczne białko o nieznannej funkcji. *CD47* koduje białko błonowe, które zaangażowane jest w mechanizmie regulacji stężenia wapnia cytozolowego w wyniku oddziaływania komórki z elementami podścieliska. Ponadto białko to pełni także funkcję liganda dla receptora fuzji makrofagów (ang. *macrophages fusion receptor - MFR*), który umożliwia im integrację z komórkami nowotworowymi. Uważa się, że to nie w pełni poznane zjawisko może odgrywać istotną rolę w tworzeniu odległych przerzutów [80]. Na przykład dotyczy to hybrydy z komórek czerniaka i makrofagów. W jednym z badań z udziałem chorych na ndrp, w którym analizowano ekspresję receptorowych kinaz błonowych za pomocą RT-PCR, czynnikiem najsilniej związanym z wyższym ryzykiem wystąpienia odległych przerzutów był receptor dla insuliny (ang. *insulin receptor - INSR*). Zwiększona ekspresja tego genu w ndrp wiązała się z 7-krotnym wzrostem ryzyka odległego

rozszewu w grupie chorych w I i II stopniu zaawansowania [81].

Receptor dla insuliny, odgrywa istotną rolę w ko-aktywacji receptora dla insulinopodobnych czynników wzrostu I i II (ang. *insulin-like growth factor 1 and 2* - IGF-1 i IGF-2). Wydaje się zatem, że grupa receptorów kinazowych dla insuliny i insulinopodobnych czynników wzrostu może odgrywać istotną rolę w kancerogenezie i progresji nowotworów epithelialnych [82].

2. Cel naukowy

Celem niniejszej pracy jest ocena zależności pomiędzy ekspresją genów oznaczoną metodą ilościowej RT-PCR w obrębie pierwotnego guza a indywidualnym ryzykiem rozszewu choroby u chorych poddanych resekcji mięszu płucnego z powodu płaskonabłonkowego raka płuca.

2.1. Cele szczegółowe

1. Ocena czy istnieje gen lub grupa genów, których charakterystyczny profil ekspresji wiąże się z przeżyciem wolnym od odległego nawrotu u chorych na płaskonabłonkowego raka płuca
2. Ocena czy występują zależności pomiędzy ekspresją poszczególnych analizowanych genów
3. Weryfikacja uzyskanych wyników w niezależnej grupie chorych na płaskonabłonkowego raka płuca.

3. Uzasadnienie podjęcia badań

Założeniem badania jest określenie molekularnego testu opartego na analizie ekspresji wybranych genów, który umożliwiłby określenie indywidualnego ryzyka rozsiewu nowotworu po radykalnym leczeniu operacyjnym płaskonabłonkowego raka płuca. Potencjalnym klinicznym aspektem tej wiedzy byłoby wyodrębnienie chorych o wysokim ryzyku nawrotu, u których istnieją wskazania do pooperacyjnej chemioterapii. W efekcie mogłoby to prowadzić do poprawy wyników leczenia. Z drugiej strony wyodrębnienie chorych o niskim ryzyku nawrotu, nie wymagających uzupełniającej chemioterapii pozwoliłoby na zmniejszenie toksyczności leczenia i obniżenie jego kosztów. Podsumowując uzasadnieniem dla podjęcia opisanych badań jest brak wiarygodnego testu pozwalającego określić ryzyko niepowodzenia u chorych na ndrp po doszczętnym leczeniu operacyjnym.

4. Materiał i Metody

4.1 Geny włączone do analizy

Przedmiotem analizy była ekspresja 29 genów potencjalnie związanych z progresją ndrp i tworzeniem przez ten nowotwór odległych przerzutów. Geny te wybrano na podstawie wyników wstępnej oceny ich ekspresji z użyciem macierzy oligonukleotydowych i danych z piśmiennictwa.

Tabela 4.1. Geny analizowane w badaniu

<i>Gene accession numer</i> (transkrypt mRNA)	Nazwa genu (ang.), skrót (ang.)	Numer referencyjny zestawu (primery + sonda) Appliedbiosystems
NM_000175.2	Glucose phosphate isomerase, GPI	Hs00164752_m1
NM_198793.2 NM_001025079.1 NM_001025080.1 NM_001777.3	CD47 antigen (Rh-related antigen, integrin-associated signal transducer), CD47	Hs00179953_m1
NM_198389.2 NM_006474.4	Podoplanin, PDPN	Hs00366764_m1
NM_000584.2	Interleukin 8, Il-8	Hs00174103_m1
NM_005228.3	Epidermal growth factor receptor, (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian), EGFR	Hs00193306_m1
BC015394.1	KIAA0974	Hs00612227_m1
NM_018685.2	human analogue of aniline (actin binding protein, Drosophila scraps homolog), ANLN	Hs00218803_m1
NM_000208.1	Insulin receptor, INSR	Hs00169631_m1
NM_000291.2	Phosphoglycerate kinase 1, PGK1	Hs99999906_m1
NM_003467.2	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4, CXCR4	Hs00237052_m1
NM_001175.4	Rho GDP dissociation inhibitor beta, Rho GDI β	Hs00171288_m1
NM_172210.1, NM_172211.1, NM_172212.1, NM_000757.3	Macrophage colony stimulating factor 1, CSF1	Hs00174164_m1
NM_004994.1	Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, type IV collagenase), MMP9	Hs00234579_m1
NM_000474.3	Twist homolog 1 (acrocephalosyndactyly 3; Saethre-Chotzen syndrome), Twist1	Hs00361186_m1
NM_001792.2	N-cadherin (cadherin 2, type 1), N-cadherin	Hs00169953_m1
NM_017732.3, NM_177939.2, NM_177938.2	Hypoxia-inducible factor prolyl 4-hydroxylase, PH-4	Hs00214665_m1
NM_001007792.1, NM_001012331.1, NM_002529.3	Neurotrophic tyrosine kinase receptor type 1 NTRK1	Hs00176787_m1

NM_001007097.1, NM_001018064.1, NM_001018065.1, NM_001018066.1, NM_006180.3	Neurotrophic tyrosine kinase, receptor type 2 NTRK2	Hs00178811_m1
NM_005429.2	Vascular endothelial growth factor C, VEGFC	Hs00153458_m1
NM_001216.1	Carbonic anhydrase 9, CA9	Hs00154208_m1
NM_005980.2	Calcium binding protein P, S100P	Hs00195584_m1
NM_001001389.1 NM_000610.3	CD44 antigen (homing function and Indian blood group system), CD44	Hs00153310_m1
NM_003379.3	Ezrin, Vil2	Hs00185574_m1
NM_212474.1, NM_212475.1, NM_212476.1, NM_212478.1, NM_212482.1, NM_002026.2, NM_054034.2	Fibronectin 1, FN1	Hs00365052_m1
NM_000602.1	Serpin1 (Nexin, Plasminogen Activator Inhibitor type 1), PAI-1	Hs00167155_m1
NM_003006.3	Selectin P ligand , SELPG	Hs00356602_m1
NM_000655.2	Selectin L (lymphocyte adhesion molecule 1), SELL	Hs00174151_m1
NM_004603.1	Syntaxin 1A (brain), STX1A	Hs00270282_m1
NM_001010931.1, NM_001010933.1, NM_001010934.1, NM_001010932.1, NM_000601.4	Hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor), HGF	Hs00300159_m1

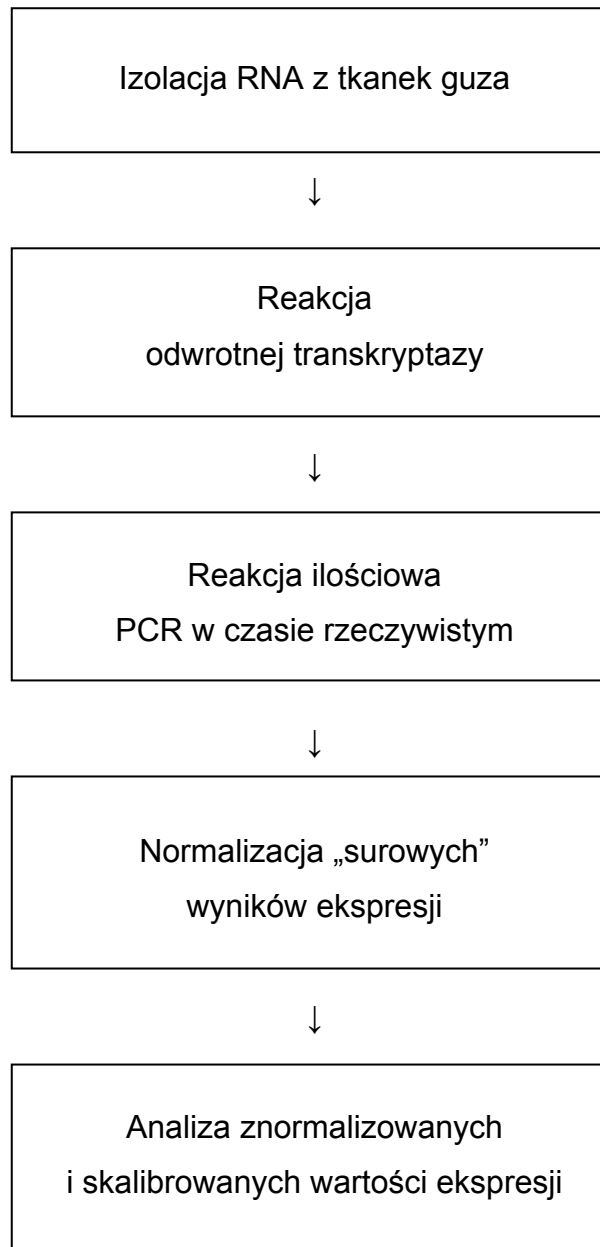
4.2. Ocena ekspresji genów

Ekspresję genów analizowano na „poziomie” transkrypcji, oceniając liczbę kopii mRNA przy zastosowaniu reakcji odwrotnej transkryptazy i reakcji łańcuchowej polimerazy (RT-PCR, ang. *reverse transcriptase--polymerase chain reaction*). Technika RT-PCR, składa się z dwu etapów: [1] reakcji odwrotnej transkryptazy (ang. *reverse transcriptase*), która poprzedza [2] łańcuchową reakcję polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*). W reakcji odwrotnej transkryptazy zachodzi synteza jednoniciowego łańcucha DNA komplementarnego wobec RNA (cDNA, ang. *complementary deoxynucleic acid*). Przebieg reakcji rejestruje się w czasie jej trwania (ang. *real-time* - w „czasie rzeczywistym”). Określenie „w czasie rzeczywistym” odnosi się do istoty metody – stałe rejestrowanie przyrostu produktu PCR pozwala na oszacowanie wyjściowej liczby transkryptu mRNA. Monitorowanie przyrostu ilości amplikonu jest możliwe poprzez rejestrację sygnału fluorescencyjnego emitowanego w czasie

reakcji polimerazy, którego moc jest wprost proporcjonalna do liczby kopii amplikonu. Sygnał fluorescencyjny jest generowany przez swoiste sondy łączące się amplikonami lub przez substancję fluorescencyjną nieswoiście wiążącą się z dwuniciowym DNA. Kluczową rolę w tej technice odgrywa tak zwany cykl Ct (ang. *threshold cycle*) czyli cykl PCR, po którym w mieszaninie reakcyjnej ilość amplikonu umożliwia detekcję sygnału fluorescencyjnego. Od tego momentu następuje faza geometrycznego przyrostu intensywności fluorescencji. Przy czym większa początkowa ilość transkryptu mRNA wymaga mniejszej liczby cykli PCR dla pojawienia się sygnału fluorescencyjnego. Zatem im niższa jest wartość Ct, tym większa początkowa ilość analizowanego transkryptu. Ct jest wyznaczany względnie wcześnie w czasie postępu reakcji, nie jest zatem zależny od zużycia odczynników reakcyjnych, co warunkuje wysoką dokładność metody.

W porównaniu z innymi technikami oceny nasilenia ekspresji genów reakcja RT-PCR charakteryzuje się względnie wysoką czułością. Wykazano, że można wykryć jedną kopię mRNA wśród całkowitego RNA wyizolowanego z około 5000 komórek (1 mRNA w 10 ng całkowitego RNA) [83]. Daje to możliwość prowadzenia reakcji RT-PCR w systemach wysokiej wydajności. Jednym z nich jest system kart mikrocieczowych (ang. *microfluidic cards* lub TLDA – TaqMan *Low Density Arrays*, firmy Appliedbiosystems) umożliwiający jednoczesne prowadzenie 384 reakcji ilościowej RT-PCR. Dzięki zastosowaniu tego systemu możliwe jest zmniejszenie błędu systematycznego (błąd pipety) oraz kosztów i czasochłonności badania.

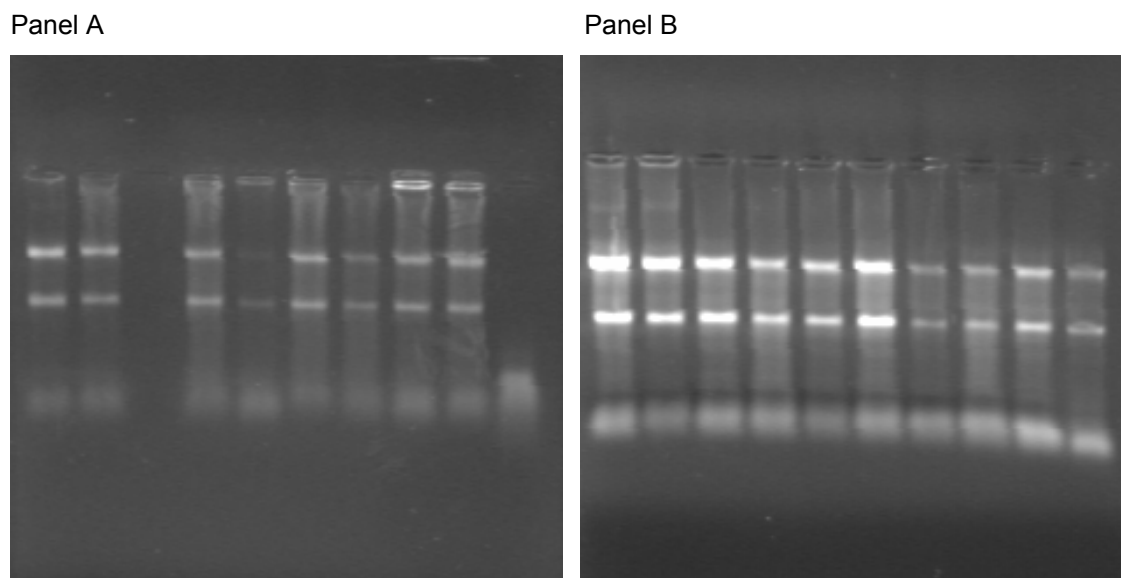
Rycina 4.3.1. Etapy badania ekspresji genów metodą ilościowej RT-PCR.



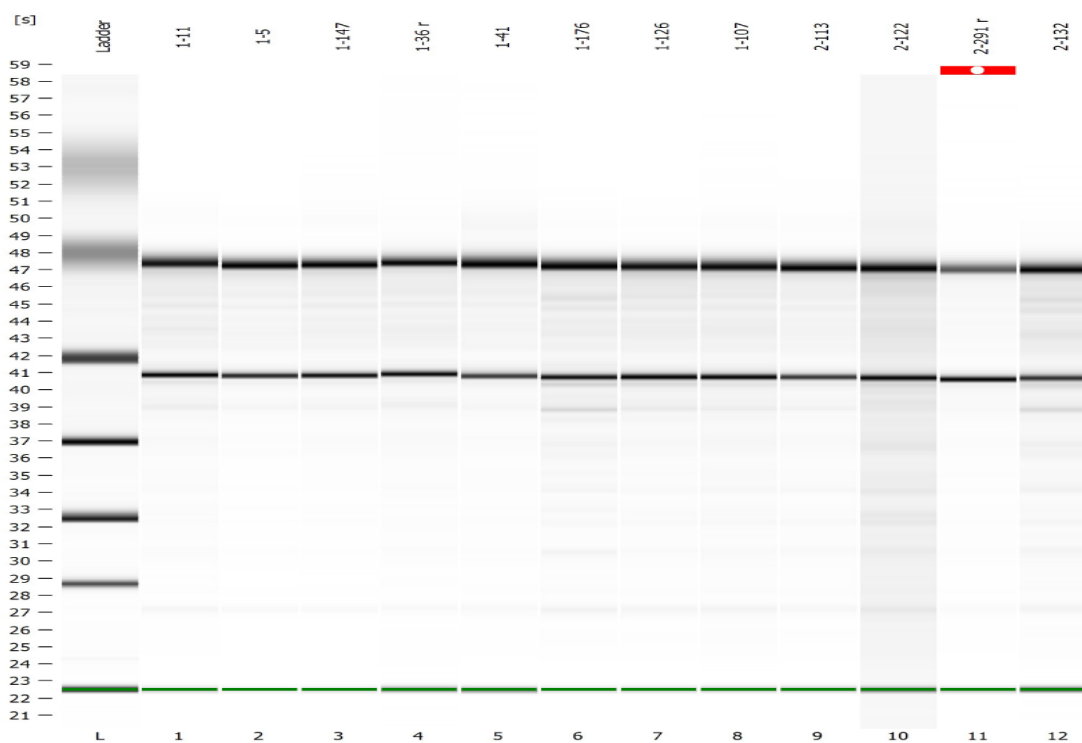
4.3 Przygotowanie wycinków z guzów raka płuca oraz izolacja całkowitego RNA

Materiał do analizy stanowiły wycinki raka płaskonabłonkowego płuca (o objętości około 1cm³) pobrane bezpośrednio po usunięciu guza i zamrożone w ciekłym azocie i przechowywane w temperaturze -80°C (ryc 4.3.1). Do izolacji RNA wykorzystywano 20 skrawków nowotworu, każdy o grubości 20 mikronów (ciętych w kriotomie), które zawieszano w buforze lizującym materiał tkankowy i inaktywującym RNAzy – bufor RLT™ (Qiagen). Pierwszy i ostatni skrawek nowotworu (grubości 5 mikronów) wybarwiano hematoksyliną i eozyną w celu oceny przez patologa zawartości komórek nowotworowych, martwicy, domieszek tkanki włóknistej, prawidłowego miąższu płucnego lub nacieku zapalnego w badanym wycinku. RNA izolowano, jeśli tkanki nowotworowej obejmowała przynajmniej 60% przekroju preparatu histopatologicznego. Stosowano zestawy do jednoczesnej izolacji DNA i RNA – AllPrep (Qiagen). Przy użyciu wyżej wspomnianych zestawów możliwa jest izolacja łańcuchów RNA o długości od 200 nukleotydów. Zapewnia to uzyskanie puli RNA wzbogaconej o długołańcuchowe cząstki mRNA i sRNA; jednocześnie eliminowane są krótkie łańcuchy RNA (np. mikroRNA, nukleolarne RNA czy tRNA). Ustalono eksperymentalnie, że zanieczyszczenie genomowym DNA w próbkach RNA uzyskanych tą metodą jest rzędu 1:1.000.000. Stężenie RNA w każdej próbce określano przy użyciu technologii Nano-Drop. Pomiaru stężenia dokonywano w trzech powtórzeniach. Jakość RNA potwierdzano na żelu agarozowym (ryc. 4.3.2) oraz w *Bioanalyzerze* (Agilent) - wartości RIN zawierały się w zakresie 6,6-9,8 (ryc. 4.3.3). Próbki RNA poza temperaturą przechowywania -80°C były utrzymywane w temperaturze bliskiej 0°C (poza amrażarką próbki zawsze znajdowały się na lodzie w celu zminimalizowania ryzyka degradacji RNA).

Rycina 4.3.2 Zdjęcie żeli agarozowych z rozdziału elektroforetycznego uzyskanego RNA. Ostatnia próbka z panelu A zawiera całkowicie zdegradowany RNA.



Rycina 4.3.3 Wyniki rozdziału elektroforetycznego uzyskanego RNA w aparacie Bioanalyzer (Agilent) dla 12 kolejnych próbek RNA.



4.4 Reakcja odwrotnej transkryptazy

W reakcji odwrotnej transkryptazy z użyciem *High Capacity Reverse Transcriptase* KIT (AppliedBiosystems) syntetyzowano cDNA z 1 µg RNA, w składzie którego znajduje się enzym *Multiscribe* (AppliedBiosystems). Reakcję prowadzono w objętości 20 µl jednocześnie dla wszystkich próbek analizowanych w badaniu, zgodnie z następującymi warunkami (tabela 4.4.1):

Tabela 4.4.1. Warunki reakcji odwrotnej transkryptazy

	Pierwszy etap	Drugi etap	Trzeci etap	Czwarty etap
Temperatura	25°C	37°C	85°C	4°C
Czas	10 min	120 min	5 min	∞

W skład mieszaniny reakcyjnej wchodziły następujące składniki w proporcji zalecanej przez producenta (tabela 4.4.2).

Tabela 4.4.2. Skład mieszaniny reakcyjnej reakcji odwrotnej transkryptazy

Składnik	Objętość (µl) w jednej reakcji
10 X Buffet	2,0
25 X dNTP Mix (100mM)	0,8
10 X RT random primery	2,0
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1,0
RNase Inhibitor	1,0
Woda wolna od RNAz	3,2
badane RNA	10,0
Suma	20,0

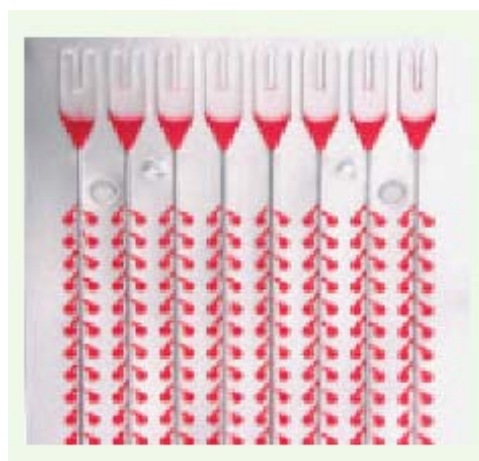
W reakcji stosowano primery randomowe (ang. *random primers*), które zapoczątkowują reakcję RT w dowolnym miejscu wzdłuż łańcucha mRNA.

4.5 Ekspresja genów oznaczona za pomocą reakcji ilościowej *real time* RT-PCR w systemie kart mikrocieczowych (TLDA).

Karty mikrocieczowe to system dołków reakcyjnych umożliwiający jednoczesne prowadzenie 384 reakcji RT-PCR (ryc. 4.5.1). W niniejszym badaniu stosowano układ TLDA, w którym była możliwa ocena ekspresji 32 genów (reakcje w trzech powtórzeniach) jednocześnie dla ośmiu próbek. Karty mikrocieczowe zawierają liofilizowane primery i sondy na płytce, pogrupowane w ośmiu identycznych sektorach (ryc 4.5.2). Do każdego z tych sektorów wprowadzono mieszaninę reakcyjną zoptymalizowaną do prowadzenia reakcji ilościowej PCR (skład: (i) produkt reakcji odwrotnej transkryptazy (55 μ l cDNA odpowiadającego 100 ng RNA) oraz (ii) 55 μ l odczynnika TaqMan Universal PCR Master Mix® (Appliedbiosystems)). TaqMan Universal PCR Master Mix zawiera (polimerazę AmpliTaq Gold®, AmpEraseUNG®, dNTP zawierające dUTP, substancję zapewniającą tło fluorescencji (ang. *passive reference*) oraz bufor zoptymalizowane dla prowadzenia PCR). AmpErase® jest enzymem, którego aktywność przeciwdziała zanieczyszczeniom próbek DNA pochodzącym z poprzednich reakcji PCR.



A.



B.

Rycina 4.5.1 Obraz płytki mikrocieczowej TLDA. A) wprowadzono mieszaninę reakcyjną do pierwszego portu dla pierwszego sektora płytki. B) Płytką TLDA, do której wprowadzono 8 mieszanin reakcyjnych. W wyniku wirowania mieszanina reakcyjna dostaje się do dołków reakcyjnych.

Format 32 (31 unique assays + 1 control)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	Port
A	1	1	1	2	2	2	3	3	3	CTL	CTL	CTL	4	4	4	5	5	5	6	6	6	7	7	7	1
B	8	8	8	9	9	9	10	10	10	11	11	11	12	12	12	13	13	13	14	14	14	15	15	15	
C	16	16	16	17	17	17	18	18	18	19	19	19	20	20	20	21	21	21	22	22	22	23	23	23	2
D	24	24	24	25	25	25	26	26	26	27	27	27	28	28	28	29	29	29	30	30	30	31	31	31	
E	1	1	1	2	2	2	3	3	3	CTL	CTL	CTL	4	4	4	5	5	5	6	6	6	7	7	7	3
F	8	8	8	9	9	9	10	10	10	11	11	11	12	12	12	13	13	13	14	14	14	15	15	15	
G	16	16	16	17	17	17	18	18	18	19	19	19	20	20	20	21	21	21	22	22	22	23	23	23	4
H	24	24	24	25	25	25	26	26	26	27	27	27	28	28	28	29	29	29	30	30	30	31	31	31	
I	1	1	1	2	2	2	3	3	3	CTL	CTL	CTL	4	4	4	5	5	5	6	6	6	7	7	7	5
J	8	8	8	9	9	9	10	10	10	11	11	11	12	12	12	13	13	13	14	14	14	15	15	15	
K	16	16	16	17	17	17	18	18	18	19	19	19	20	20	20	21	21	21	22	22	22	23	23	23	6
L	24	24	24	25	25	25	26	26	26	27	27	27	28	28	28	29	29	29	30	30	30	31	31	31	
M	1	1	1	2	2	2	3	3	3	CTL	CTL	CTL	4	4	4	5	5	5	6	6	6	7	7	7	7
N	8	8	8	9	9	9	10	10	10	11	11	11	12	12	12	13	13	13	14	14	14	15	15	15	
O	16	16	16	17	17	17	18	18	18	19	19	19	20	20	20	21	21	21	22	22	22	23	23	23	8
P	24	24	24	25	25	25	26	26	26	27	27	27	28	28	28	29	29	29	30	30	30	31	31	31	

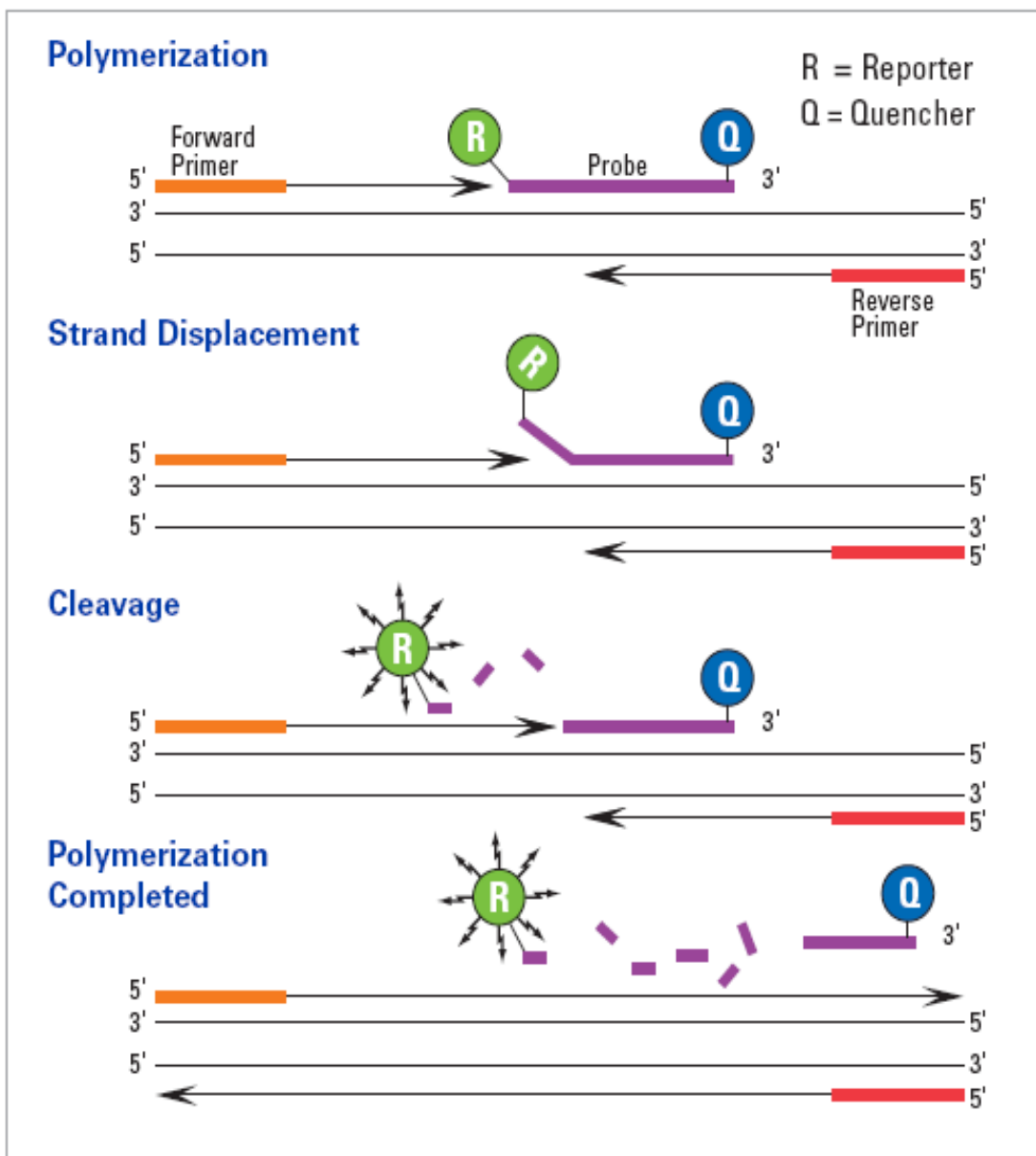
Rycina 4.5.2 Schemat płytki mikrocieczowej TLDA - rozmieszczenie zestawów do amplifikacji (primery i sondy). Osiem identycznych zestawów (sektorów) 32 genów (każdy w trzech powtórzeniach).

Karty mikrocieczowe (ryc. 4.5.1), do których wprowadzono mieszaninę reakcyjną: cDNA z TaqMan Universal PCR Master Mix, są następnie dwukrotnie wirowane w temperaturze pokojowej z prędkością 1200 rpm przez 1 minutę w wirówce (Sorvall™ Legend). Kolejno dołki reakcyjne wypełnione mieszaniną reakcyjną są zasklepiane w urządzeniu Sealer (Appliedbiosystems); porty odcinane są od karty przy użyciu nożyczek. Tak przygotowana karta mikrocieczowe TLDA jest gotowa do prowadzenia reakcji ilościowej PCR w cyklerze.

Reakcje ilościowej PCR w czasie rzeczywistym (ryc. 4.5.3) prowadzono zgodnie z poniższymi warunkami reakcji: aktywacja AmpErase UNG, aktywacja polimerazy AmpliTaq Gold oraz 40 cykli PCR (Tabela 4.5.1):

Aktywacja AmpErase UNG	Aktywacja polimerazy AmpliTaq Gold	Każdy z 40 cykli	
		Denaturacja dwuniciowego cDNA	Przyłączenie primerów/ wydłużanie
50°C 2 min	94,5°C 10 min	97°C 30 sekund	59,7°C 1 min

Tabela. 4.5.1 Warunki reakcji ilościowej RT-PCR



Rycina 4.5.3 Schemat reakcji ilościowej PCR. **Polimeryzacja** (ang. *polimerization*): aktywność polimerazy AmpliTaq Gold® (AppliedBiosystems) – synteza nowej nici komplementarnej do transkryptu cDNA – reakcja zapoczątkowana przez przyłączenie swoistych primerów. Do transkryptu swoiście przyłącza się odpowiednia sonda (ang. *probe*). Sonda ta zawiera element fluorescencyjny R (ang. *reporter*) oraz element „wygaszający fluorescencję” Q (ang. *quencher*). Sonda sphybrydyzowana z ampikonem nie emituje fluorescencji. „**Odhybrydyzowanie**” sondy (ang. *strand replacement*) następuje pod wpływem polimerazy, która posiada aktywność nukleazy 5'→3'. Polimeraza, postępując wzdłuż nici cDNA, w momencie zetknięcia z sondą „trawi” ją – następuje zatem **trawienie sondy** (ang. *cleavage*). W konsekwencji strawienia sondy uwalniane są elementy R i Q. Uwolniony element R emituje sygnał fluorescencyjny, który jest rejestrowany przez czytnik cyklera HT 7900 (AppliedBiosystems). Kolejno następuje dalsza polimeryzacja i **zakończenie syntezy** nici cDNA (ang. *polimerization completed*).

Zestawy do amplifikacji cDNA (primery i sonda) zostały tak zaprojektowane, aby amplifikowany produkt obejmował sekwencje sąsiadujących ze sobą eksonów badanego genu. Taki sposób projektowania primerów i sond zapewnia najwyższą swoistość amplifikacji wobec cDNA uzyskanego z mRNA w reakcji odwrotnej transkryptazy.

4.6 Normalizacja wartości ekspresji

Surowe wartości ekspresji genów są wyrażone jako wartości Ct (ang. *threshold cycle* – cykl progowy) i w celu porównania ich z innymi próbkami wymagają normalizacji. Wartości Ct dla genów badanych są dla każdej próbki odnoszone do wartości Ct dla genów normalizacyjnych. W ten sposób otrzymywana jest względna wartość ekspresji dla próbki. Celem normalizacji jest korekta wartości ekspresji o błąd wynikający z niewielkich różnic związanych z błędem pipety przy dodawaniu RNA do reakcji odwrotnej transkryptazy i przy czynnościach związanych z przygotowaniem ilościowej PCR. Do normalizacji wykorzystuje się tzw. geny *house-holding*, takie jak: *GAPDH* lub geny strukturalne (np. podjednostka *18S rRNA* lub β -aktyna). W niniejszym badaniu w charakterze genu normalizacyjnego wykorzystano transkrypt dla podjednostki 18S rybosomalnego strukturalnego RNA.

Ostatecznie ekspresję genów wyrażono w formie względnej, wyznaczonej względem próbki kalibrującej cały eksperyment (kalibrator), zgodnie ze wzorem:

$$\text{Ekspresja genu badanego} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

gdzie, $-\Delta\Delta Ct = -(\Delta Ct_q - \Delta Ct_{cb})$

q – próbka badana

cb – próbka kalibrująca

$\Delta Ct = (Ct_{\text{gen badany}} - Ct_{\text{gen normalizacyjny}})$

Dla pierwszego etapu badań (populacja ucząca), próbką kalibrującą była mieszanina tej samej ilości RNA ze wszystkich próbek wykorzystywanych w badaniu. W drugim etapie (populacja walidacyjna) wartości ekspresji kalibrowano względem dostępnej komercyjnie próbki RNA, będącej mieszaniną

RNA wyizolowanego z 10 linii komórkowych wyprowadzonych z ludzkich nowotworów – Universal Human Reference RNA™ (Stratagen).

Zastosowanie metody $2^{-\Delta\Delta Ct}$ jest możliwe przy założeniu identycznej efektywności reakcji PCR dla genu badanego oraz genu normalizacyjnego. Wykazano, że wszystkie stosowane w badaniu zestawy starterów i sond charakteryzują się 100% efektywnością amplifikacji [84]. Metoda ta oraz jej założenia wraz z matematycznym wyprowadzeniem wzoru zostały szczegółowo opisane wcześniej [85].

W pierwszym etapie badań (66 chorych na raka płaskonabłonkowego – populacja *ucząca*) analizowano ekspresję 29 genów. W drugim etapie (populacja *walidacyjna*) – badano ekspresję 9 genów, które miały najwyższą wartość rokowniczą w populacji *uczącej*.

4.7. Charakterystyka badanej grupy chorych

Z uwagi na potencjalny wpływ na ekspresję genów różnic w strukturze tkankowej poszczególnych typów histologicznych ndrp, badaniem objęto wyłącznie chorych z rozpoznaniem typu płaskonabłonkowego ndrp.

1. Populacja *ucząca* - 66 chorych
2. Populacja *walidacyjna* - 27 chorych

Określono następujące kryteria włączenia do badania:

1. Doszczętna resekcja guza i limfadenektomia węzłów śródpiersiowych
2. Dostępność wycinka z zamrożonej tkanki nowotworu (przynajmniej 60% tkanki nowotworowej na przekroju z wycinka guza)
3. Przynajmniej 3-letnia obserwacja w przypadku chorych, u których nie stwierdzono wznowy choroby
4. Niestosowanie pooperacyjnej chemioterapii

Populacja *ucząca* utworzona w celu określenia rokowniczego profilu ekspresji genów obejmowała 66 chorych na raka płaskonabłonkowego w stopniu zaawansowania I-IIIa leczonych chirurgicznie latach 2000 – 2004 w Klinice Chirurgii Klatki Piersiowej Akademii Medycznej w Gdańsku (obecnie Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku). U 33 chorych rozwinęły się przerzuty odległe po doszczętnej resekcji guza, a u pozostałych 33 w ciągu 3 lat nie stwierdzono nawrotu choroby. Mediana czasu obserwacji w grupie bez nawrotu wynosiła 61 miesięcy (zakres 42-78 miesięcy) (tab. 4.7.1). Średnicę pierwotnego guza mniejszą niż 4 cm stwierdzono u 27 chorych; a równą lub większą niż 4cm - u 39 chorych.

Tabela 4.7.1 Kliniczna charakterystyka chorych z populacji *uczącej*.

Zmienna	Grupa chorych ze wznową odległą N=33	Grupa chorych bez nawrotu N=33	Obie grupy chorych N=66
Wiek (lata) średnia/zakres	61 (37-75)	63 (48-76)	63 (37-76)
Płeć			
Kobiety	4 (12 %)	10 (30 %)	14 (21 %)
Mężczyźni	29 (88 %)	23 (70 %)	52 (79 %)
Stopień zaawansowania			
IA	3 (9 %)	7 (21 %)	10 (15 %)
IB	16 (48 %)	16 (48 %)	32 (49 %)
IIB	14 (42 %)	8 (24 %)	22 (33 %)
IIIA	0 (0 %)	2 (6 %)	2 (3 %)
Zróżnicowanie histologiczne			
G1	3 (9 %)	4 (12 %)	7 (11 %)
G2	21 (63 %)	24 (72 %)	45 (68 %)
G3	9 (26 %)	5 (16 %)	14 (21 %)

Populacja *walidacyjna* utworzona w celu potwierdzenia rokowniczego znaczenia wybranego profilu ekspresji genów obejmowała 27 chorych na płaskonabłonkowego raka płuca w I i II stopniu zaawansowania poddanych doszczętnej resekcji płucnej w Szpitalu Uniwersyteckim w Madrycie (12

chorych); w Klinice Chirurgii Klatki Piersiowej Akademii Medycznej w Gdańsku (obecnie Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku) (6 chorych) oraz w Klinice Chirurgii Klatki Piersiowej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (9 chorych) (tab. 4.7.2).

Tabela 4.7.2 Kliniczna charakterystyka chorych z populacji *walidacyjnej*.

Zmienna	Grupa walidacyjna N=27	Grupa walidacyjna chorzy bez wznowy choroby N=12	Grupa walidacyjna chorzy ze wznową choroby N=15
Wiek (lata) (średnia/zakres)	63,8 (45-79)	67,7 (48-79)	60,6 (45-79)
Płeć Kobiety Mężczyźni	2 (7,4%) 25 (92,6%)	1 (8,3%) 11 (91,7%)	1 (6,7%) 14 (93,3%)
Stopień zaawansowania			
IA	1 (3,7%)	1 (8,3%)	0 (0%)
IB	18 (66,7%)	10 (83,3%)	8 (53,3%)
IIA	1 (3,7%)	0 (0%)	1 (6,7%)
IIB	7 (25,9%)	1 (8,3%)	6 (40%)
Zróżnicowanie histologiczne			
G1	5 (18,5%)	2 (16,7%)	3 (20%)
G2	10 (37%)	6 (50%)	4 (26,7%)
G3	12 (44,5%)	4 (33,3%)	8 (53,3%)

4.8. Statystyczna analiza danych

Głównym celem badania było opracowanie profilu ekspresji genów związanego z wysokim ryzykiem odległego nawrotu i niekorzystnym rokowaniem chorych na płaskonabłonkowego raka płuca. Do tego celu przeprowadzono analizy w dwu niezależnych grupach chorych. W grupie *uczącej* określono indeks ryzyka nawrotu, którego kliniczną wartość zweryfikowano następnie w niezależnej grupie *walidacyjnej*.

W populacji *uczącej* przeprowadzono analizy przeżycia wolnego od wystąpienia odległego nawrotu (ang. *metastasis free survival* - MFS) w zależności od wartości ekspresji wszystkich analizowanych genów wyrażonych jako zmienna ciągła oraz jako zmienna kategoryzowana wobec mediany w modelu jednoczynnikowym Coxa. Kategoryzację przeprowadzono w dwojaki sposób. W pierwszym przypadku ekspresja genu była kodowana jako „0” (dla wartości

poniżej wartości mediany ekspresji) lub „1” (wartości powyżej mediany ekspresji). Drugim sposobem kategoryzacji wyników był podział wartości ekspresji względem wartości kwartyli ekspresji:

„0” – poniżej najniższego kwartyla ekspresji

„1” – wartości ekspresji większe od 1 kwartyla i mniejsze od mediany ekspresji

„2” – wartości większe od mediany, lecz mniejsze od 3 kwartyla ekspresji

„3” – wartości ekspresji większe niż 3 kwartył ekspresji

Analizę czasu przeżycia wolnego od nawrotu odległego w zależności od ekspresji kategoryzowanej według kwartyli przeprowadzono dla genów znamienych w dwu pierwszych analizach. Dla oceny znamienności związku pomiędzy ekspresją genów a czasem przeżycia wolnego od nawrotu odległego zastosowano test log-rank. Dla wykreślenia krzywych przeżycia dla grup kategoryzowanych w zależności od ekspresji genów stosowano metodę Kaplana-Meiera. Za zdarzenie kompletne uznawano wystąpienie przerzutów odległych (jak wspomniano wcześniej nie brano pod uwagę chorych, u których doszło jedynie do izolowanego nawrotu miejscowego). Datę ostatniej wizyty lekarskiej, w czasie której na podstawie badania podmiotowego i przedmiotowego, badań obrazowych, a w razie potrzeby bronchoskopii i/lub badań bardziej inwazyjnych stwierdzono odległy nawrót choroby, przyjmowano jako datę zakończonej kompletnej obserwacji.

Ponadto w populacji *uczącej* przeprowadzono analizę związku pomiędzy wystąpieniem przerzutów odległych w zależności od wartości ekspresji. Wykorzystano do tego celu nieparametryczny test Manna-Whitneya.

Modele rokownicze

1. Pierwszy model rokowniczy – *optymalny*

Geny, których ekspresja wykazywała najsilniejszy związek z rokowaniem chorych w analizach przeżycia wolnego od nawrotu odległego ($p < 0,02$) zostały włączone do analizy wieloczynnikowej (model regresji liniowej Coxa). Wzięto pod uwagę najlepsze wyniki zarówno dla analiz ekspresji jako zmienna ciągła,

jak i zmienna kategoryzowana. Współczynniki β z równania regresji stanowiły podstawę obliczenia tzw. indeksu ryzyka nawrotu (ang. *risk score* RS). Indeks ryzyka nawrotu jest równaniem wyliczającym wartość odpowiadającą szacowanemu ryzyku wystąpienia nawrotu odległego po doszczętnej resekcji raka płuca i ryzyka zgonu z tego powodu. Równanie to jest swojego rodzaju średnią ważoną rokowniczego wpływu wartości ekspresji każdego z genów i przyjmuje następującą postać ogólną:

$$RS = [\text{wsp. } \beta_{\text{genA}} * \{\text{ekspresja genu A}\}] + [\text{wsp. } \beta_{\text{gen B}} * \{\text{ekspresja genu B}\}] + \dots \\ + [\text{wsp. } \beta_{\text{gen N}} * \{\text{ekspresja genu N}\}] \dots$$

wsp. β_{gen} - współczynnik regresji z modelu wieloczynnikowego dla danego genu
ekspresja genu X – znormalizowana wartość ekspresji wg transformacji z-score

W grupie *uczącej* porównano przeżycie wolne od nawrotu pomiędzy podgrupami z niskim i wysokim wskaźnikiem ryzyka nawrotu (poniżej i powyżej mediany wartości RS) przy zastosowaniu testu log-rank oraz wygenerowano odpowiednie krzywe przeżycia metodą Kaplana-Meiera. Ten indeks ryzyka następnie testowano przy zastosowaniu tej samej procedury w grupie *testującej*.

Drugi model rokowniczy - *opcjonalny*

Poza modelem „optymalnym”, opartym na ekspresji najbardziej znamiennych genów, podjęto próbę utworzenia modelu rokowniczego z uwzględnieniem genów o jednoczynnikowej znamienności większej niż $p=0.02$, ale interesujących z powodu biologicznej funkcji pełnionej w komórce (model 2). Model ten oparto wyłącznie na wartościach ekspresji genów przedstawionych jako zmienna ciągła. Zastosowano procedurę generowania i weryfikacji tego modelu analogiczną jak w przypadku modelu 1.

Trzeci model rokowniczy - *redukowany*

Geny wchodzące w skład dwu poprzednich modeli zostały wykorzystane kolejno do tworzenia trzeciego modelu z zastosowaniem metody regresji krokowej. Metoda ta zakłada etapową eliminację genów o najniższej znamienności statystycznej z modelu wieloczynnikowego Coxa, w celu otrzymania optymalnego zestawu. W pierwszym etapie regresji krokowej analizowano 12 genów z modelu 1. i 2. Dążono do utworzenia modelu o wysokiej mocy rokowniczej przy najmniejszej liczbie genów.

Modele rokownicze pozytywnie zweryfikowane w niezależnej grupie *testującej* zostały kolejno włączone do analiz wieloczynnikowych czasu wolnego od odległego nawrotu (model wieloczynnikowy Coxa), w których jednocześnie analizowano cechy kliniczne, takie jak: stopień zaawansowania (I vs II), zróżnicowanie histologiczne (1 vs 2 vs 3), średnicę guza oraz płęć.

Ponadto oceniono przeżycie wolne od nawrotu odległego w zależności od wartości indeksu ryzyka w podgrupach chorych z grupy treningowej: (I) w podgrupie chorych, u których średnica guza nie przekraczała 40 mm oraz (II) w grupie chorych, u których średnica była większa niż 40 mm. W obrębie tych podgrup chorzy byli kwalifikowani jako mający wysokie lub niskie ryzyko nawrotu, jeśli ich wartości indeksu ryzyka były odpowiednio większe lub mniejsze od wartości mediany danego indeksu ryzyka w całej populacji *uczącej*.

Do obliczeń statystycznych zastosowano zarejestrowany *Statistical Package for the Social Sciences, version 13* (SPSS, Inc.). Badanie zostało zaaprobowane przez Niezależną Komisję Bioetyczną do Spraw Badań Naukowych przy Akademii Medycznej w Gdańsku (decyzja NKEBN/880/2003 z dnia 17 grudnia 2003).

5. Wyniki

5.1 Analizy jednoczynnikowe

Mediana całkowitego czasu przeżycia w grupie uczącej wynosiła 45,7 miesięcy, w tym dla chorych w stopniu I - 46,6 miesięcy, a dla chorych w stopniu II i III - 38,2 miesięcy. U 33 chorych, u których po doszczętnym zabiegu chirurgicznym rozwinęły się odległe przerzuty mediana czasu przeżycia do nawrotu wynosiła 12 miesięcy (zakres: od 1 miesiąca do 60 miesięcy). U pozostałych 33 chorych, u których nie wykazano nawrotu choroby, mediana czasu obserwacji wynosiła 61 miesięcy (zakres 42-78 miesięcy). U siedmiu chorych, u których rozwinęły się przerzuty odległe, stwierdzono również miejscową lub regionalną wznowę.

W analizie czasu wolnego od wystąpienia przerzutów odległych (ang. *metastases free survival* - MFS) w zależności od ekspresji genów jako zmiennej ciągłej, wysoka ekspresja 10 genów: *CSF1*, *Rho GDI β*, *SELPLG*, *ANLN*, *PDPN*, *KIAA0974*, *SELL*, *PAI1*, *PH4* i *FN1* wykazywała znamienny związek z krótszym czasem do rozwoju przerzutów odległych ($p < 0,05$) (tab. 5.1.1). Wysoka ekspresja *MMP9*, *HGF*, *INSR* i *VEGF C* także wiązała się z krótszym MFS, jednak zależność ta nie osiągnęła znamienności statystycznej ($p < 0,22$).

W analizie zależności pomiędzy MFS a ekspresją genów wyrażoną jako zmienna kategoryzowana (poniżej lub powyżej wartości mediany ekspresji dla danego genu), wysoka ekspresja: *CSF1*, *FN1* i *PAI1* wykazywała znamienny związek z krótszym MFS; natomiast wysoka ekspresja *CA9* była związana z dłuższym MFS (tab. 5.1.2). W grupie chorych z wysoką ekspresją *KIAA 0974*, *PH4*, *NTRK1*, *Rho GDI β*, *HGF*, *SELPLG* i *VEGF C* stwierdzono krótszy MFS, przy czym zależność ta nie osiągnęła znamienności statystycznej ($p < 0,15$).

W analizie MFS w zależności od ekspresji genów kategoryzowanej według wartości kwartyli ekspresji, *CA9*, *CSF1*, *FN1* i *PAI-1* wykazywały znamienne różnice pod względem MFS dla 4 grup ekspresji (tab. 5.1.2). Krzywe przeżycia dla grup definiowanych względem wartości mediany i kwartyli ekspresji wybranych genów w odniesieniu do MFS przedstawiono w załączniku 1.

Tabela 5.1.1 Geny, których ekspresja jako zmienna ciągła wykazywała związek z MFS oraz kilka wybranych genów nie wykazujących związku z ryzykiem nawrotu.

Nazwa genu	Ekspresja genu jako zmienna ciągła	
	P	Ryzyko przerzutów odległych i zgonu
CSF1	<0.001	wzrost ryzyka
Rho GDI β	0.001	wzrost ryzyka
SELPLG	0.003	wzrost ryzyka
ANLN	0.005	wzrost ryzyka
PDPN	0.01	wzrost ryzyka
KIAA0974	0.01	wzrost ryzyka
SELL	0.033	wzrost ryzyka
PAI1	0.038	wzrost ryzyka
PH4	0.038	wzrost ryzyka
FN1	0.041	wzrost ryzyka
MMP9	0.107	trend do wzrostu ryzyka
HGF	0.12	trend do wzrostu ryzyka
INSR	0.13	trend do wzrostu ryzyka
VEGFC	0.21	trend do wzrostu ryzyka
CA9	0.6	-
GPI	0.93	-
NTRK1	0.94	-

Niektóre z genów znamienych w analizach MFS w zależności od ekspresji jako zmienna ciągła lub kategoryzowana względem mediany w nie wykazywały znamienności w analizie w odniesieniu do kwartyli ekspresji (tab. 5.1.3). Na przykład rokowanie chorych z najwyższymi wartościami ekspresji *PDPN* (powyżej 3. kwartyła) oraz najniższymi wartościami ekspresji (poniżej 1. kwartyła) było identyczne. Nieoczekiwanie, grupa z wartościami powyżej 1. kwartyła i poniżej mediany charakteryzowała się bardzo korzystnym rokowaniem, lepszym niż wymienione wcześniej grupy (Załącznik 1.N.) Podobnie, chorzy z najwyższą ekspresją receptora dla insuliny (*INSR*) mieli

najmniej korzystne rokowanie. Z kolei w grupie z wartościami ekspresji pomiędzy medianą a 3. kwartylem stwierdzono najlepsze rokowanie, korzystniejsze niż u chorych z najniższymi wartościami ekspresji tego receptora (Załącznik 1.J.)

Tabela 5.1.2. Zestawienie rokowniczej roli ekspresji poszczególnych genów jako zmiennej ciągłej i zmiennej kategoryzowanej (poniżej lub powyżej wartości ekspresji mediany).

	ekspresja jako zmienna ciągła		ekspresja jako zmienna kategoryzowana	
	p	Ryzyko przerzutów	p	Ryzyko przerzutów
CSF1	<0.001	wzrost ryzyka	0.01	wzrost ryzyka
Rho GDI β	0.001	wzrost ryzyka	0.093	wzrost ryzyka
SELPLG	0.003	wzrost ryzyka	0.108	trend do wzrostu ryzyka
ANLN	0.005	wzrost ryzyka	0.26	trend do wzrostu ryzyka
PDPN	0.01	wzrost ryzyka	0.53	-
KIAA0974	0.01	wzrost ryzyka	0.068	trend do wzrostu ryzyka
SELL	0.033	wzrost ryzyka	0.28	trend do wzrostu ryzyka
PAI1	0.038	wzrost ryzyka	0.048	wzrost ryzyka
PH4	0.038	wzrost ryzyka	0.073	trend do wzrostu ryzyka
FN1	0.041	wzrost ryzyka	0.021	wzrost ryzyka
MMP9	0.107	trend do wzrostu ryzyka	0.87	-
HGF	0.12	trend do wzrostu ryzyka	0.101	wzrost ryzyka
INSR	0.13	trend do wzrostu ryzyka	0.23	trend do wzrostu ryzyka
VEGFC	0.21	trend do wzrostu ryzyka	0.148	trend do wzrostu ryzyka
CA9	0.6	-	0.004	redukcja ryzyka
EGFR	0.6	-	0.33	-
GPI	0.93	-	0.16	trend do redukcji ryzyka
NTRK1	0.94	-	0.092	trend do wzrostu ryzyka

Interpretacja takiej korelacji jest niejednoznaczna - może ona wskazywać na znaczenie rokownicze jedynie dla najwyższych lub bardzo wysokich wartości ekspresji *INSR*. Taki rozkład krzywych przeżycia dla kwartyli mógł jednak również oznaczać brak znaczenia rokowniczego ekspresji tego genu. Innymi genami, których ekspresja kategoryzowana według wartości kwartyli wykazywała nieliniową zależność z MFS były *GPI* i *NTRK1*. Wysoka ekspresja genu *CA9* wykazywała związek z korzystnym rokowaniem – grupa z wartościami ekspresji powyżej mediany i poniżej 3. kwartyli wykazywała najdłuższe przeżycie bez nawrotu. Grupy chorych z ekspresją poniżej wartości mediany cechowało najgorsze rokowanie (Załącznik 1.B.).

Tabela 5.1.3. Porównanie znaczenia rokowniczego ekspresji wybranych genów wyrażonej w kategoryzacji wobec mediany ekspresji oraz wobec wartości kwartyli ekspresji.

Ekspresja kategoryzowana względem mediany		Ekspresja kategoryzowana względem kwartyli	
Nazwa genu	p	Nazwa genu	P
CA9	0.004	CA9	0.008
CSF1	0.01	CSF1	0.037
FN1	0.021	FN1	0.05
PAI1	0.048	PAI1	0.048
KIAA0974	0.068	KIAA0974	0.18
PH4	0.073	PH4	0.17
NTRK1	0.092	NTRK1	0.12
Rho GDI β	0.093	Rho GDI β	0.29
HGF	0.101	HGF	0,04
SELPLG	0.108	SELPLG	0.32
VEGFC	0.148	VEGFC	0.59
GPI	0.16	GPI	0,06
INSR	0.23	INSR	0.11
ANLN	0.26	ANLN	0.34
SELL	0.28	SELL	0.51
EGFR	0.33	EGFR	0.88
PDPN	0.53	PDPN	0.15
MMP9	0.87	Vil2	0,05

W analizie zależności pomiędzy ekspresją genów kategoryzowaną powyżej i poniżej wartości mediany a wystąpieniem odległych przerzutów geny: *CSF1*, *Rho GDI β*, *SELPG* i *ANLN* wykazywały znamienność ($p < 0,05$) (tab. 5.1.4).

Tabela 5.1.4. Zestawienie korelacji pomiędzy ekspresją genów jako zmienną kategoryzowaną (względem wartości mediany) a wystąpieniem przerzutów odległych.

Gen	P	Gen	P
CSF1	0.016	HGF	0.21
Rho GDI β	0.022	CDH2	0.26
SELPG	0.035	S100 P	0.32
ANLN	0.038	CD47	0.39
PAI-1	0.05	Vil 2	0.44
VEGFC	0.07	Twist1	0.47
KIAA	0.08	CD44	0.57
FN1	0.09	IL8	0.68
PH4	0.09	EGFR	0.74
STX1	0.11	PGK	0.75
SELL	0.11	CA9	0.80
MMP9	0.14	GPI	0.80
INR1	0.14	NTRK2	0.80
CXCR4	0.15	NTRK1	0.99
PDPN	0.20		

W grupie *uczającej* stwierdzono silną wprost proporcjonalną zależność pomiędzy ekspresją *CSF1* i *FN1*, *KIAA0974*, *VEGFC*, *ISNR*, *NTRK1*, *PH-4* oraz *EGFR* (tab. 5.1.5). Znamienne odwrotną zależność stwierdzono pomiędzy ekspresją genów *CA9* i *PH-4* ($q = -0.33$; $P = 0.007$). Pozostałe znamienne korelacje pomiędzy ekspresją genów przedstawiono w tabeli (5.1.5).

Tabela 5.1.5. Korelacje pomiędzy ekspresją wybranych genów.

	PH4	CSF1	EGFR	KIAA0974	ANLN	CA9	VEGFC	NTRK1	FN1
CSF1	0.49 p=0.0001								
EGFR	0.19 p=0.11	0.39 p=0.001							
KIAA0974	0.54 p=0.0001	0.52 p=0.0001	0.26 p=0.03						
ANLN	0.23 p=0.06	0.15 p=0.21	0.43 p=0.0001	0.43 p=0.0001					
CA9	-0.33 p=0.007	-0.01 p=0.92	0.22 p=0.0001	-0.008 p=0.95	0.10 p=0.4				
VEGFC	0.38 p=0.001	0.64 p=0.0001	0.39 p=0.001	0.36 p=0.003	0.13 p=0.3	0.005 p=0.97			
NTRK1	0.19 p=0.12	0.52 p=0.0001	0.28 p=0.02	0.32 p=0.008	-0.06 p=0.6	0.09 p=0.43	0.46 p=0.0001		
FN1	0.30 p=0.01	0.57 p=0.0001	0.22 p=0.07	0.46 p=0.0001	0.10 p=0.4	0.09 P=0.44	0.6 p=0.0001	0.45 p=0.0001	
INSR1	0.66 p=0.0001	0.56 p=0.0001	0.39 p=0.001	0.60 p=0.001	0.25 p=0.04	-0.16 p=0.19	0.42 p=0.0001	0.25 p=0.04	0.38 p=0.002

5.2 Generowanie „OPTYMALNEGO” modelu rokowniczego w zbiorze uczącym - analiza wieloczynnikowa

Na podstawie wyników analiz jednoczynnikowych przeprowadzono wieloczynnikową analizę MFS z uwzględnieniem genów, których ekspresja w najwyższym stopniu była związana z czasem wolnym od nawrotu. Do równania regresji liniowej włączono 6 najbardziej znamienych genów ($p < 0.02$). Geny te zostały wybrane w celu stworzenia podstawowego indeksu ryzyka. Wykorzystano wartości ekspresji *CA9* i *FN1* kategoryzowane wg mediany oraz wartości ekspresji *CSF1*, *SELPLG*, *ANLN* i *KIAA0974* wyrażone jako zmienna ciągła. Jeden z tych genów (*CSF1*) miał istotny wpływ na MFS po uwzględnieniu restrykcyjnej poprawki wg Bonferroniego (tabela 5.2.1). Genu *Rho GDI β*, trzeciego na liście genów optymalnych, z przyczyn technicznych nie wykorzystywano do dalszych analiz.

Tabela 5.2.2. Wieloczynnikowa analiza Coxa MFS w zależności od ekspresji najbardziej znamiennej genów. W pierwszej kolumnie przedstawiono współczynniki regresji, które wykorzystano przy tworzeniu równania indeksu ryzyka nawrotu.

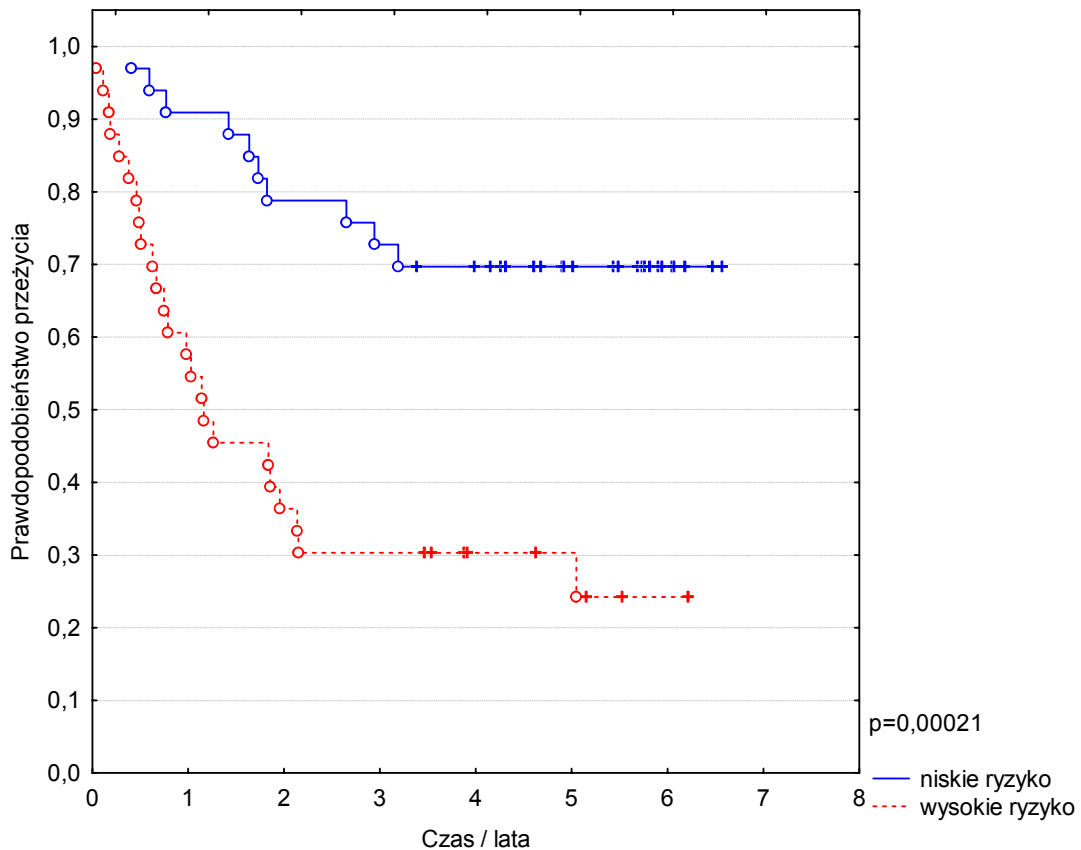
Gen	Wsp. regresji β	Błąd standardowy	Wald	P
CA9 (zm. kategoryzowana)	-1.247	0.381	10.734	0.001
CSF1	0.682	0.281	5.885	0.015
ANLN	0.423	0.177	5.730	0.017
FN1 (zm. kategoryzowana)	0.668	0.414	2.611	0.106
KIAA0974	-0.299	0.262	1.309	0.253
SELPLG	0.143	0.206	.481	0.488

Na podstawie wartości współczynników β uzyskanych z analizy wieloczynnikowej (tab. 5.2.2), dla każdego chorego w zbiorze uczącym wyliczono wartość indeksu ryzyka wg następującego wzoru:

$$RS=[FN1*0,67]+[CSF1*0,68]+[0,14*SELPLG]+[ANLN*0,42]+[CA9*[-1,25]]$$

W tym modelu nie został ujęty gen *KIAA0974*. W równaniu regresji współczynnik β dla tego genu przyjął ujemny znak, co było sprzeczne z efektem rokowniczym tego genu stwierdzonym w analizach jednoczynnikowych (wyższa ekspresja związana była z gorszym rokowaniem) (Załącznik 1.I). Przeżycie wolne od nawrotu w grupach wysokiego i niskiego ryzyka nawrotu na podstawie wartości RS zostało porównane testem *log-rank*. Wartość mediany przeżycia w grupie wysokiego ryzyka wynosiła 1,14 roku (95% CI: 0-2,32 lat), a w grupie niskiego ryzyka mediana nie została osiągnięta (ryc. 5.2.1). Różnica przeżycia pomiędzy grupami była wysoce znamienna ($p=0,00021$).

Rycina 5.2.1. Prawdopodobieństwo przeżycia wolnego od nawrotu w zależności od 5-genowego modelu. Grupa *ucząca*.



Diagnostyczna dokładność testu w grupie *uczącej* dla przewidzenia nawrotu odległego wyniosła 67%. Kolejno w zbiorze *uczącym* przeprowadzono wieloczynnikową analizę przeżycia wolnego od nawrotu wg Coxa, w której wzięto pod uwagę 5-genowy indeks ryzyka oraz takie czynniki kliniczne jak: płeć, wiek, stopień zaawansowania, stopień złośliwości histologicznej oraz średnica guza. Indeks ryzyka oraz średnica guza były niezależnymi czynnikami rokowniczymi w tej grupie chorych (odpowiednio $p < 0,0001$ i $p = 0,014$) (tab. 5.2.3). Dodanie do równania RS zmiennej w postaci „przeskalowanej” wartości średnicy guza (1 mm = 0,01 punktu równania RS) zwiększyło dokładność diagnostyczną testu do 73%.

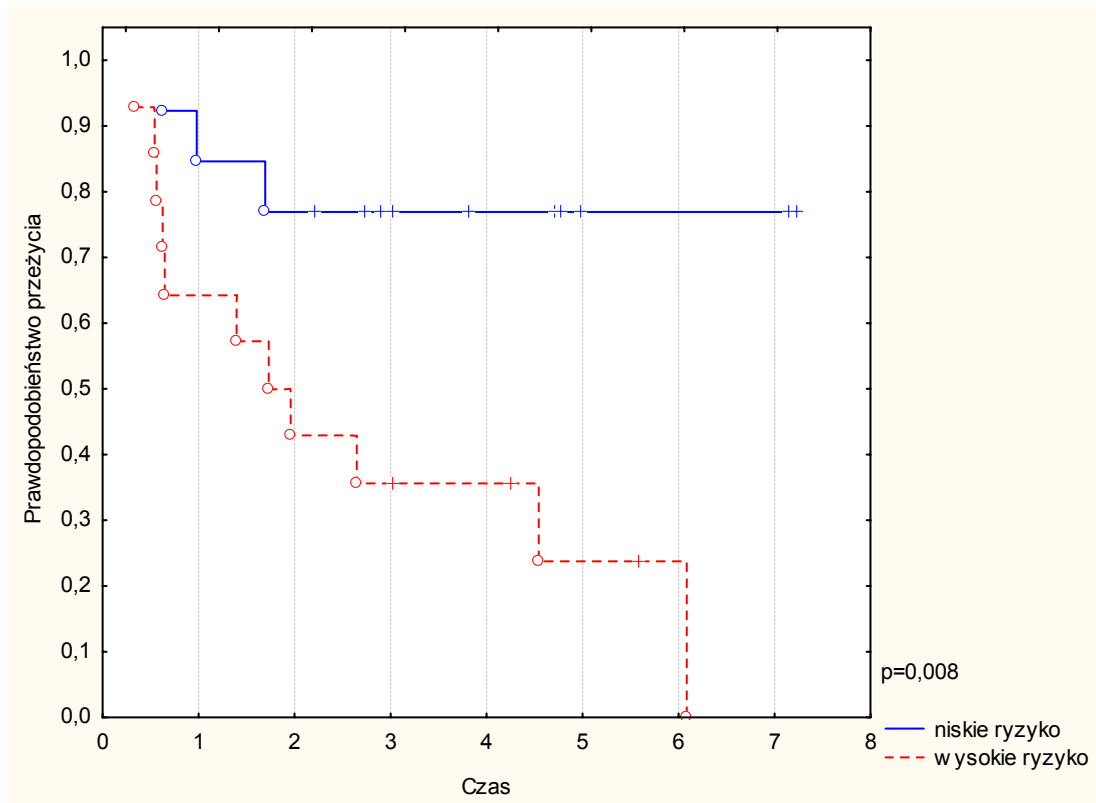
Tabela 5.2.3. Wieloczynnikowa analiza Coxa związku pomiędzy MFS w zależności od wartości RS oraz wybranych cech klinicznych. Grupa *ucząca*.

Zmienna	Wsp. β	P	OR	95.0% CI dla OR	
				Dolna granica	Górną granica
Płeć	0.812	0.142	2.253	0.762	6.661
Stopień zaawansowania	-0.477	0.250	0.621	0.275	1.399
Stopień złośliwości histologicznej	0.243	0.583	1.276	0.535	3.040
Średnica guza (>40 mm vs. ≤ 40mm)	1.290	0.014	3.631	1.301	10.133
5-genowy indeks ryzyka	0.888	<0.0001	2.431	1.637	3.612

5.3 Weryfikacja wyników ze zbioru *uczącego* w zbiorze *walidacyjnym* - 27 chorych na płaskonabłonkowego raka płuca w stopniu I i II.

Na podstawie indeksu ryzyka uzyskanego w zbiorze *uczącym* wyliczono wartości RS dla chorych ze zbioru *walidacyjnego*. Kategoryzacji ekspresji *CA9* i *FN1* w zbiorze *walidacyjnym* dokonano wg wartości mediany ekspresji tych genów w tym zbiorze, niezależnie od zbioru *uczącego*. Grupę *walidującą* podzielono pod względem mediany wartości RS uzyskanych w tej grupie. Wykorzystano metodę Kaplana-Meiera dla wykreślenia krzywych przeżycia, a czas przeżycia wolnego od nawrotu w obu grupach porównano testem *log-rank*. Mediana MFS w grupie wysokiego ryzyka wynosiła 1,19 roku (95%CI: 0,2-3,6 lat); a w grupie bez nawrotu nie została osiągnięta (ryc. 5.3.1). Różnica czasu przeżycia bez nawrotu pomiędzy grupami była znamienna ($p=0,008$). Dokładność przewidywania wystąpienia przerzutów nowotworu dla modelu 5-genowego w grupie *walidującej* wynosiła 78%.

Rycina 5.3.1. Prawdopodobieństwo przeżycia wolnego od nawrotu odległego w zależności od modelu 5-genowego. Grupa *walidująca*.



5.4 Model rokowniczy oparty na wybranych genach

Dla 6 innych genów (*PH-4*, *VIL2*, *VEGF C*, *EGFR*, *INSR* i *NTRK1*) o znamienności mniejszej niż $p=0.02$ w analizach jednoczynnikowych, ale interesującej funkcji, zbudowano podobny model na zbiorze *uczącym* (wykorzystano wyłącznie wartości ciągłe).

Tabela 5.4.1. Model wieloczynnikowej regresji Coxa – grupa ucząca

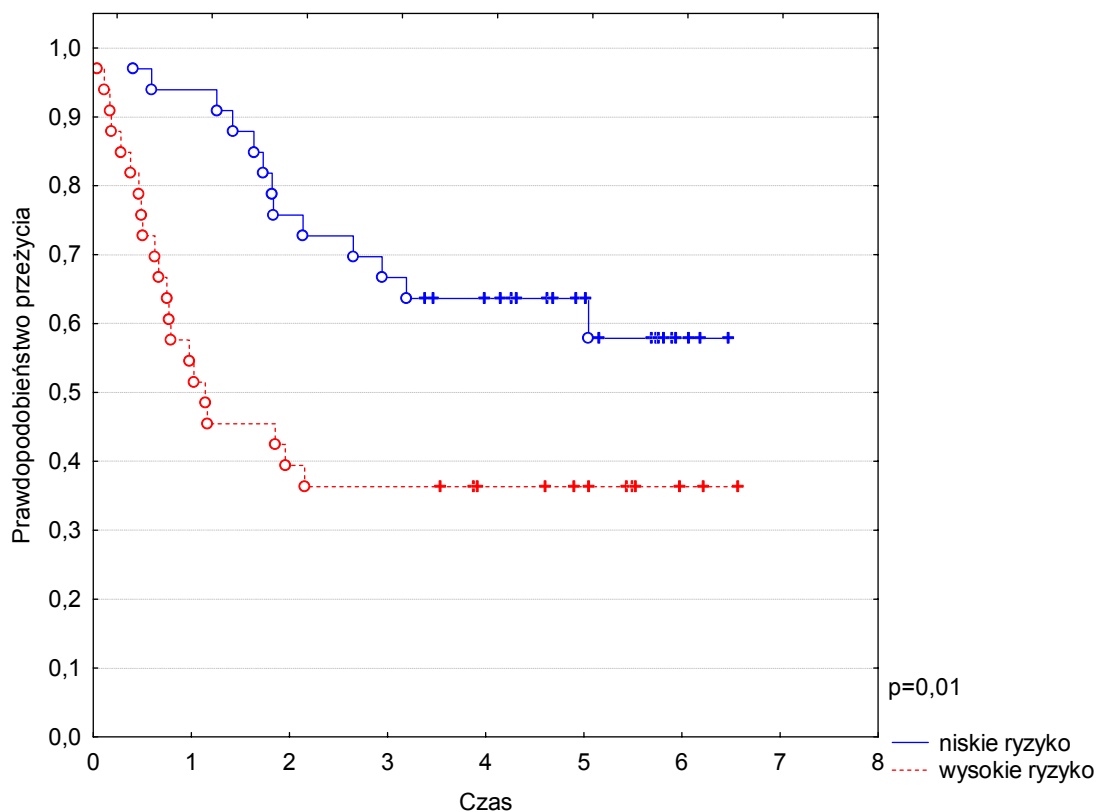
Gen	Wsp beta	Błąd stand.	Wald	P	OR	95.0% CI dla OR	
						Dolna granica	Górna granica
PH4	0.439	0.203	4.673	0.031	1.551	1.042	2.310
VIL2	-0.462	0.259	3.184	0.074	0.630	0.379	1.047
VEGFC	0.161	0.126	1.644	0.200	1.175	0.918	1.504
EGFR	0.197	0.172	1.304	0.253	1.217	0.869	1.706
INSR	0.135	0.188	0.519	0.471	1.145	0.792	1.654
NTRK1	0.000	0.183	0.000	0.998	0.999	0.698	1.432

Równanie RS dla modelu 4-genowego przyjęło postać:

$$RS=[PH4*0,44]+[VEGF\ C*0,161]+[EGFR*0,20]+[INSR*0,13]$$

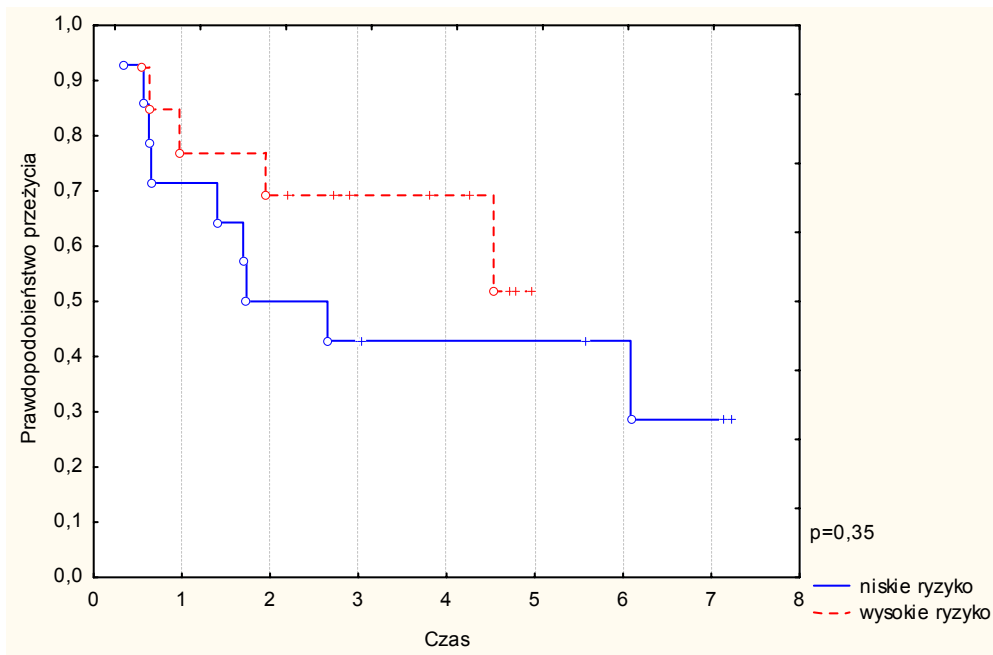
W równaniu nie uwzględniono genu *NTRK1* z uwagi na współczynnik regresji równy 0 oraz wyłączono gen *Vil2* z uwagi na ujemny współczynnik β . Obliczono wartości RS dla chorych w zbiorze *uczącym* i porównano MFS pomiędzy grupami charakteryzującymi się wysokimi lub niskimi wartościami RS (powyżej lub poniżej mediany). Grupy różniły się znacząco pod względem czasu przeżycia wolnego od nawrotu ($p=0,01$) (ryc. 5.4.1).

Rycina 5.4.1. Prawdopodobieństwo przeżycia wolnego od nawrotu odległego w zależności od modelu 4-genowego. Grupa *ucząca*.



Rokownicza wartość wskaźnika ryzyka opartego na ekspresji 4 genów (*PH4*, *VEGF C*, *EGFR* i *INSR*) nie została potwierdzona w odniesieniu do MFS w zbiorze *walidującym* ($p=0,35$) (ryc. 5.4.2).

Rycina 5.4.2. Prawdopodobieństwo przeżycia wolnego od nawrotu odległego w zależności od modelu 4-genowego. Grupa *walidująca*.



5.5 Rokowniczy model łączony (model zredukowany)

W następnym etapie analiz statystycznych podjęto próbę połączenia wyników, w celu określenia profilu opartego na jak najmniejszej liczbie genów (model zredukowany). Do krokowej analizy regresji włączono 12 genów z dwu poprzednich modeli rokowniczych. Stopniowo eliminowano geny o najniższej znamienności statystycznej. W ostatnim kroku analizy regresji 2 geny: *CSF1* (wyrażona jako zmienna ciągła) i *CA9* (wyrażona jako zmienna kategoryzowana) były niezależnymi czynnikami związanymi z długością MFS (odpowiednio $p < 0,001$ i $p = 0,005$).

Tabela 5.5.1. Wyniki krokowej wieloczynnikowej analizy regresji Coxa.

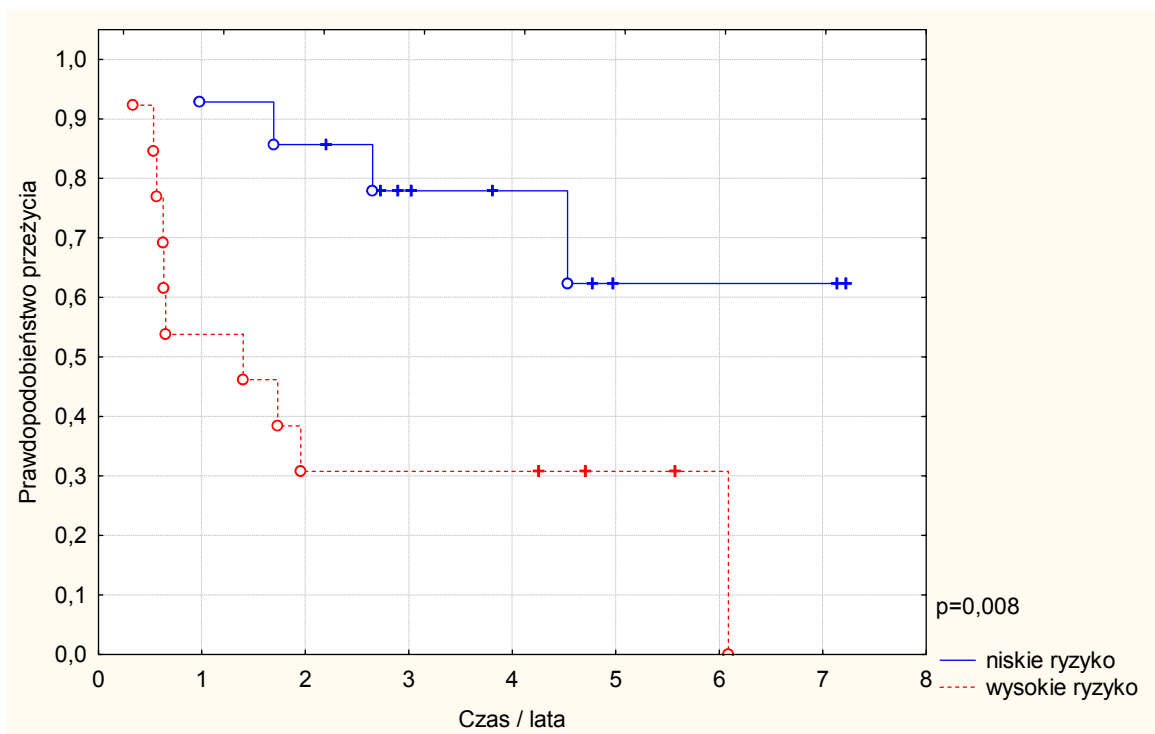
Gen	Wsp. regresji	Błąd standardowy	Wald	P
CA9 (zm. kategoryzowana)	-1.041	0.363	8.213	0.004
CSF1	0.768	0.196	15.293	<0.001

Utworzono rokowniczy model oparty na ekspresji dwóch genów: *CSF1* i *CA9*.
Równanie indeksu ryzyka przyjęło formę:

$$RS=[CSF1*0,768] + [CA9 * (-1.041)]$$

Podobnie jak w poprzednich analizach, obliczono wartości RS w grupie *uczącej*, po czym podzieleno chorych względem mediany wartości RS. Mediana MFS w grupie chorych z wysokimi wartościami RS wynosiła 1,14 roku (95% CI: 0-2,34 lat), natomiast w grupie chorych z niskim ryzykiem nie została osiągnięta. Przeżycie wolne od nawrotu różniło się znacząco pomiędzy grupami z wysokim i niskim ryzykiem na podstawie wskaźnika 2-genowego ($p=0,01$).

Rycina 5.5.1. Prawdopodobieństwo przeżycia wolnego do nawrotu odległego w zależności od modelu 2-genowego. Grupa walidująca.



Model 2-genowy wykazywał silną moc rokowniczą w grupie *walidującej*. Podobnie jak w poprzednich analizach wyliczono wartości ryzyka nawrotu na podstawie równania RS dla 2 genów: *CSF1* i *CA9*. Mediana MFS w grupie chorych z wysokimi wartościami RS wynosiła 1,4 roku (95%CI: 0,1-2,7), zaś w

grupie niskiego ryzyka nie została osiągnięta (ryc. 5.5.1). Przeżycie wolne od nawrotu także w tym przypadku różniło się znamienne (p=0,008).

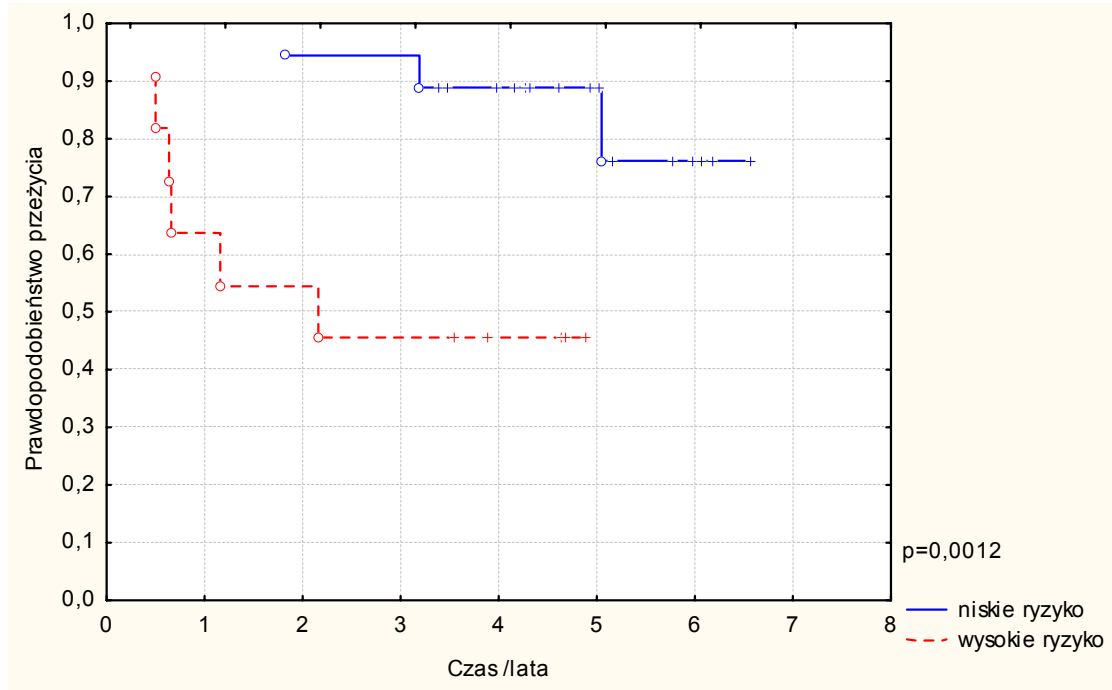
5.6 Modele 5-genowy i 2-genowy - analizy w podgrupach z uwzględnieniem średnicy guza - poniżej i powyżej 40 mm.

Chorych ze zbioru *uczącego* podzielono pod względem średnicy guza na 2 grupy: (i) chorych, u których średnica guza nie przekraczała 40 mm oraz (ii) chorych, u których średnica guza była większa od 40mm. W obu tych grupach wykreślono krzywe MFS dla podgrup chorych z wysokimi i niskimi wartościami indeksu ryzyka (wg 5-genowego modelu).

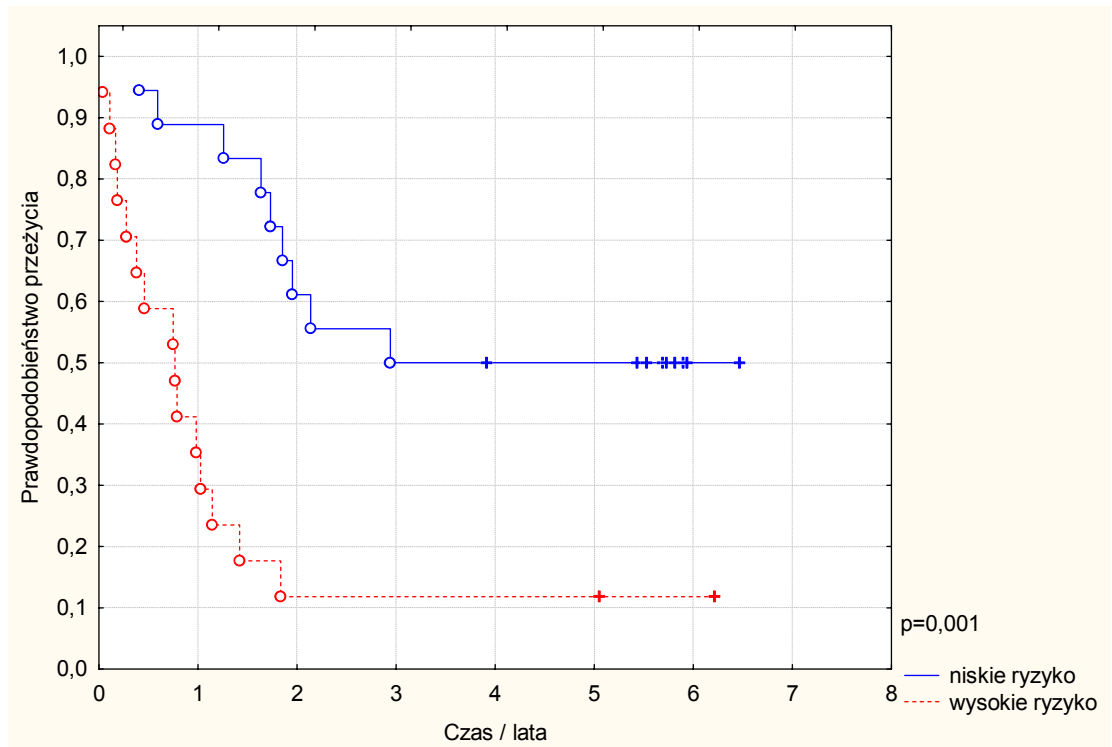
W grupie chorych ze średnicą guza równą lub mniejszą 40 mm stwierdzono, że 5-letnie MFS było udziałem 90% chorych z niskim indeksem ryzyka. Mediana MFS chorych z wysokimi wartościami ryzyka wynosiła 3,7 lat (zakres od 0,5 do 6 lat) (ryc. 5.6 A). Różnica pomiędzy MFS w grupach z niskim i wysokim ryzykiem była znamienna (p=0,012). W podgrupie chorych ze średnicą guza przekraczającą 40 mm i wysokimi wartościami RS jedynie u 10% nie stwierdzono odległych przerzutów. Wszyscy pozostali chorzy w tej podgrupie zmarli z powodu rozsiewu nowotworu. Mediana MFS w podgrupie z niskimi wartościami ryzyka wynosiła 3 lata, a przeżycie tej podgrupy było znamienne dłuższe niż grupy wysokiego ryzyka (p=0,001) (ryc. 5.6 B). Analogiczne analizy przeprowadzone dla modelu 2-genowego wykazały również znamienne znaczenie rokownicze w grupach chorych ze średnicą guza mniejszą od 40 mm (p=0,04) i powyżej 40 mm (p=0,022).

Rycina 5.6. Prawdopodobieństwo MFS z uwzględnieniem 5-genowego profilu w grupie chorych ze średnicą guza równą lub mniejszą niż 40mm (A) i w grupie chorych ze średnicą guza powyżej 40 mm (B).

(A)



(B)



6. DYSKUSJA

Efektom niniejszego badania jest określenie profili ekspresji genów związanych z rokowaniem u chorych na płaskonabłonkowego raka płuca. Przeprowadzone analizy wykazały silną zależność pomiędzy odległym nawrotem nowotworu u chorych radykalnie operowanych z powodu płaskonabłonkowego raka płuca a wskaźnikiem ryzyka opartym na 5-genowym profilu ekspresji (*CSF1*, *CA9*, *FN1*, *SELPLG* i *ANLN*). Niekorzystny profil ekspresji genów stwierdzony w guzie pierwotnym płaskonabłonkowego raka płuca może potencjalnie stanowić wskazanie do stosowania pooperacyjnego leczenia systemowego (adjuwantowej chemioterapii lub leczenia ukierunkowanego molekularnie). Ponadto wykazano, że profil ekspresji oparty na dwu najbardziej istotnych rokowniczo genach: *CSF1* i *CA9*, jest również silnie związany z rokowaniem chorych na raka płaskonabłonkowego. Z praktycznego punktu widzenia profile ekspresji oparte na większej liczbie genów (kilka-kilkanaście) mogą być jednak odpowiedniejsze jako podstawa testu laboratoryjnego, bowiem są one w mniejszym stopniu podatne na błędy laboratoryjne. Profile ekspresji 5-genowy i 2-genowy były niezależnymi czynnikami rokowniczymi. Wśród klinicznych czynników jedynie średnica guza (kategoryzowana wobec wartości 4 cm) była niezależnym czynnikiem rokowniczym. W porównaniu do obowiązującej skali TNM ndrp, proponowana siódma edycja klasyfikacja w większym stopniu odzwierciedla rokowniczą rolę średnicy guza [86]. W badaniu wykazano zatem jednoznacznie, że czynniki molekularne pozwalają lepiej niż czynniki kliniczne określić rokowanie chorych na płaskonabłonkowego raka płuca w stopniu I i II poddanych radykalnemu leczeniu chirurgicznemu.

6.1 Metody oceny ekspresji genów oparte na badaniu ilości mRNA a metody immunohistochemiczne nasilenia ekspresji białka

Profile ekspresji genów oblicza się na podstawie analizy liczby kopii mRNA w próbce RNA wyizolowanego z wycinka guza o określonej objętości. W powyższym badaniu RNA izolowano z około 40 mm³ (20 warstw grubości 20

mikronów o powierzchni około 0,5 - 1 cm²). Dla porównania do barwień metodami immunohistochemicznymi (IHC) wykorzystuje się jeden skrawek grubości 3-5 mikronów. Oznacza to, że metody oceny ekspresji na poziomie transkrypcji (mRNA) umożliwiają analizę w około stukrotnie większej objętości tkanki nowotworowej. Przy założeniu istnienia różnic w ekspresji genów wynikających ze zmienności morfologiczno-histologicznej pomiędzy poszczególnymi skrawkami, analiza większej objętości tkanki stanowi istotną zaletę metody RT-PCR. Ponadto jest to metoda w pełni zobjektywizowana poprzez liczbowe wyrażanie wyników ekspresji i ich dodatkową normalizację. W przypadku metod immunohistochemicznych wynik jest istotnie zależny od operatora (patologa) oceniającego preparat. Nawet, gdy w ocenie biorą udział doświadczeni patolodzy, współczynnik zgodności κ dla dwóch testów opartych na IHC (badania dotyczące oceny ekspresji białka HER2 w raku piersi) wynosił odpowiednio 0,67 i 0,74 [87]. Pomimo prób normalizacji różnorodności obrazów immunohistochemicznych, na przykład poprzez wprowadzanie systemów punktowych, w których bierze się pod uwagę intensywność i rozległość barwienia, subiektywność oceny nadal pozostaje nieodłącznym elementem tej metody.

6.2 Ocena ekspresji genów na podstawie liczby kopii mRNA – platformy mikromacierzy oligonukleotydowych versus metoda ilościowej RT-PCR

Po ponad dwóch dekadach badań z wykorzystaniem DNA (analizy mutacji, amplifikacji czy utraty heterozygotyczności genów istotnych dla nowotworzenia) nastąpiło wzmożone zainteresowanie oceną ekspresji genów na podstawie badania ilości mRNA. Transkrypcja jest wypadkową zjawisk na poziomie genomowego DNA oraz złożonych mechanizmów regulujących ekspresję. Analiza transkrypcji umożliwia bardziej bezpośrednią ocenę aktualnego stanu biologicznego komórki (tkanki) od badań nad zaburzeniami DNA. Do najbardziej przydatnych metod ilościowej oceny ekspresji genów (mRNA) należą metoda mikromacierzy oligonukleotydowych oraz ilościowej RT-PCR. Mikromacierze umożliwiają analizę ekspresji setek i tysięcy genów jednocześnie, co daje możliwość całościowej analizy ekspresji na skalę genomu. Ogromny zakres badanych transkryptów wiąże się z gorszymi parametrami czułości i swoistości

analizy ekspresji w porównaniu z metodą ilościowej RT-PCR. Zestawy RT-PCR do oceny ekspresji składają się z pary starterów oraz sond swoistych dla amplikonu. Stanowi to system podwójnie zapewniający swoistość amplifikacji badanego transkryptu. W przypadku platform mikromacierzowych analiza ekspresji jest możliwa w wyniku hybrydyzacji mRNA do sond oligonukleotydowych. Z uwagi na uwarunkowania technologiczne wiązania te charakteryzują się stosunkowo niską swoistością. Współczynniki zmienności oceny ekspresji (ang. *coefficients of variation*, CV) dla 1375 genów analizowanych w jednym badaniu wynosiły poniżej 5% dla zestawów RT-PCR (dla Ct poniżej 30) w porównaniu z 6-22% w przypadku tych samych genów analizowanych na platformach mikromacierzowych [88]. Zakres wykrywania krotności różnic w poziomie ekspresji genu (ang. *dynamic range*) dla zestawów RT-PCR wynosi 6-9 rzędów wielkości (10^6 - 10^9), podczas gdy dla większości platform oligonukleotydowych 3-4 rzędy wielkości. Wynika z tego, że RT-PCR przewyższa metody mikromacierzy oligonukleotydowych pod względem czułości wykrywania ekspresji genu. Czułość i swoistość wykrywania ekspresji genów za pomocą mikromacierzy w odniesieniu do zestawów RT-PCR (TaqMan *gene expression assays*) wynosiły odpowiednio: 76% i 70% dla platformy Appliedbiosystems oraz 71% i 50% dla platformy Agilent. Uważa się, że mikromacierze oligonukleotydowe są użytecznym narzędziem dla poszukiwania różnic w ekspresji genów w skali całego genomu, jednak ich czułość i swoistość jest akceptowalna tylko w odniesieniu do genów ulegających wysokiej i średniej ekspresji oraz wykrywania różnic w ekspresji większych niż dwukrotne [88]. RT-PCR jest metodą o wyższej czułości wykrywania ekspresji genów oraz bardziej precyzyjną w wykrywaniu dyskretnych różnic ekspresji.

6.3 Sygnatury ekspresji genów w niedrobnokomórkowym raku płuca oparte na metodzie mikromacierzy oligonukleotydowych

Dotychczas opublikowano szereg profili ekspresji genów o znaczeniu rokowniczym dla chorych na ndrp [23, 25, 27, 74, 89, 90]. Dokładność diagnostyczna rokowniczego profilu ekspresji określonego w tym badaniu oszacowana na poziomie 67-78% jest porównywalna z dokładnością

diagnostyczną 50-genową [27] i 111-genową sygnatury ekspresji genów [28] opartych na technologii mikromacierzy oligonukleotydowych opracowanych w grupach chorych na raka płaskonabłonkowego (dokładność diagnostyczna w tych badaniach wynosiła odpowiednio 68% i 72%). Wspomniana 50-genowa sygnatura charakteryzowała się jednak niską czułością przewidywania nawrotu – 42%, co istotnie ogranicza jej potencjalne kliniczne zastosowanie. W innym badaniu dotyczącym rokowniczych profili ekspresji uzyskiwanych z wykorzystaniem technologii mikromacierzy, tak zwanych *metagenes*, na etapie walidacji w dwu niezależnych grupach chorych wykazano dokładność diagnostyczną: na poziomie odpowiednio 72% i 79% [90]. Pierwsza z populacji walidacyjnych liczyła jednak jedynie 14 chorych na płaskonabłonkowego raka płuca, natomiast druga obejmowała tylko chorych, u których rozpoznano raka gruczołowego. Z kolei, w badaniu, którego celem była metaanaliza wyników kilku badań mikromacierzowych z udziałem chorych z rozpoznaniem raka płaskonabłonkowego i gruczołowego, 64-genowy profil ekspresji charakteryzował się 87% dokładnością diagnostyczną w podgrupie chorych w I stopniu zaawansowania [25]. Ostatnio przeprowadzono rozszerzoną walidację istniejących sygnatur ekspresji genów [90, 91] oraz podjęto próbę wygenerowania 8 nowych modeli rokowniczych opartych na technologii mikromacierzy oligonukleotydowych (ang. *Director's Challenge Consortium for the Molecular Classification of Lung Adenocarcinoma*) z udziałem największej dotychczas liczby chorych [92]. W badaniu tym wykorzystano próbki od 442 chorych na gruczołowego raka płuca, pochodzących z 4 północnoamerykańskich instytucji onkologicznych wiodących w dziedzinie badań translacyjnych, z których dwa centra dostarczyły próbki do stworzenia populacji *uczącej*, a dwa pozostałe do populacji *walidacyjnej*. W założeniu model rokowniczy uzyskany w populacji *uczącej* miał być uważany za klinicznie wartościowy w przypadku istotności statystycznej dla przewidywania wyniku leczenia chorych w 2 niezależnych populacjach. Jedynie 2 modele spełniły te kryterium, gdy w walidacji rozpatrywano chorych w stopniu I-III. Żaden model nie spełnił tego kryterium, gdy analizowano podgrupę chorych w stopniu I. Co ciekawe, autorzy zidentyfikowali zbiór próbek, które były właściwie kwalifikowane przez większość metod, ale także zbiór próbek „problematycznych”, które były kwalifikowane rozbieżnie przez poszczególne

modele rokownicze. Nie wiadomo, czy jest to odzwierciedlenie niejednorodności strukturalnej nowotworu (domieszki innych rodzajów tkanki: martwicy lub prawidłowego mięszu płucnego), niejednorodności ekspresji w obrębie guza, niepełnej informacji klinicznej, czy może jest to wynik niewydolności modeli rokowniczych opartych na analizie ekspresji genów metodami mikromacierzy oligonukleotydowych.

Na podstawie dotychczasowego piśmiennictwa wydaje się, że informacja o rokowaniu może być zakodowana przez wiele genów i że trafne zakwalifikowanie próbki przez większość klasyfikatorów nie musi być związane z powtarzalnością genów w obrębie poszczególnych klasyfikatorów. Ta różnorodność składu klasyfikatorów najpewniej jest związana z wysokim prawdopodobieństwem uzyskania spośród tysięcy analizowanych genów więcej niż jednej sygnatury ekspresji genów o znaczeniu rokowniczym. W wyżej wspomnianym badaniu jedynie dwa modele wykazywały częściową zgodność pod względem składu genów w klasyfikatorze, co jest zgodne z powyższą tezą. Wyjaśnia to także wielość doniesień dotyczących modeli rokowniczych. Spośród około 650 genów istotnie związanych z rokowaniem chorych na ndrp w dotychczas opublikowanych badaniach – jedynie kilka występuje w więcej niż jednym profilu.

Cytowane powyżej badanie walidacyjne można interpretować jako ograniczony sukces metody mikromacierzy oligonukleotydowych. Autorzy tego badania nie podają wyników analizy czasu wolnego od progresji w zależności od profili ekspresji ani analizy związku pomiędzy wystąpieniem przerzutów odległych i niekorzystnym profilem ekspresji, podczas gdy wyniki tych analiz stanowią w najwyższym stopniu o przydatności klinicznej modelu. Sygnatura ekspresji związana z agresywnym przebiegiem ndrp powinna przede wszystkim stwarzać możliwość przewidywania wystąpienia przerzutów odległych, które w większości przypadków są równoznaczne z niepowodzeniem leczenia.

Należy nadmienić, że powyższe twierdzenie wymaga założenia istnienia dwu mechanizmów uogólnienia procesu nowotworowego: (i) rozsiew drogą limfatyczną i tworzenie przerzutów w regionalnych węzłach chłonnych ma charakter mechanistyczny i zależy od czynnika czasu (naturalna droga szerzenia się większości nowotworów niezależnie od agresywności histologicznej) oraz (ii) tworzenia przerzutów odległych odbywa się drogą

krwionośną i zależy od agresywnego fenotypu guza pierwotnego (ekspresja genów warunkujących zdolność do rozsiewu). Zjawiska te mogą wystąpić jednocześnie lub mogą być od siebie niezależne. W przeciwieństwie do przerzutów odległych, nawroty miejscowe w łoży po usuniętym guzie pierwotnym, w sąsiadującym płacie płucnym lub w węzłach chłonnych wnęki lub śródpiersia wydają się nie zależeć (a przynajmniej nie w decydującym stopniu) od agresywnej natury guza (tendencja do rozsiewu odległego), ale raczej są wynikiem niedoszczędności chirurgicznej (nie zawsze wykrytej w badaniu histopatologicznym). Pośrednim przykładem ograniczonej wiarygodności klasycznego badania histopatologicznego w ocenie doszczędności płucnej resekcji jest częste występowanie mutacji typowych dla ndrp (*p53* i *K-ras*) w marginesie chirurgicznym [93]. W przypadku chorych na ndrp leczonych chirurgicznie, wznowy miejscowe występują w kilku do kilkunastu procentach przypadków i są związane z zakresem limfadenektomii śródpiersiowej [94]. Całkowita limfadenektomia śródpiersiowa w porównaniu z selektywną zmniejsza ryzyko wznów miejscowych z 40-50% do 10-15% [95]. W uzupełnieniu mechanizmów wznowy miejscowej poza niedoszczędnością zabiegu operacyjnego należy brać pod uwagę tzw. „pola rakowacenia” (ang. *field cancerization*). Wielu chorych wraca do palenia tytoniu po zabiegu operacyjnym. Dalsza stymulacja kancerogenami zawartymi w dymie tytoniowym może prowadzić do szybkiego rozwoju drugiego guza w sąsiedztwie lokalizacji guza pierwotnego z uwagi na występowanie stanu przedrakowego w tej okolicy. Taka wznowa także nie ma związku z agresywną naturą guza pierwotnego, a jedynie jest konsekwencją uporczywej stymulacji kancerogenami.

Odległe przerzuty występują natomiast w zależności od stopnia zaawansowania u 25-75% chorych operowanych z powodu ndrp. Z uwagi na częste występowanie i brak skutecznego leczenia rozsiewu nowotworu, całkowite przeżycie u chorych na wczesnozaawansowanego raka płuca jest przede wszystkim uwarunkowane wystąpieniem odległego nawrotu. Przewidywanie wystąpienia odległych przerzutów jest zatem najważniejszą miarą przydatności klinicznej rokowniczego testu wykrywającego agresywny fenotyp guza ndrp. Ponadto, wielu chorych po radykalnym leczeniu z powodu raka płuca umiera z innych powodów, najczęściej w następstwie towarzyszących chorób odtyniowych. Analiza czasu przeżycia całkowitego czy nawet czasu wolnego

od wznowy (bez rozważenie jej natury) w zależności od profili ekspresji genów może doprowadzić do błędnych wniosków. Brak informacji na temat przeżycia wolnego od przerzutów odległych w publikowanych analizach, może sugerować, że kryterium to nie jest powszechnie uwzględniane przy ich projektowaniu. Może to stanowić częściowe wyjaśnienie względnie niewielkiego sukcesu dotychczasowych badań nad sygnaturami rokowniczymi w raku płuca. W przypadku raka piersi modele rokownicze oparte na ekspresji genów opartych zarówno na metodzie RT-PCR, jak i mikromacierzy oligonukleotydowych są obecnie w fazie badań III fazy (badania TAILORx i MINDACT).

6.4. Rokownicze profile ekspresji genów oparte na metodzie ilościowej RT-PCR

Spośród profili ekspresji opartych na metodzie ilościowej RT-PCR przedstawiona w niniejszej pracy sygnatura jest pierwszą, która została opracowana na podstawie analizy ekspresji genów w jednorodnej grupie chorych na raka płaskonabłonkowego. Rokownicza moc 5-genowego profilu opracowanego w niniejszym badaniu (*CSF1*, *FN1*, *CA9*, *SELPG*, *ANLN*) jest porównywalna do niedawno opublikowanych sygnatur ekspresji pięciu genów [91], trzech genów [96] oraz pięciu mikroRNA [97]. Wspomniane badania dotyczyły ogółu chorych na ndrp (tj. obejmowały raka płaskonabłonkowego i raka gruczołowego). Jednocześnie z publikacją wstępnych wyników niniejszego badania [32] przedstawiono wyniki badania grupy z Uniwersytetu w San Francisco, która opracowała 4-genowy rokowniczy profil ekspresji obejmujący wyłącznie chorych na raka gruczołowego płuca [98].

Pomimo podobnego przebiegu klinicznego, rak gruczołowy i płaskonabłonkowy płuca wykazują różnice w ekspresji szeregu genów. Wykazano, że te dwa typy ndrp wykazują aktywację innych molekularnych mechanizmów kancerogenezy oraz progresji. Na przykład, raki te różnią się znacznie ekspresją genów kodujących kinazy tyrozynowe oraz enzymy metabolizmu pirymidyn [81, 99]. Różnice w ekspresji genów mogą odzwierciedlać różnice w molekularnych szlakach kancerogenezy wykorzystywanych przez różne typy ndrp.

Ponadto, różnice w ekspresji pewnych genów w typie płaskonabłonkowym i gruczołowym ndrp mogą być uwarunkowane różnym stosunkiem ilości komórek nowotworowych do podścieliska (macierzy międzykomórkowej). Wykazano, że komórki raka i podścielisko wykazują ekspresję różnych genów i aktywację różnych ścieżek molekularnych [100]. W związku z tym gen odgrywający tę samą rolę fizjologiczną w komórce ndrp, może wykazywać wyższą względną ekspresję w raku płaskonabłonkowym w porównaniu z rakiem gruczołowym. Ta sama sytuacja może dotyczyć genu związanego z rokowaniem. W konsekwencji ekspresja takiego genu może mieć znaczenie rokownicze w raku płaskonabłonkowy przy wyższym punkcie odcięcia niż w raku gruczołowym. Analiza znaczenia rokowniczego ekspresji takiego genu w połączonej populacji chorych na ndrp mogłaby doprowadzić do błędnych wniosków. Uśredniony punkt odcięcia dla ekspresji genu dla połączonych populacji chorych na raka gruczołowego i płaskonabłonkowego mógłby być powodem nie stwierdzenia faktycznie istniejącego związku ekspresji tego genu z rokowaniem poszczególnych typów ndrp. Z tych powodów w niniejszym badaniu analizę ekspresji genów przeprowadzono w jednorodnej grupie chorych na raka płaskonabłonkowego.

6.5 Potencjalne zastosowanie oceny ekspresji genów metodą RT-PCR w materiale archiwalnym utrwalonym w formalinie i parafinie

Wysoka efektywność metody RT-PCR jako podstawy rokowniczego testu w świeżo mrożonym materiale wywołała zainteresowanie możliwością zastosowania tej techniki do oceny ekspresji genów w materiale archiwalnym utrwalonym w formalinie i parafinie, który jest szerzej dostępny [101]. Szczególnie interesująca wydaje się możliwość oceny ekspresji w materiale z biopsji diagnostycznych, co umożliwiłoby zastosowanie oceny ekspresji do lepszego doboru metod terapeutycznych nie tylko u chorych leczonych chirurgicznie, ale również u chorych w wyższych stopniach zaawansowania. Ocena ekspresji genów na poziomie transkrypcji w materiale utrwalonym formaliną metodą ilościowej RT-PCR jest trudna ze względu na wysoki stopień degradacji łańcuchów mRNA [102]. Poza tym długi czas przechowywania bloków parafinowych dodatkowo pogłębia uszkodzenia mRNA. Niezależnie od

tego, w kilku badaniach wykazano możliwość oceny ekspresji genów w materiale utrwalonym w ten sposób przy zastosowaniu zestawów do oceny ekspresji opierających się na amplifikacji jak najkrótszych transkryptów (poniżej 90 nukleotydów) oraz przy wykorzystaniu wielu odpowiednio dobranych genów normalizacyjnych [101, 103]. Zastosowanie wyżej opisanych wymogów metodycznych umożliwiało również normalizację różnic w ekspresji wynikających z różnego czasu przechowywania bloczków parafinowych. Na podstawie wyników tych prac można oczekiwać, że w nieodległej przyszłości materiał parafinowy stanie się podstawą dla diagnostycznych testów opartych na ocenie ekspresji genów metodą RT-PCR.

6.6 Geny istotne z punktu widzenia określenia rokowania chorych na raka płaskonabłonkowego

Geny stanowiące podstawę zaproponowanego profilu ekspresji związanego z rokowaniem chorych na płaskonabłonkowego raka płuca: *CSF1*, *FN1*, *CA9*, *SELPG* i *ANLN* pełnią kluczową rolę w mechanizmach progresji płaskonabłonkowego raka płuca.

Wysoka ekspresja *CSF1* wykazuje związek z naciekami makrofagów w ndrp (cecha związana z niekorzystnym rokowaniem) [104]. Interakcje pomiędzy komórkami raka i makrofagami (te pierwsze wydzielają *CSF1*, a makrofagi *EGF*) na drodze pętli parakrynej (komórki raka mają na swojej powierzchni receptor dla *EGF*, zaś makrofagi receptor dla *CSF1*) nasilają inwazyjny wzrost komórek raka i tworzenia odległych przerzutów [40]. Niedawno opublikowany profil ekspresji genów dla 11 cytokin wykazujący 75% dokładność diagnostyczną dla przewidywania wyników leczenia chorych na raka gruczołowego zawiera *CSF1* [105]. Ponadto, *CSF1* wchodzi także w skład 17-genowego (cytokinowego) profilu ekspresji związanego z wysokim ryzykiem wystąpienia przerzutów odległych w raku wątrobowokomórkowym [106]. Wyniki tego badania wskazują na związek pomiędzy (indukowaną działaniem *CSF1*) zmianą ekspresji genów z „prozapalnych” typu Th1 (*TNF*, *IFN gamma* i *IL1*) na związane z odpowiedzią immunologiczną typu Th2 (*IL4*, *IL5*, *IL8* i *IL10*), z wyższą skłonnością do tworzenia przerzutów w raku wątrobowokomórkowym. Nadexpresja interleukiny 8 również w niniejszym badaniu wykazywała związek

z krótszym czasem do odległego nawrotu. W badaniach eksperymentalnych na liniach komórkowych raka piersi bez ekspresji receptorów dla hormonów płciowych wykazano, że blokowanie ekspresji IL-8 powoduje zmniejszenie inwazyjności tych komórek, lecz pozostaje bez wpływu na ich proliferację i wzrost [107].

Wysoka ekspresja genu CA9 jest składową profilu ekspresji związanego z korzystnym rokowaniem chorych na ostrą białaczkę szpikową [108]. Istnieją istotne rozbieżności co do rokowniczego znaczenia ekspresji tego białka w wielu nowotworach. W ndrp wykazano niekorzystny wpływ na rokowanie wysokiej ekspresji CA9 mierzonego metodą IHC [109, 110]. W kolejnym badaniu, nie wykazano związku wysokiej ekspresji CA9 ze złym rokowaniem w komórkach raka płuca; taką zależność stwierdzono jedynie pod względem ekspresji CA9 w fibroblastach podścieliska raka płuca (ang. cancer related fibroblasts) [111]. Rola CA9 w progresji nowotworów jest nadal nie do końca poznana – białko to odgrywa rolę w utrzymywaniu fizjologicznego pH w komórkach nowotworowych w warunkach kwasicy związanej z wytwarzaniem mleczanów przez szybko wzrastający nowotwór [112]. CA9 ulega ekspresji w wyniku aktywności czynnika transkrypcyjnego HIF1alfa, który wpływa na mechanizmy adaptacji do hipoksji poprzez nasilenie angiogenezy. W przyjętym założeniu gen CA9 jest markerem aktywności ścieżek „hipoksyjnych” zależnych od HIF1alfa. Pomimo że pobudzenie unaczynienia guza uważa się za istotny mechanizm progresji i tworzenia przerzutów [113], jednostronna rola HIF1alfa w tym procesie pozostaje kontrowersyjna. Na przykład zatrzymanie cyklu podziałowego w warunkach hipoksji poprzez indukcję p21 i p27 wymaga aktywności HIF1alfa [114]. W badaniach eksperymentalnych wykazano, że myszy transgeniczne (posiadające dodatkową kopię HIF1alfa ulegającego konstytutywnej ekspresji) w klasycznym eksperymencie kancerogenezy skórnej, rozwijają 3 razy więcej brodawczaków niż myszy z grupy kontrolnej [115]. Zaskakująco jednak, brodawczaki te 7-krotnie rzadziej niż w grupie kontrolnej ulegały progresji do raka. W badaniu tym okazało się także, że konstytutywna ekspresja HIF1alfa przeciwdziałała rozwojowi niezróżnicowanych raków oraz powodowała niewystępowanie w guzach cech EMT. Można zatem sądzić, że molekularne ścieżki „hipoksyjne” zależne od HIF1alfa, warunkują co prawda angiogenezę i wzrost guza, jednak również warunkują wysokie zróżnicowanie

histologicznego komórek raka oraz brak występowania zjawiska EMT, co w końcowym efekcie może przeciwdziałać progresji tych guzów. Wyniki niniejszego badania wydają się pozostawać w zgodzie ze złożoną funkcją HIF1alfa - wysoką ekspresję anhidrazy węglanowej 9. stwierdzono w guzach nie wykazujących tendencji do tworzenia przerzutów. Brak ekspresji CA9 w guzach chorych, u których stwierdzono przerzuty odległe można interpretować jako wyraz efektywnej adaptacji komórek nowotworowych do warunków hipoksji (być może wykorzystywania efektywniejszych szlaków metabolicznych) lub jako przejaw zniesienia sygnału „stresu hipoksyjnego” realizowanego przez HIF1alfa.

Fibronektyna została zidentyfikowana jako gen wchodzący w skład profilu ekspresji związanego z rokowaniem chorych na rozlanego chłoniaka złośliwego z dużych komórek B [51]. Produkt tego genu jest glikoproteiną tworzącą macierz międzykomórkową i często ulega ekspresji w chorobach związanych z paleniem tytoniu. Ponadto, wykazano, że fibronektyna stymuluje wzrost raka płuca poprzez wiązanie się z receptorem $\alpha 5\beta 1$ integryny, co powoduje wzrost transkrypcji genu dla MMP-9 (poprzez aktywację białka c-fos i ścieżki zależne od ERK i PI3K). Aktywacja MMP-9 nasila inwazyjność, proliferację i tworzenie przerzutów ndrp [116]. W niniejszym badaniu wysoka ekspresja *FN1* była silnie związana ze złym rokowaniem chorych na raka płaskonabłonkowego, natomiast nie stwierdzano takiej zależności dla ekspresji genu *MMP-9*. W badaniu, w którym poszukiwano sygnatury ekspresji genów związanej z opornością raka piersi na tamoksyfen, wykazano, że 9% takiego profilu stanowiły geny kodujące elementy macierzy międzykomórkowej (ang. ECM – *extracellular matrix*) [117]. Wartość rokownicza ekspresji 6 genów: *COL1A1*, *FN1*, *LOX*, *SPARC*, *TIMP3* i *TNC* (mRNA) została zweryfikowana w badaniu z udziałem 1286 chorych na raka piersi. Podobnie jak w niniejszym badaniu, wysoka ekspresja *FN1* była znamienne związane z krótszym przeżyciem wolnym od przerzutów odległych zarówno w populacji chorych bez przerzutów do pachowych węzłów chłonnych nie otrzymujących systemowego leczenia pooperacyjnego, jak i u chorych, które otrzymały po zabiegu tamoksifen [118]. Powyższe badanie jest istotne także z racji na swoją skalę – analiza ekspresji genów na poziomie mRNA w próbkach od ponad tysiąca chorych w pełni wykazała przydatność metody RT-PCR jako podstawy testu rokowniczego.

ANLN jest genem związanym z rodziną białek Rho, które realizują potencjał mobilności komórek nowotworowych. W raku płuca w analizie ekspresji białek metodą mikromacierzy tkankowych (ang. *tissue microarray*) wykazano, że wysoka ekspresja ANLN wiąże się z podwyższonym ryzykiem nawrotu z powodu raka płuca [62]. Podobnie w analizie różnic w ekspresji genów metodą mikromacierzy oligonukleotydowych pomiędzy rakiem prostaty opornym na leczenie hormonalne i wrażliwym na takie leczenie wykazano podwyższoną ekspresję ANLN w grupie chorych nie odpowiadających na leczenie hormonalne, a więc w grupie chorych z agresywniejszą postacią choroby [119]. PAI-1 jest uznanym czynnikiem rokowniczym w raku przewodowym piersi, zarówno u chorych z przerzutami, jak i bez przerzutów do pachowych węzłów chłonnych [120].

Stwierdzone w niniejszym badaniu zależności pomiędzy ekspresją poszczególnych genów odzwierciedlają znane molekularne mechanizmy kancerogenezy i, pośrednio, mogą stanowić dowód prawidłowości wyboru metody RT-PCR jako podstawy testu klinicznego w ocenie ryzyka nawrotu ndrp. Np. odwrotna zależność pomiędzy ekspresją *CA9* i *PH-4* jest uzasadniona w kontekście mechanizmów regulacji ścieżek „hipoksyjnych” zależnych od HIF1 α . Wysoka aktywność (ekspresja) PH-4 prowadzi do inaktywacji HIF1 α , czego skutkiem jest brak ekspresji *CA9* (gen efektorowy HIF1 α). Z kolei prosta zależność pomiędzy ekspresją: *CSF1* i *EGFR* jest zgodna z postulowanym patomechanizmem tworzenia odległych przerzutów (oddziaływania pomiędzy komórkami raka i makrofagami podścieliska na drodze pętli parakrynej CSF1/EGFR).

6.7 Nowe formy systemowego leczenia uzupełniającego leczenie chirurgiczne w ndrp

Leczenie pooperacyjne może się przyczynić do zmniejszenia odsetka nawrotów odległych po leczeniu chirurgicznym ndrp. Niepełne zrozumienie mechanizmów tworzenia odległych przerzutów uniemożliwia stosowanie swoistych form takiego leczenia. Nie ulega wątpliwości, że wykorzystywane obecnie w pooperacyjnym leczeniu związki cytotoksyczne nie przeciwdziałają swoiście tworzeniu przerzutów odległych. W związku z tym poszukuje się molekularnie

ukierunkowanych metod inaktywacji mechanizmów rozsiewu, na przykład poprzez blokowanie ekspresji genów związanych z powstawaniem przerzutów. W założeniu terapie takie miałyby być wdrażane w momencie rozpoznania raka płuca w zaawansowaniach I-III B jako profilaktyka przerzutów odległych. Wyniki niniejszego badania wskazują na rokownicze znaczenie kilku genów, które mogłyby stać się celem zarówno pooperacyjnych, jak i przedoperacyjnych terapii celowanych. W analizie jednoczynnikowej czasu wolnego od odległego nawrotu wykazano, że wysoka ekspresja liganda dla selektyny-P wiąże się ze znamienne krótszym MFS. Obserwacja ta jest zgodna z wielokrotnie opisywanym związkiem pomiędzy ekspresją P- i L-selektyn a zwiększonym potencjałem do tworzenia przerzutów odległych w mysich modelach progresji [75]. Selektyny znajdują się na powierzchni śródbłonna, płytek oraz leukocytów i wiążą się z sialylowanymi, fukozylowanymi i sulfonylowanymi ligandami, które znajdują się fizjologicznie na powierzchni śródbłonna oraz płytek, ale również na powierzchni komórek nowotworowych. Wykazano, że raki, w których występuje wysoka ekspresja proteoglikanów o rozgałęzionych resztach cukrowych lub mucyny, charakteryzują się gorszym rokowaniem oraz zwiększoną tendencją do rozsiewu drogą krwionośną [121]. Tworzenie mikroagregatów z komórek raka i płytek oraz fibryny wydaje się zapewniać komórkom nowotworowym ochronę przed reakcją ze strony układu immunologicznego oraz fizykochemicznym stresem, któremu podlegają w układzie krążenia [121]. W wielu klasycznych badaniach na zwierzęcych modelach progresji wykazano hamujący wpływ drobnocząsteczkowych heparyn na tworzenie przerzutów odległych [122]. Efekt ten potwierdzono w kilku badaniach klinicznych [123-125]. W metaanalizie badań z bazy danych Cochrane'a wynika, że antymetastatyczny efekt heparyn jest bardziej wyrażony w rakach niezaawansowanych w porównaniu z rakami w stadium rozsiałym, przy czym najwyższy efekt obserwowano w drobnokomórkowym raku płuca w stadium choroby ograniczonej [126]. Jednym z ważniejszych mechanizmów tego działania jest blokowanie połączeń pomiędzy selektyną-P a jej naturalnym ligandem, który podobnie jak heparyny zawiera reszty sialylowe oraz siarczyny tyrozyny o ujemny ładunku [76]. Inne leki przeciwkrzepliwie, na przykład: warfaryna, nie wykazywały aktywności blokującej tworzenie przerzutów, co sugeruje, że działanie antykoagulacyjne nie jest kluczowe dla

przeciwwmetastatycznego efektu heparyn. Obecnie wiadomo, że heparyna poza działaniem przeciwkrzepliwym wywiera szereg innych efektów, jak na przykład: modulacja czynników wzrostu, blokowanie angiogenezy poprzez oddziaływanie z VEGF oraz blokowanie aktywności heparynazy – enzymu ułatwiającego komórkom raka przekraczanie błony podstawnej naczyń krwionośnych. Zakres stężeń heparyn drobnokomórkowych w surowicy blokujący interakcje pomiędzy P-selektyną a jej ligandem odpowiada zakresowi stężeń terapeutycznych stosowanych w leczeniu choroby zatorowo-zakrzepowej [76].

Kolejnym genem istotnie związanym z rokowaniem chorych na płaskonabłonkowego raka płuca jest *CSF1*. Receptor dla *CSF1* (c-Fms) zawiera w swej strukturze kinazę tyrozynową. Imatynib (Gleevec®), inhibitor kinaz tyrozynowych: Bcr/Abl, c-Kit i PDGFR wykazuje również aktywność wobec c-Fms; istnieją także specyficzne inhibitory tego receptora, na przykład, Ki-20227. Najnowsze badania sugerują, że blokowanie c-Fms zmniejsza ryzyko powstawania przerzutów raka piersi do kości w mechanizmie blokowania osteoklastów, które są aktywowane przez ten receptor kinazowy [127]. Ponadto imatinib blokuje wzrost niektórych szpikowych linii komórkowych, m.in. monocytów i makrofagów [128]. Potencjalnie istotna rola makrofagów w progresji i tworzeniu przerzutów litych nowotworów mogłaby uzasadniać strategię wykorzystania tych leków w profilaktyce rozsiewu raka płuca po ustaleniu rozpoznania. Inną możliwością jest wykorzystanie inhibitorów pętli parakrynej *CSF1/EGFR* w leczeniu adjuwantowym [45]. W niniejszym badaniu wysoka ekspresja EGFR wiązała się nieznamiennie z gorszym rokowaniem chorych na ndrp. Wiadomo natomiast, że wysoka ekspresja EGFR na poziomie mRNA lub amplifikacja kopii genu (FISH) ma znaczenie predykcyjne dla terapii inhibitorami EGFR [129]. Przykładem próby wykorzystania leczenia ukierunkowanego molekularnie w terapii uzupełniającej jest badanie RADIANT, w którym chorzy w stopniu IB-IIIa otrzymują drobnocząsteczkowy inhibitor kinazy tyrozynowej EGFR (Erlotinib®) przez 2 lata od zabiegu operacyjnego. W związku z rokowniczym znaczeniem nadekspresji VEGF istotna jest rola czynników antyangiogennych w ndrp. Koncepcja blokowania wzrostu unaczynienia guza powstała już w latach 70 ubiegłego wieku. Wiedza o kluczowej roli VEGF i VEGFR2 w angiogenezie pozwoliła oczekiwać, że inhibitory tych białek (bevacyzumab, sorafenib czy sunitinib) będą idealnym

lekami przeciwnowotworowymi. W istocie w wielu zaawansowanych nowotworach wykazano ich skuteczność wyrażoną poprawą przeżyć całkowitych lub czasu do progresji, lecz najczęściej efekt ten był niewielki – od kilku tygodni do kilku miesięcy [130]. Paradoksalnie, w zwierzęcych modelach wykazano, że inhibitory VEGF prowadząc do zahamowania wzrostu guza, zwiększają jego inwazyjności i potencjał tworzenia przerzutów odległych [131]. Stanowi to w dużym stopniu wyjaśnienie dla umiarkowanego sukcesu tych substancji w badaniach klinicznych.

6.8 Podsumowanie

Podsumowując, opracowane profile ekspresji pięciu i dwu genów wiążą się ze zwiększonym ryzykiem tworzenia odległych przerzutów i niekorzystnym rokowaniem chorych na wczesnozaawansowanego płaskonabłonkowego raka płuca. Modele zostały pozytywnie zweryfikowane w niezależnej populacji chorych na raka płaskonabłonkowego płuca w stopniu I–II. Test oparty na analizie ekspresji tych genów może się stać podstawą kwalifikowania chorych na płaskonabłonkowego raka płuca do uzupełniającej chemioterapii lub innych bardziej swoistych terapii adjuwantowych (przeciwciała, inhibitory drobnocząsteczkowe). Wartość rokownicza profilu ekspresji jako podstawa do leczenia uzupełniającego powinna zostać zweryfikowana w ramach ekstensywnej walidacji przedklinicznej – obejmującej materiał od kilkuset chorych z uwzględnieniem pozostałych typów histologicznych nrdp. Końcowym etapem tego rodzaju badań jest prospektywne badanie kliniczne skuteczności rokowniczego testu molekularnego jako podstawy kwalifikacji chorych do terapii uzupełniających. Interesujące jest również predykcyjne znaczenie ekspresji badanych genów – kwestia, która może znaleźć rozstrzygnięcie w randomizowanym badaniu klinicznym z udziałem systemowych metod leczenia uzupełniającego.

7. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonego badania postawiono następujące wnioski:

1. Metoda ilościowej RT-PCR może stanowić podstawę dla laboratoryjnego testu opartego na analizie ekspresji genów w mrożonych wycinkach z guzów pierwotnych płaskonabłonkowego raka płuca.
2. Wykazano, że 5-genowy profil ekspresji (*CSF1*, *CA9*, *ANLN*, *SELPG* i *FN1*) może stanowić podstawę przewidywania uogólnionego nawrotu oraz złego rokowania u chorych na wczesnozaawansowanego płaskonabłonkowego raka płuca.
3. Wykazano ponadto, że inne profile ekspresji genów mogą być brane pod uwagę w przewidywaniu niekorzystnego rokowania w tej grupie chorych (model 2-genowy: *CSF1* i *CA9*).
4. Wśród klinicznych czynników, średnica guza pierwotnego jest niezależnym czynnikiem rokowniczym w grupie chorych na płaskonabłonkowego raka płuca w stopniu I i II.

Załącznik 1

Praca mieści się w nurcie badań nad molekularnymi testami rokowniczymi, które mogłyby umożliwić rozróżnienie pomiędzy chorymi na płaskonabłonkowego raka płuca o wysokim ryzyku odległego nawrotu po leczeniu chirurgicznym a chorymi z niskim ryzykiem. Praktycznym zastosowaniem takiego testu mogłaby być kwalifikacja do systemowego leczenia uzupełniającego (chemioterapią lub leczeniem ukierunkowanym molekularnie).

Dotychczasowa kwalifikacja do leczenia uzupełniającego oparta jest na ocenie zaawansowania choroby według skali TNM - chorzy w stopniu II i IIIA są kwalifikowani do takiego leczenia natomiast chorzy w stopniu I są leczeni wyłącznie operacyjnie. Jednak u 25% chorych w stopniu IA i 40% w stopniu IB obserwuje się nawrót choroby w formie przerzutów odległych. Istnieje więc grupa chorych wysokiego ryzyka w I stopniu zaawansowania, którzy mogliby odnieść korzyść z uzupełniającej chemioterapii. Przeciwnie, około 40% chorych w stopniu II nie rozwija przerzutów odległych po doszczętnej resekcji guza i nie odnosi dodatkowej korzyści z leczenia uzupełniającego.

W ciągu kilku ostatnich lat opublikowano szereg doniesień na temat możliwości oceny indywidualnego ryzyka nawrotu za pomocą analizy ekspresji genów technikami biologii molekularnej. Najbardziej obiecującymi technologiami okazały się mikromacierze oligonukleotydowe oraz ilościowa RT-PCR.

Celem opisywanego badania było określenie profilu ekspresji genów związanego z rokowaniem chorych na podtyp płaskonabłonkowy raka płuca leczonych operacyjnie.

Analizowano ekspresję 29 genów związanych z progresją choroby i tworzeniem przerzutów odległych. Liczbę kopii mRNA badanych genów mierzono metodą ilościowej RT-PCR (reakcja odwrotnej transkryptazy i reakcji łańcuchowej polimerazy). Materiał do analiz stanowiły świeżo mrożone wycinki z guza. RNA było izolowane z preparatów zawierających przynajmniej 60% procent tkanki nowotworowej na przekroju. Stężenie RNA określono przy użyciu technologii Nano-Drop; jakość RNA potwierdzono na żelu agarozowym oraz w urządzeniu Bioanalyzer (Agilent). 1 µg RNA przepisywano do cDNA przy użyciu High

Capacity Kit (AppliedBiosystems). Reakcje RT-PCR prowadzono w systemie kart mikrocieczowych TLDA w cyklerze HT7900 (AppliedBiosystems).

Badaniem objęto 93 chorych z rozpoznaniem raka płaskonabłonkowego płuca. Rokowniczy profil ekspresji generowano w grupie *uczącej* 66 chorych w I-IIIa st. zaawansowania, operowanych w Klinice Chirurgii Klatki Piersiowej AMG. Trzydziestu trzech chorych rozwinęło przerzuty odległe po doszczętnej resekcji guza; u pozostałych 33 chorych nie obserwowano nawrotu choroby po medianie obserwacji 61 miesięcy. Na podstawie analizy jednoczynnikowej i wieloczynnikowej przeżycia wolnego od odległego nawrotu w zależności od ekspresji genów, wyłoniono grupę genów znamienne związane z rokowaniem chorych. Utworzony indeks ryzyka obliczany na podstawie ekspresji 5 genów (*CSF1*, *CA9*, *FN1*, *ANLN* i *SELPG*) charakteryzował się wysoką wartością określenia rokowania chorych z grupy *uczącej* (log-rank, $p=0,00021$). W analizie wieloczynnikowej przeżycia wolnego od nawrotu odległego uwzględniającej czynniki kliniczne jak: stopień zaawansowania, stopień zróżnicowania histologicznego, płeć, średnica guza oraz molekularny indeks ryzyka, niezależnymi czynnikami rokowniczymi okazały się średnica guza ($p=0,014$) oraz 5-genowy indeks ryzyka ($p<0,0001$).

Kolejno, indeks ryzyka został poddany walidacji w niezależnej grupie 27 chorych z rozpoznaniem raka płaskonabłonkowego w st I i II z Autonomicznego Uniwersytetu w Madrycie (Hiszpania), Akademii Medycznej w Gdańsku oraz Akademii Medycznej w Białymstoku – grupa *walidacyjna*. Indeks ekspresji oparty na analizie ekspresji 5 genów był znamienne związane z przeżyciem wolnym od nawrotu odległego w tej grupie chorych (log-rank, $p=0,008$). Ponadto wykazano, że indeks ryzyka oparty na analizie ekspresji 2-genów (*CSF1* i *CA9*) jest również znamienne związane z rokowaniem w obu tych grupach chorych (log-rank, odpowiednio $p=0,01$ i $p=0,008$).

W wyniku przeprowadzonego badania określono dwa profile ekspresji genów związane z rokowaniem chorych na płaskonabłonkowego raka płuca leczonych operacyjnie. W kolejnym etapie badań profile te będą poddane ocenie przydatności klinicznej w rozszerzonym przedklinicznym badaniu walidacyjnym i kolejno w klinicznym badaniu prospektywnym III fazy z udziałem metod leczenia uzupełniającego.

9. Summary

This translational study aimed to define a molecular prognostic test which could differentiate between squamous cell lung cancer patients at high risk for distant relapse after surgery and those at low risk. The potential application of such a test would be an accurate qualification of lung cancer patients for adjuvant systemic treatment based on the individual relapse risk.

Thus far, adjuvant chemotherapy treatment decision is based on TNM criterion. Stage II and IIIA patients are administered cis-platin based adjuvant chemotherapy, whereas stage I patients are treated with surgery only. However, 25% stage IA and 40% stage IB patients develop distant metastases after radical tumor excision. This subgroup of high risk stage I patients could potentially derive benefit from adjuvant chemotherapy. On the contrary, around 40% stage II patients never relapse and thus is treated with chemotherapy without benefit.

In the last couple of years, it was shown that individual risk of relapse may be estimated by means of gene expression analysis. The molecular methods that are best suited to this purpose are oligonucleotide microarrays and quantitative RT-PCR.

The aim of this study was to develop a prognostic test for squamous cell lung cancer patients that could predict individual risk of relapse.

The expression of 29 genes potentially related to disease progression was analyzed. To this end, mRNA copy number in frozen squamous cell lung cancer tissue was measured by quantitative RT-PCR. RNA was isolated from sections proven to contain at least 60% of viable cancer tissue. Concentration of RNA was assessed with the use of Nano-Drop technology, and the RNA quality was confirmed on agarose gel and in Bioanalyzer (Agilent). 1 µg RNA was transcribed into cDNA with a High Capacity Kit (AppliedBiosystems). RT-PCR reactions were carried out in TLDA microfluidic system (Appliedbiosystems) in a HT7900 cycler (AppliedBiosystems).

The study comprised 93 patients with squamous cell lung cancer. The prognostic gene expression profile was generated in the group of 66 stage I-III A

patients treated surgically in the Thoracic Surgery Department of the Medical University of Gdansk (Poland). Of those 33 patients developed distant metastases after complete tumor resection whereas the remaining 33 patients were free of relapse after a median of follow-up of 61 months. Based on the univariate and multivariate analyses of the distant metastases free survival (MFS) according to gene expression, genes shown to be statistically related to prognosis were selected. The risk score based on a 5-gene expression profile (*CSF1*, *CA9*, *FN1*, *ANLN* and *SELPG*) was shown to be highly statistically related to metastasis free survival in the training group (log-rank, $p=0,00021$). In the multivariate analysis of the distant metastases free survival that took into account: stage, grade, sex, tumor diameter and 5-gene expression risk score, tumor diameter and 5-gene risk score emerged as independent prognostic factors ($p=0,014$ and $p<0,0001$, respectively).

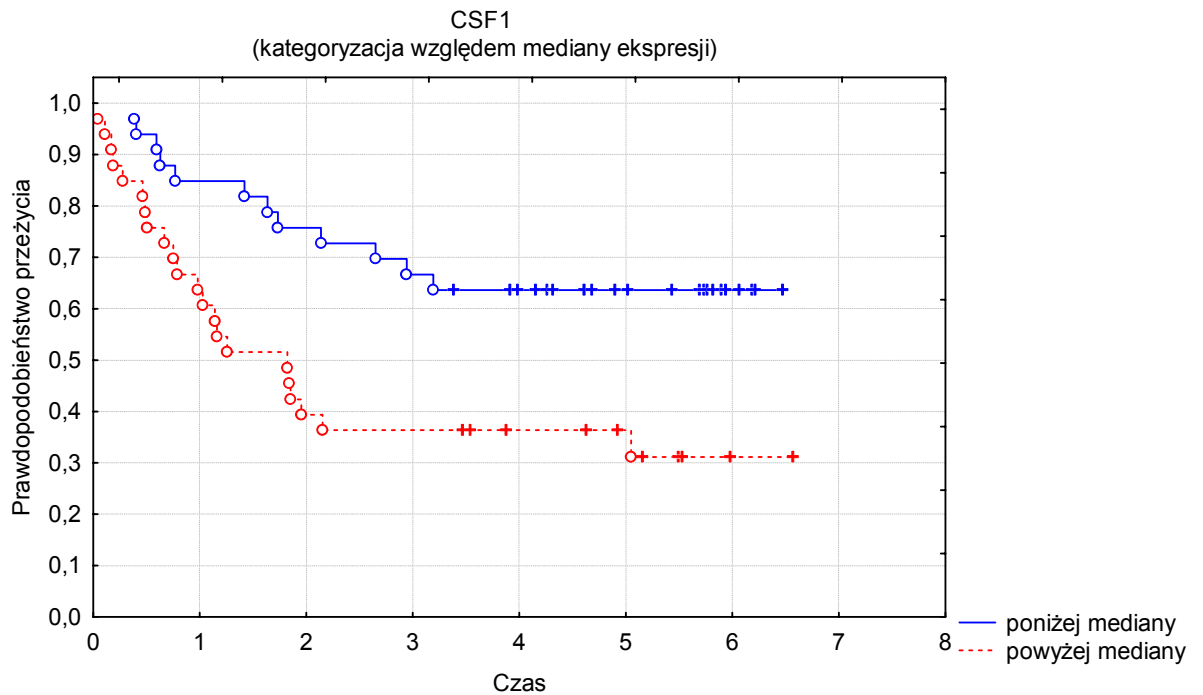
Subsequently, the risk score was positively validated in an independent group of 27 stage I-II squamous cell lung cancer patients. The validation group consisted of patients from The Autonomous University of Madrid (Spain), The Medical University of Gdańsk (Poland) and the Medical University of Białystok (Poland). The risk score based on the expression of those 5 genes was strongly related to metastasis free survival in the validation group (log-rank, $p=0,008$). Moreover, the risk score based on the expression of 2 genes (*CSF1* and *CA9*) was also significantly related to outcome in those 2 groups of patients ($p=0,01$ and $p=0,008$, respectively).

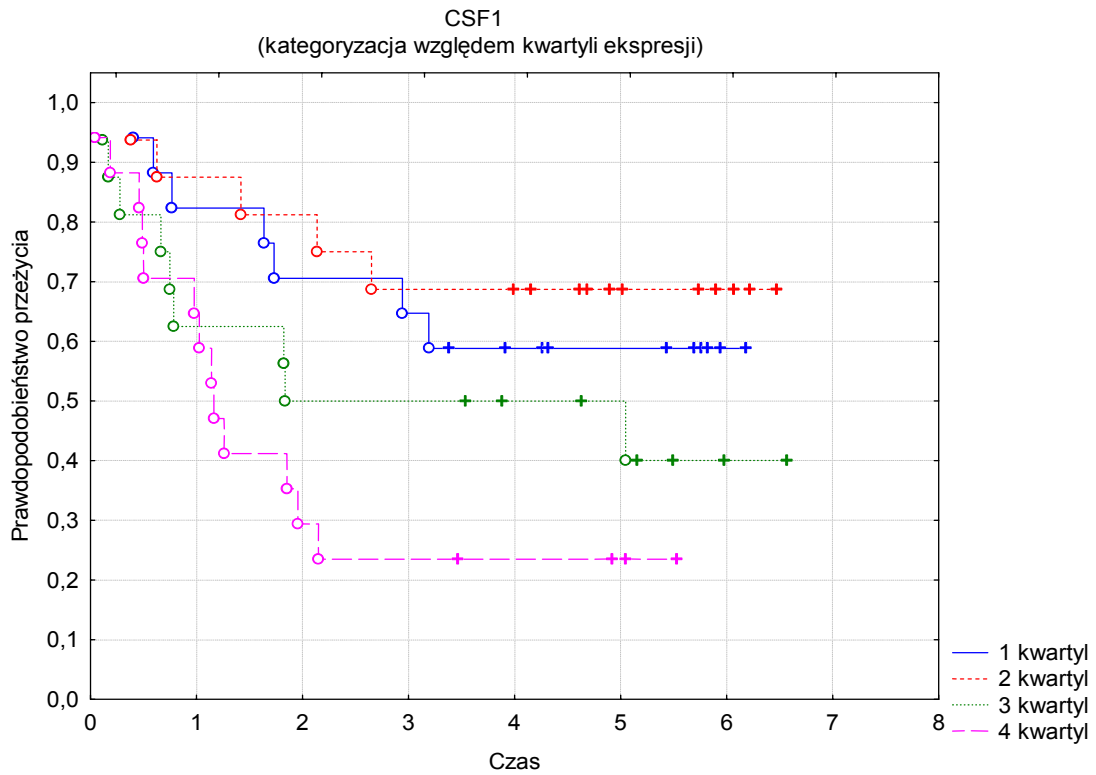
As a result of this research the 5-gene expression profile was determined that is strongly associated with distant metastases free survival and outcome of patients with squamous cell lung cancer. The next step would be an extensive preclinical validation of the results and a prospective trial with the use of systemic adjuvant treatment.

Załącznik 1.

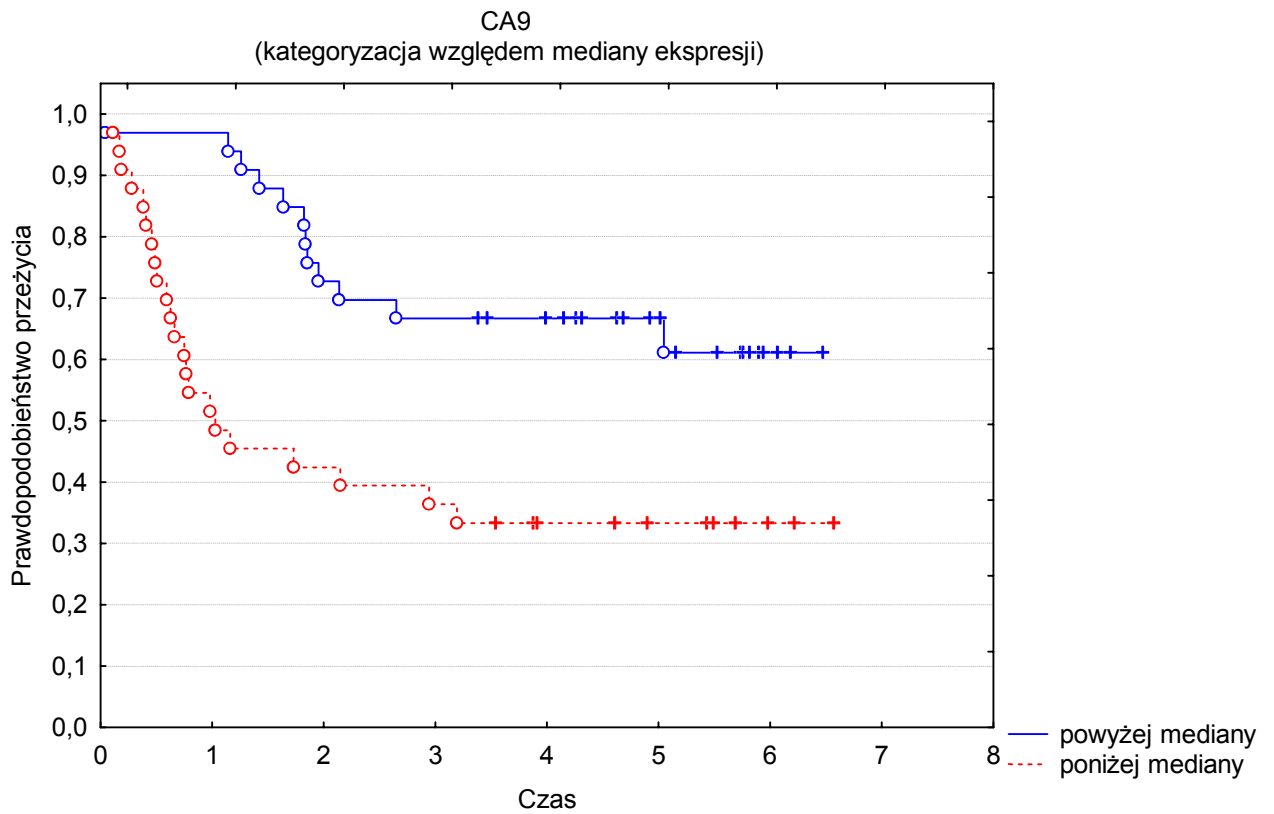
Rycina 1. Czas przeżycia wolnego od nawrotu odległego jako zmienna zależna od wartości ekspresji poszczególnych genów kategoryzowanej względem mediany i kwartyli ekspresji. (A) CSF1; (B) CA9; (C) FN1; (D) ANLN; (E) SELPG; (F) VEGF C, (G) RHO GDI β ; (H) PAI-1; (I) KIAA 0974; (J) INSR; (K) PH-4; (L) Vii2 ;(M) SELL; (N) PDPN.

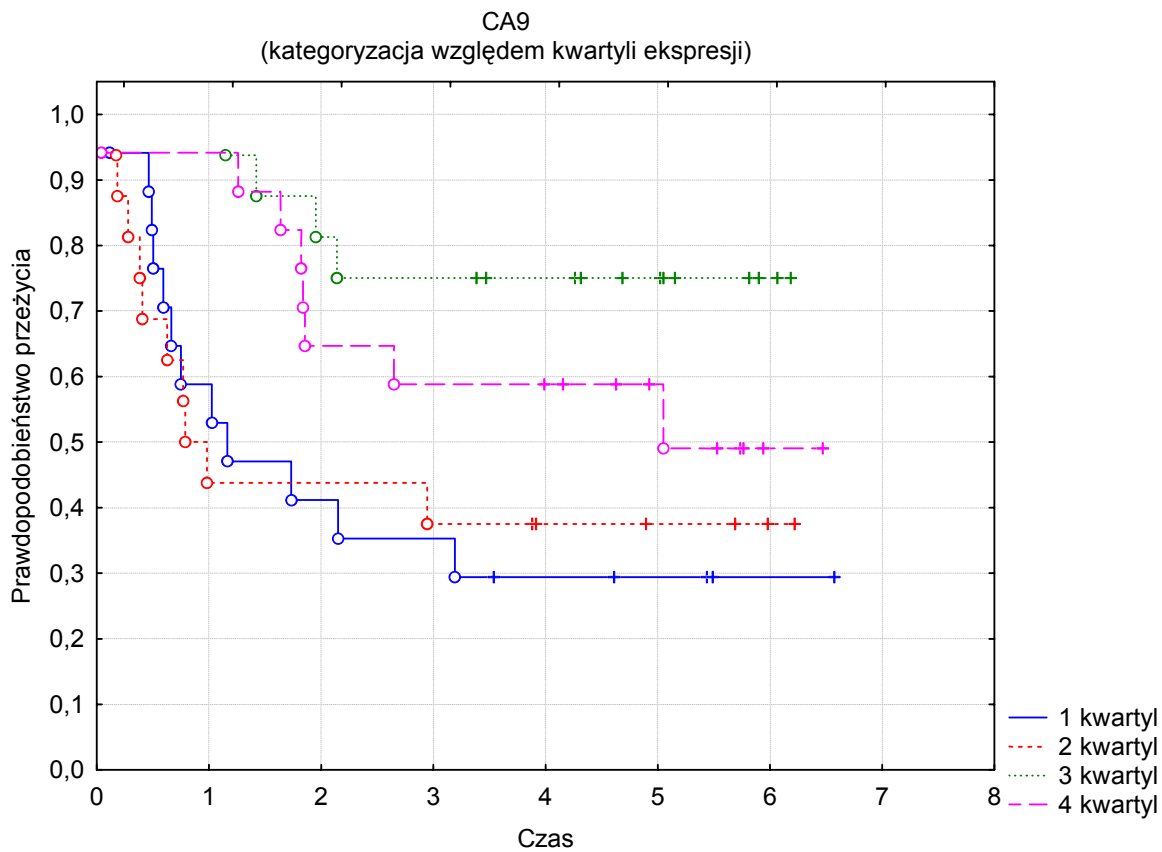
(A)



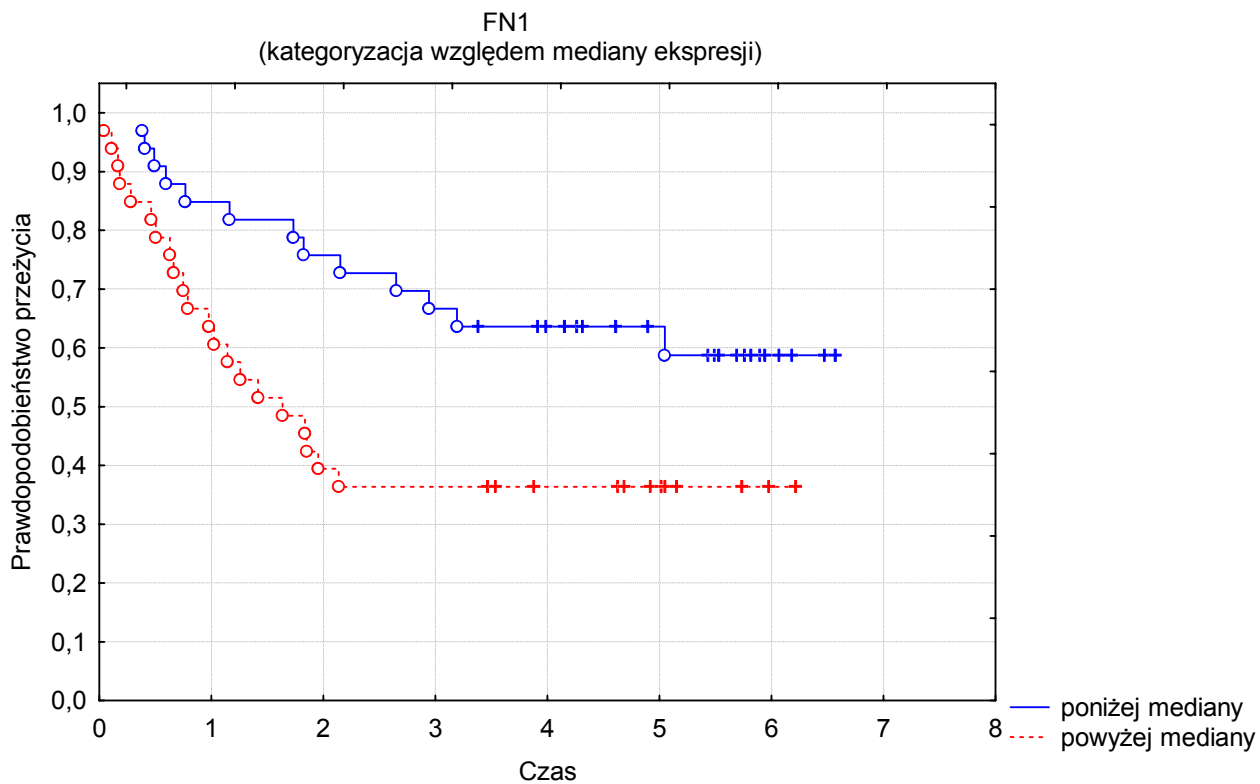


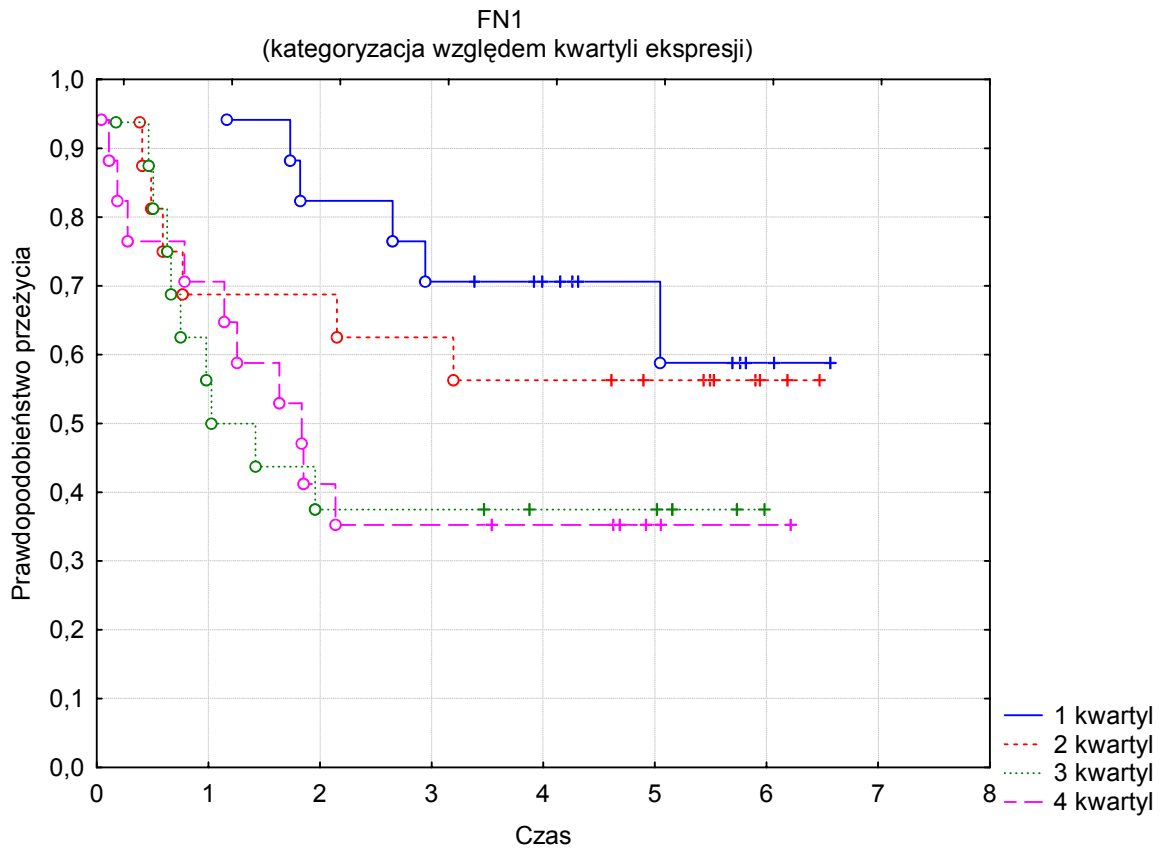
(B)



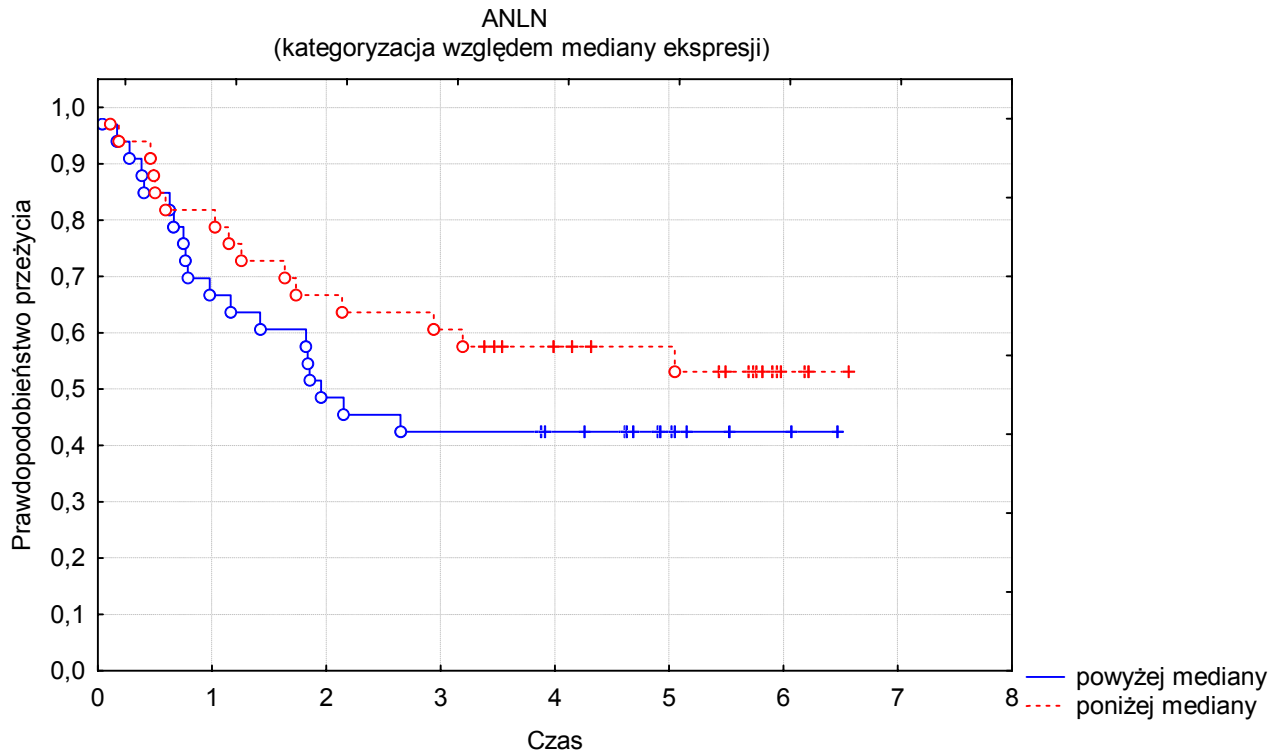


(C)

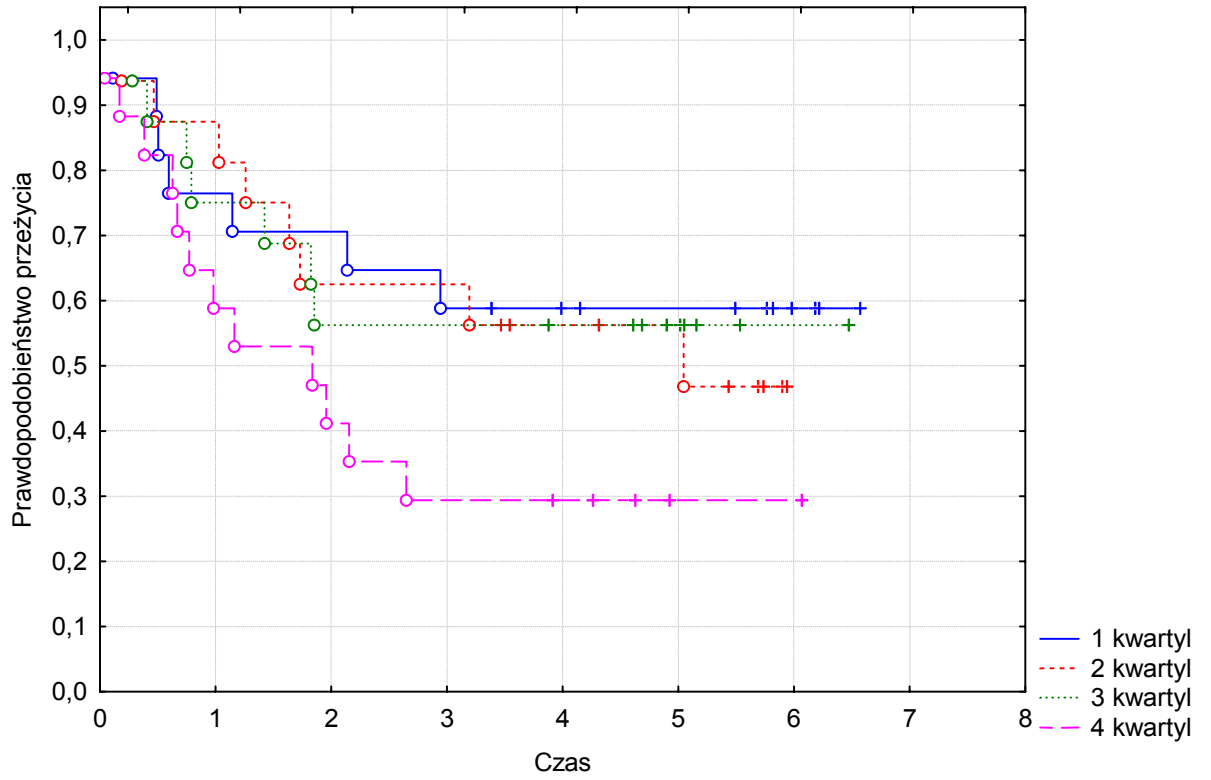




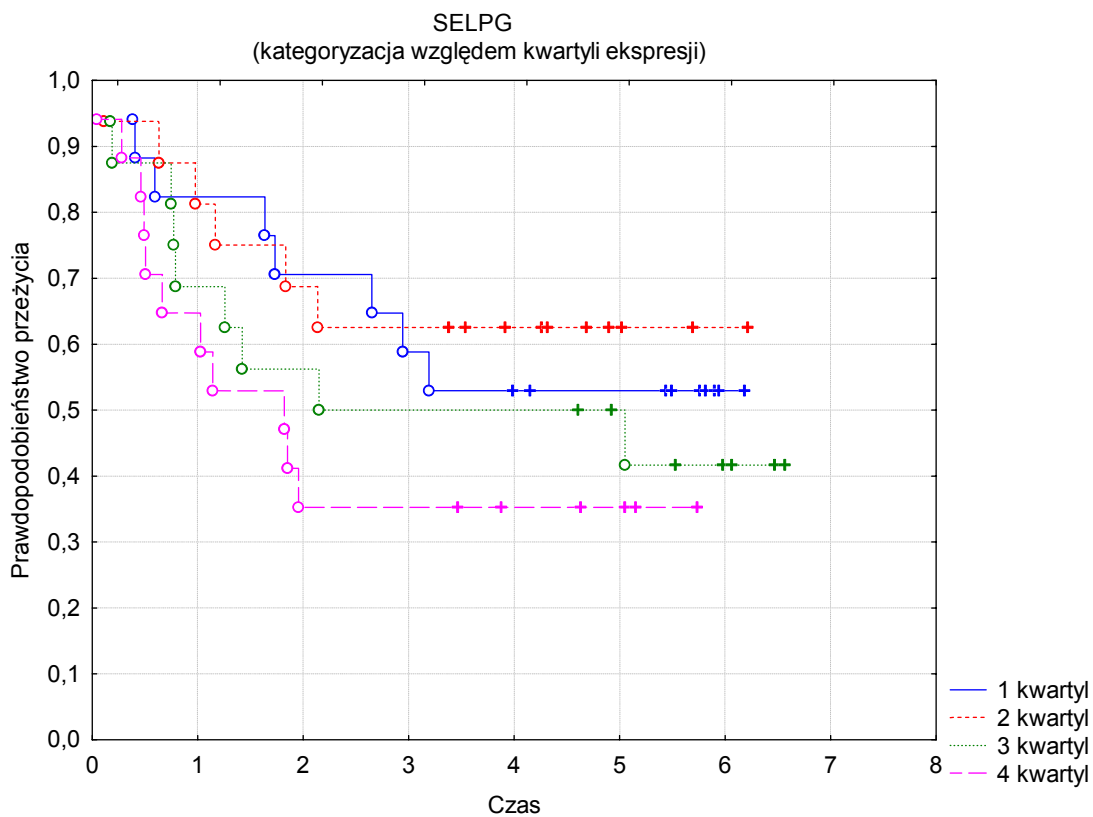
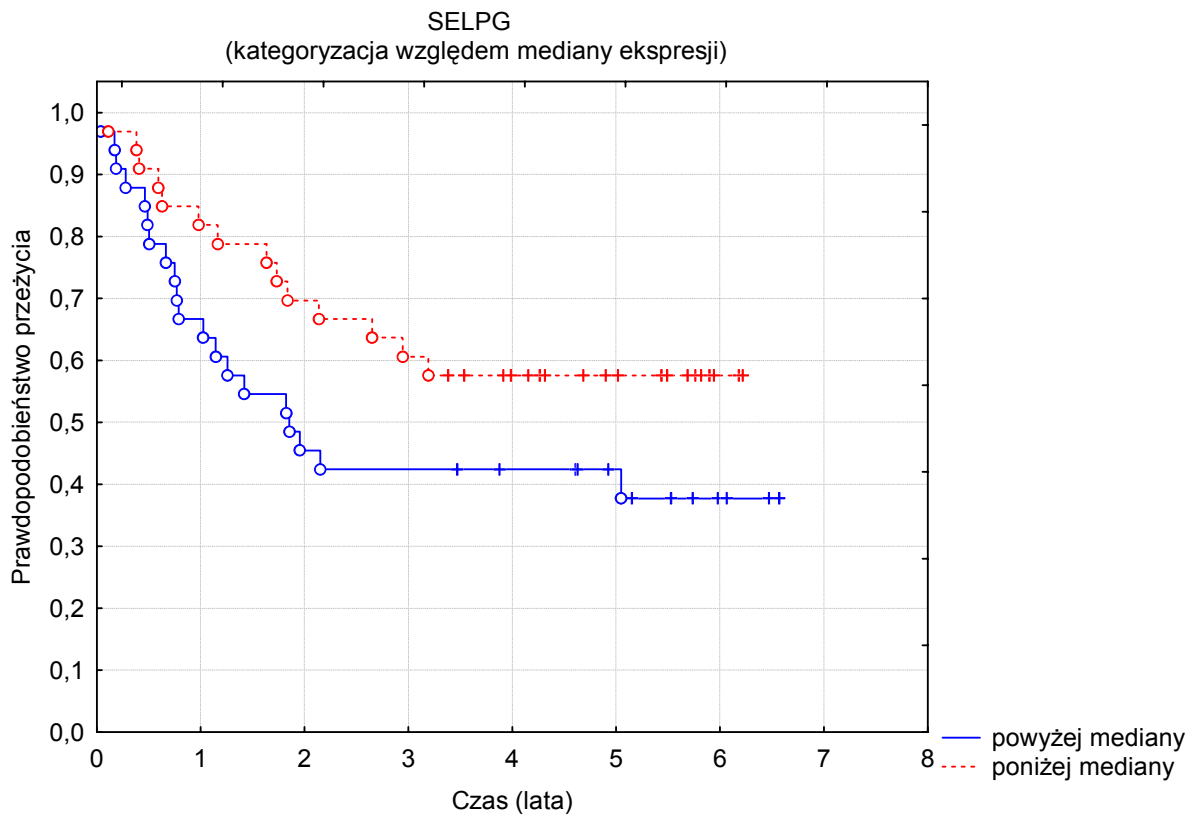
(D)



ANLN
(kategoryzacja względem kwartyli ekspresji)

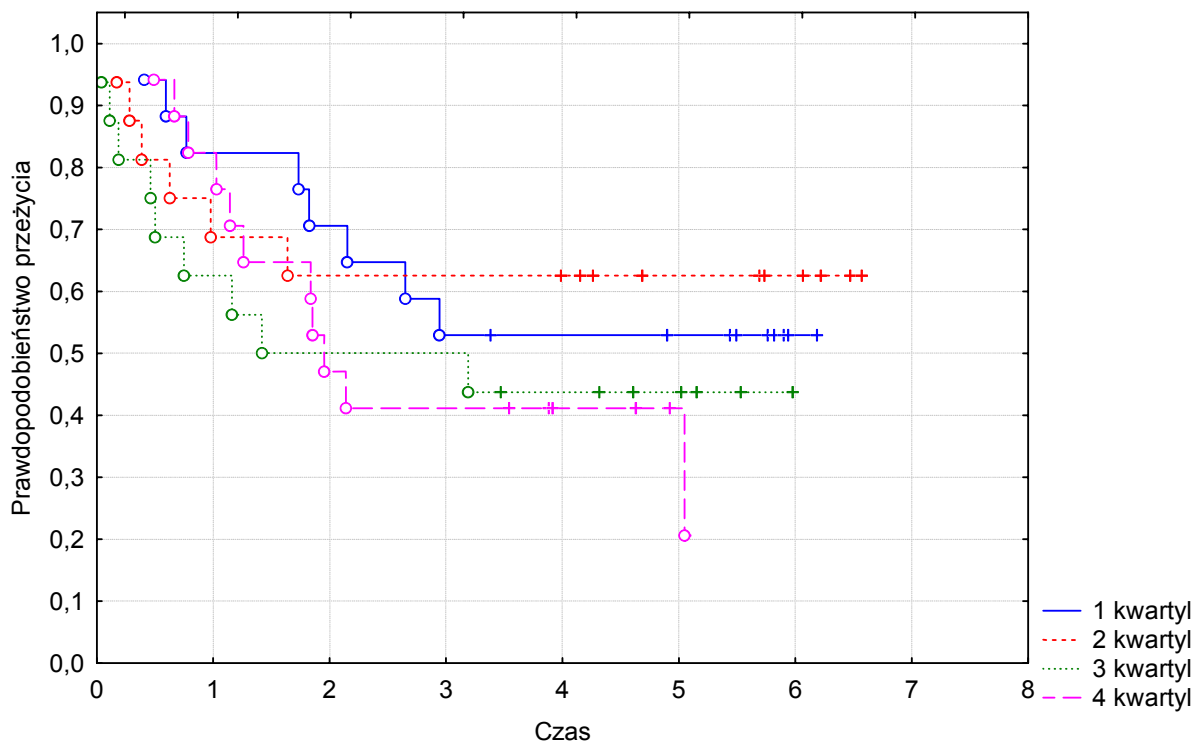


(E)



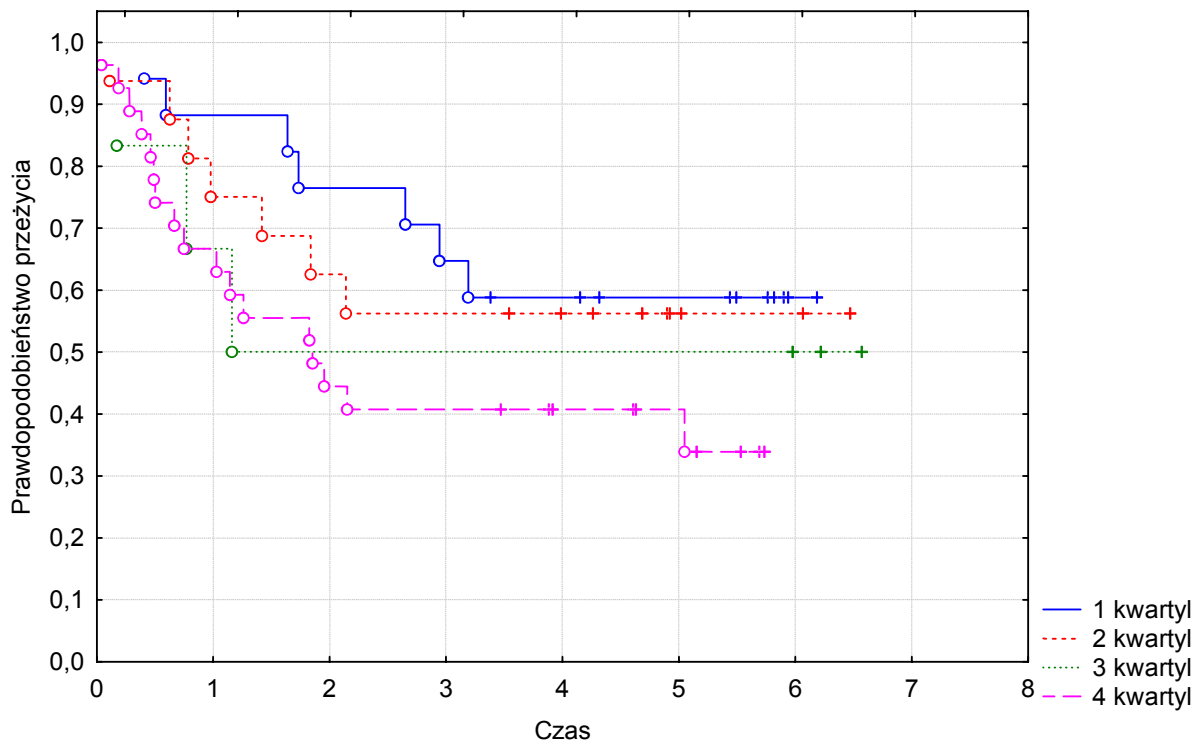
(F)

VEGF C
(kategoryzacja względem kwartyli ekspresji)

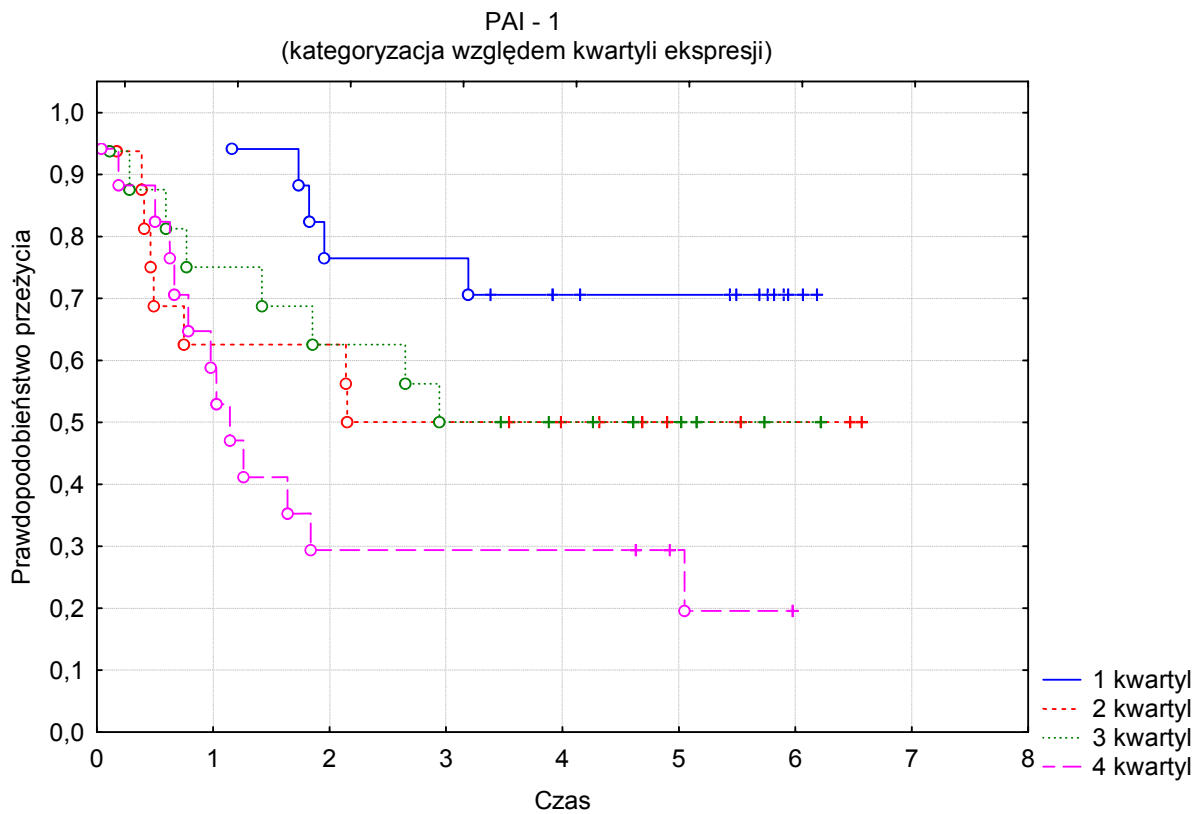


(G)

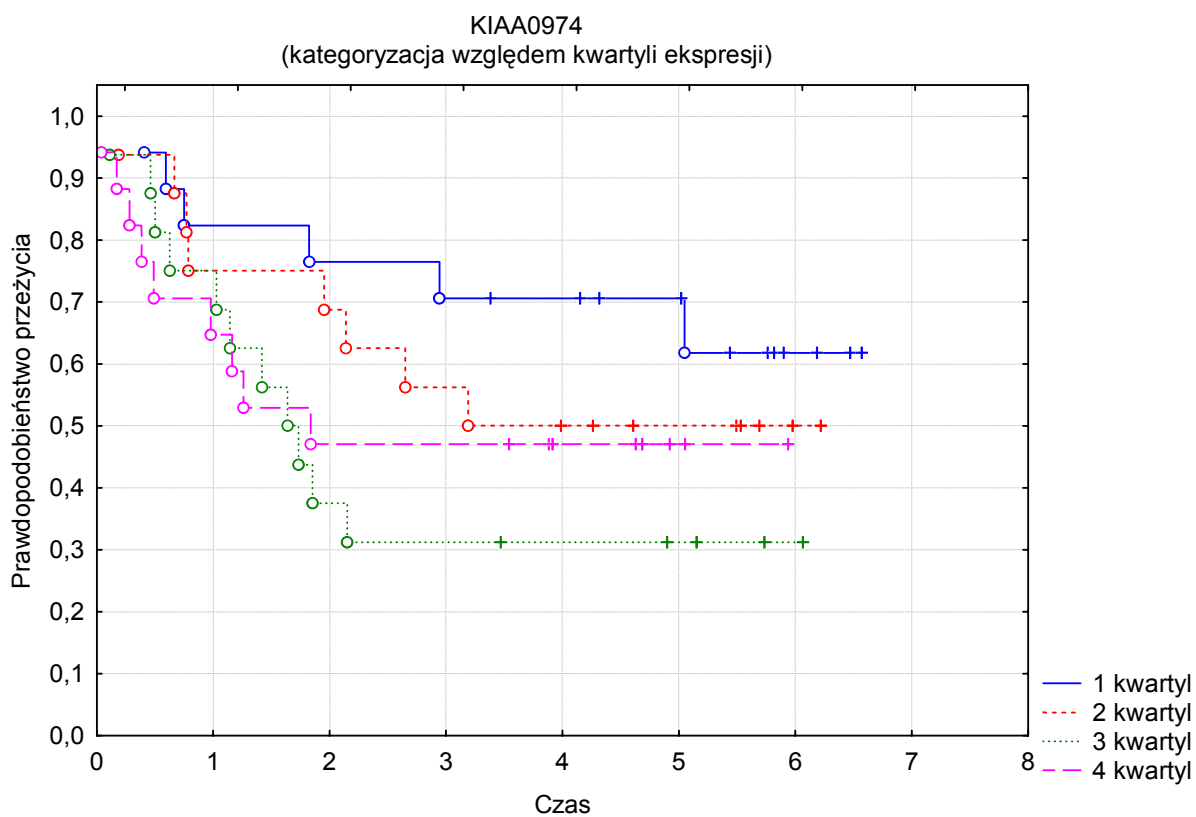
RHO GDI Beta
(kategoryzacja względem kwartyli ekspresji)



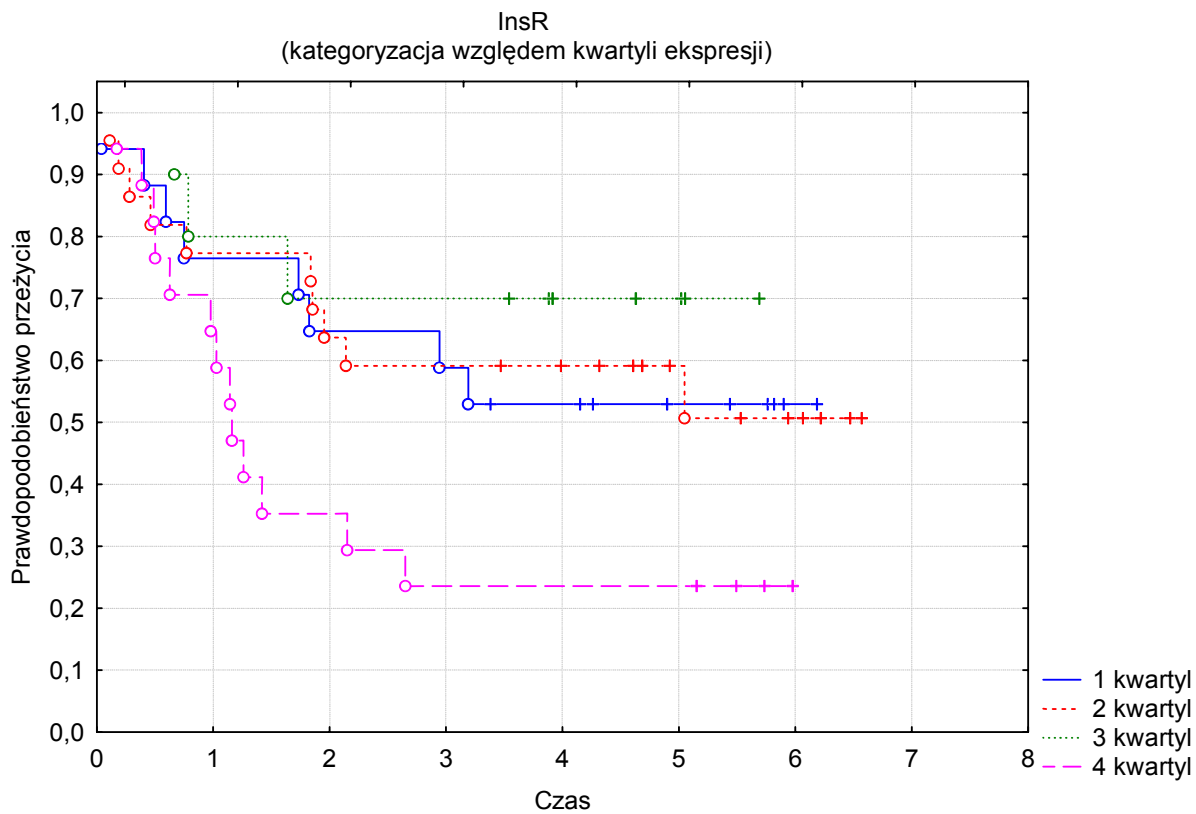
(H)



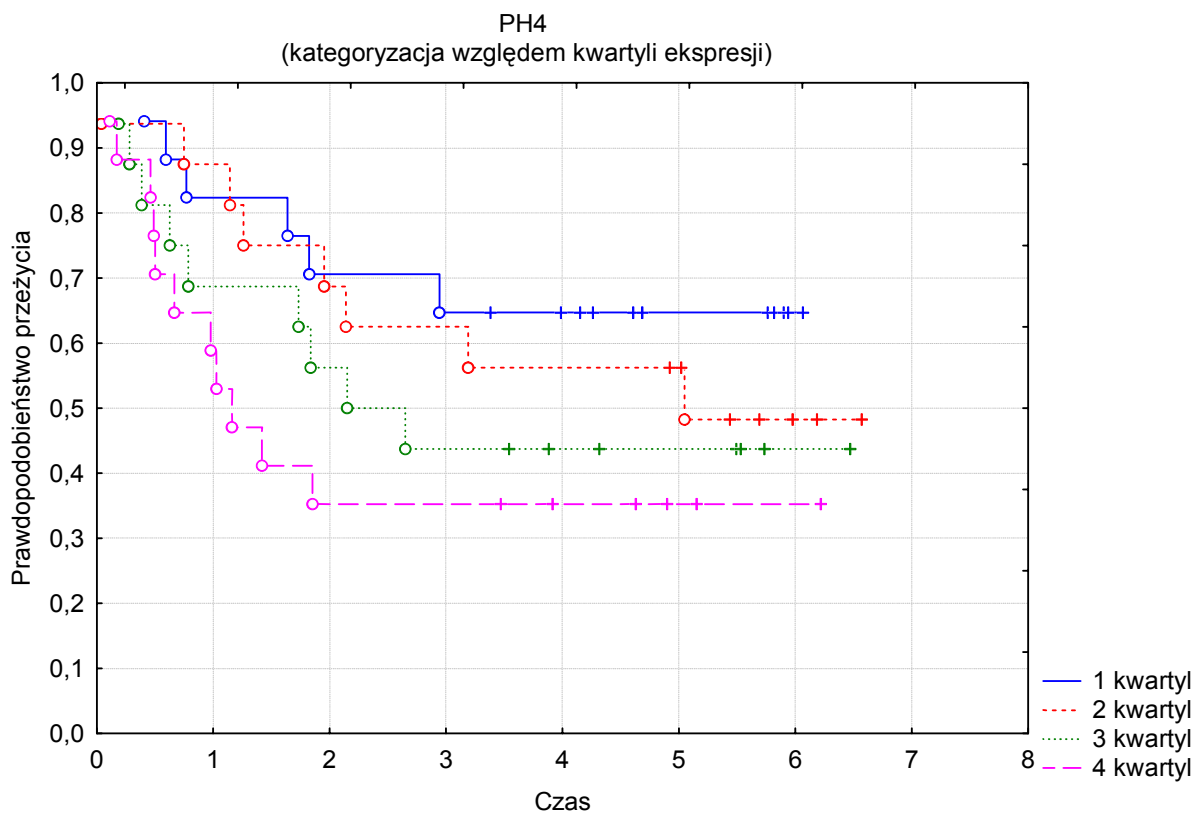
(I)



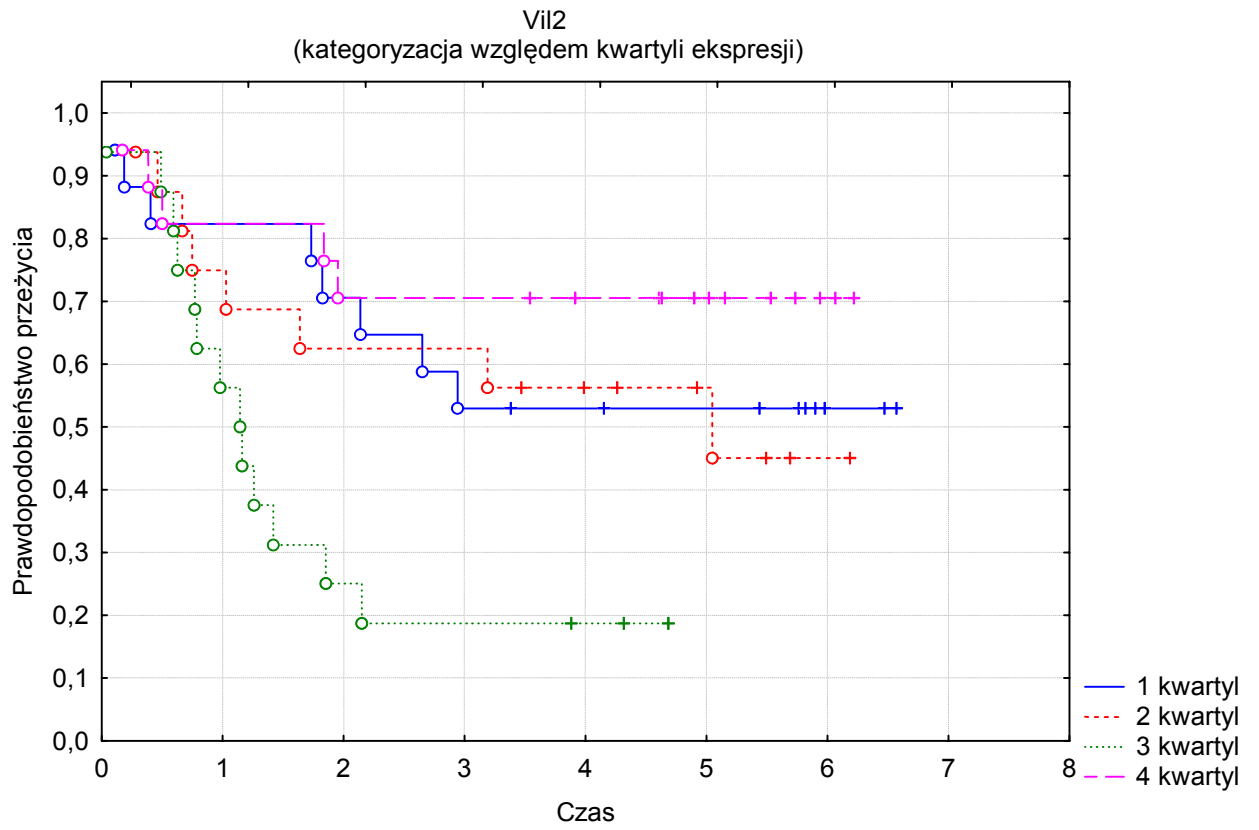
(J)



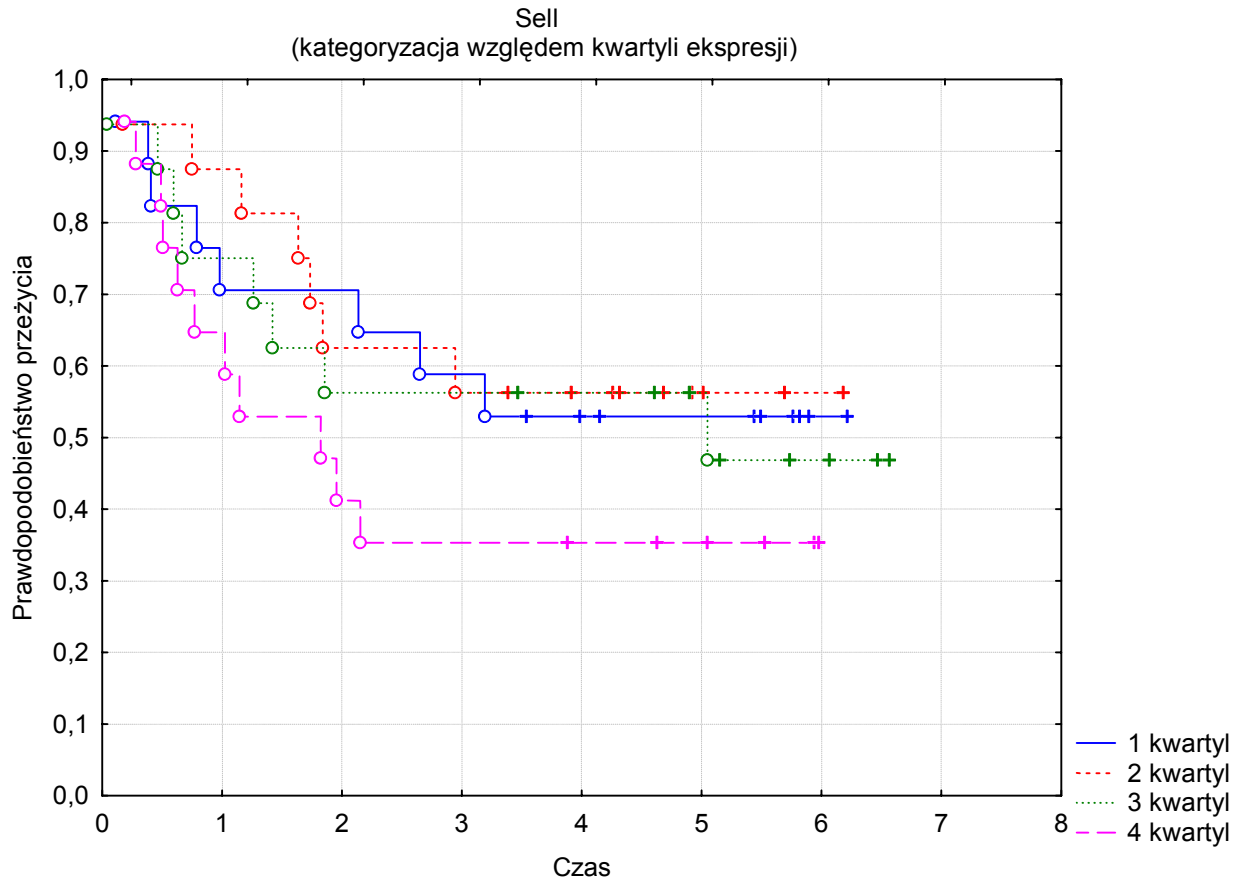
(K)



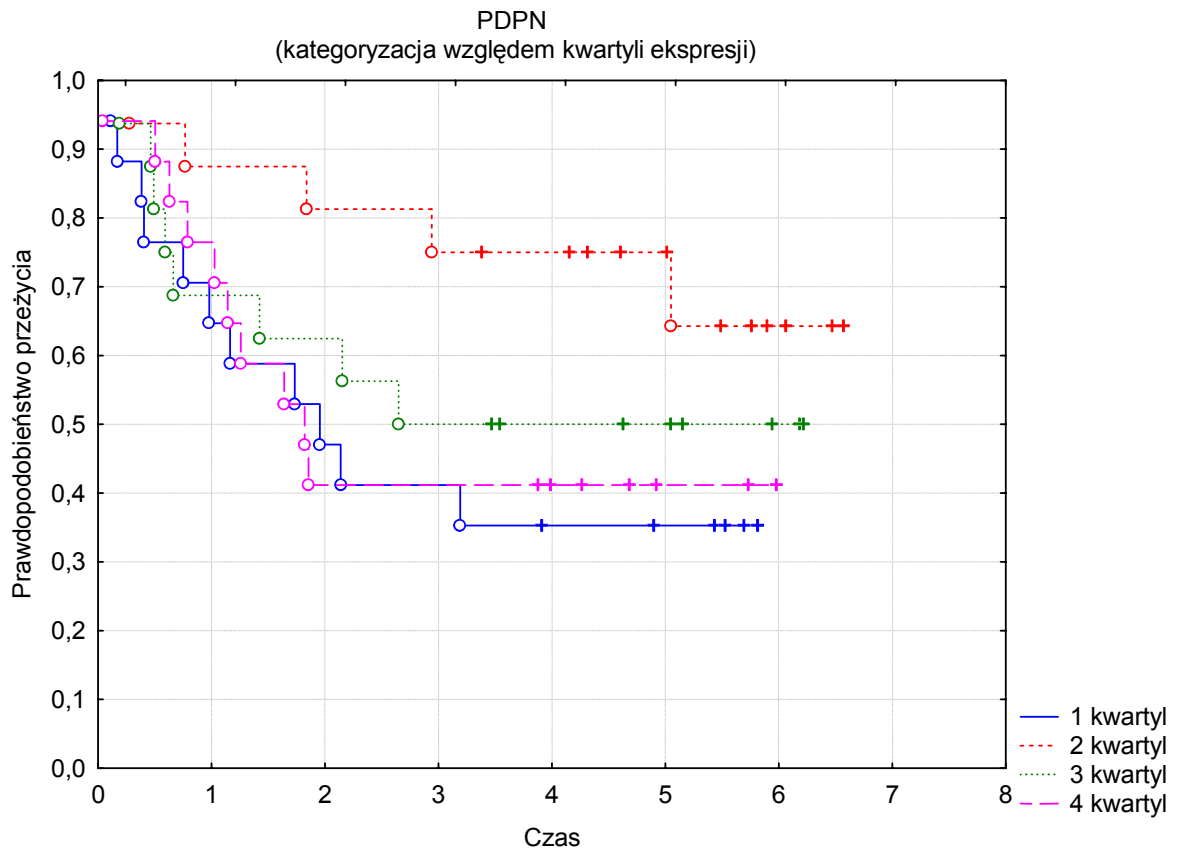
(L)



(M)



(N)



11. Piśmiennictwo

1. Szczuka, I. and K. Roszkowski-Sliz, [Lung cancer in Poland in 1970-2004]. *Pneumonol Alergol Pol*, 2008. 76(1): p. 19-28.
2. Jassem, J., et al., *Results of surgical treatment of non-small cell lung cancer: validation of the new postoperative pathologic TNM classification*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2000. 119(6): p. 1141-6.
3. Fry, W.A., J.L. Phillips, and H.R. Menck, *Ten-year survey of lung cancer treatment and survival in hospitals in the United States: a national cancer data base report*. *Cancer*, 1999. 86(9): p. 1867-76.
4. *Chemotherapy in non-small cell lung cancer: a meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomised clinical trials*. *Non-small Cell Lung Cancer Collaborative Group*. *Bmj*, 1995. 311(7010): p. 899-909.
5. Pignon, J.P., et al., *Lung adjuvant cisplatin evaluation: a pooled analysis by the LACE Collaborative Group*. *J Clin Oncol*, 2008. 26(21): p. 3552-9.
6. Strauss, G.M., et al., *Adjuvant paclitaxel plus carboplatin compared with observation in stage IB non-small-cell lung cancer: CALGB 9633 with the Cancer and Leukemia Group B, Radiation Therapy Oncology Group, and North Central Cancer Treatment Group Study Groups*. *J Clin Oncol*, 2008. 26(31): p. 5043-51.
7. Port, J.L., et al., *Tumor size predicts survival within stage IA non-small cell lung cancer*. *Chest*, 2003. 124(5): p. 1828-33.
8. Voltolini, L., et al., *Pattern of recurrence and survival of c-Ia NSCLC diagnosed by transpleural methods*. *J Cardiovasc Surg (Torino)*, 2008. 49(5): p. 697-702.
9. Deslauriers, J. and J. Gregoire, *Surgical therapy of early non-small cell lung cancer*. *Chest*, 2000. 117(4 Suppl 1): p. 104S-109S.
10. Choi, Y.S., et al., *Recurrence-free survival and prognostic factors in resected pN2 non-small cell lung cancer*. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2002. 22(5): p. 695-700.
11. Mitsudomi, T., et al., *Mutations of the p53 gene as a predictor of poor prognosis in patients with non-small-cell lung cancer*. *J Natl Cancer Inst*, 1993. 85(24): p. 2018-23.
12. Fukuyama, Y., et al., *K-ras and p53 mutations are an independent unfavourable prognostic indicator in patients with non-small-cell lung cancer*. *Br J Cancer*, 1997. 75(8): p. 1125-30.
13. Kosaka, T., et al., *Prognostic implication of EGFR, KRAS, and TP53 gene mutations in a large cohort of Japanese patients with surgically treated lung adenocarcinoma*. *J Thorac Oncol*, 2009. 4(1): p. 22-9.
14. Top, B., et al., *Comparative analysis of p53 gene mutations and protein accumulation in human non-small-cell lung cancer*. *Int J Cancer*, 1995. 64(2): p. 83-91.
15. Mitsudomi, T., et al., *Prognostic significance of p53 alterations in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis*. *Clin Cancer Res*, 2000. 6(10): p. 4055-63.
16. Shepherd, F.A. and R. Rosell, *Weighing tumor biology in treatment decisions for patients with non-small cell lung cancer*. *J Thorac Oncol*, 2007. 2 Suppl 2: p. S68-76.
17. Sasaki, H., et al., *Epidermal growth factor receptor gene amplification in surgical resected Japanese lung cancer*. *Lung Cancer*, 2008.
18. Tang, X., et al., *Hypermethylation of the death-associated protein (DAP) kinase promoter and aggressiveness in stage I non-small-cell lung cancer*. *J Natl Cancer Inst*, 2000. 92(18): p. 1511-6.
19. Chmara, M., et al., *Loss of heterozygosity at chromosomes 3p and 17p in primary non-small cell lung cancer*. *Anticancer Res*, 2004. 24(6): p. 4259-63.
20. Zhu, C.Q., et al., *Immunohistochemical markers of prognosis in non-small cell lung cancer: a review and proposal for a multiphase approach to marker evaluation*. *J Clin Pathol*, 2006. 59(8): p. 790-800.
21. Brundage, M.D., D. Davies, and W.J. Mackillop, *Prognostic factors in non-small cell lung cancer: a decade of progress*. *Chest*, 2002. 122(3): p. 1037-57.
22. Ramaswamy, S., et al., *A molecular signature of metastasis in primary solid tumors*. *Nat Genet*, 2003. 33(1): p. 49-54.
23. Bhattacharjee, A., et al., *Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(24): p. 13790-5.

24. Endoh, H., et al., *Prognostic model of pulmonary adenocarcinoma by expression profiling of eight genes as determined by quantitative real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction*. J Clin Oncol, 2004. 22(5): p. 811-9.
25. Lu, Y., et al., *A gene expression signature predicts survival of patients with stage I non-small cell lung cancer*. PLoS Med, 2006. 3(12): p. e467.
26. Inamura, K., et al., *Two subclasses of lung squamous cell carcinoma with different gene expression profiles and prognosis identified by hierarchical clustering and non-negative matrix factorization*. Oncogene, 2005. 24(47): p. 7105-13.
27. Raponi, M., et al., *Gene expression signatures for predicting prognosis of squamous cell and adenocarcinomas of the lung*. Cancer Res, 2006. 66(15): p. 7466-72.
28. Larsen, J.E., et al., *Expression profiling defines a recurrence signature in lung squamous cell carcinoma*. Carcinogenesis, 2007. 28(3): p. 760-6.
29. Bustin, S.A. and T. Nolan, *Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction*. J Biomol Tech, 2004. 15(3): p. 155-66.
30. Bustin, S.A., *Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems*. J Mol Endocrinol, 2002. 29(1): p. 23-39.
31. Rajeevan, M.S., et al., *Use of real-time quantitative PCR to validate the results of cDNA array and differential display PCR technologies*. Methods, 2001. 25(4): p. 443-51.
32. Skrzypski, M., et al., *Three-gene expression signature predicts survival in early-stage squamous cell carcinoma of the lung*. Clin Cancer Res, 2008. 14(15): p. 4794-9.
33. Parmigiani, G., et al., *A cross-study comparison of gene expression studies for the molecular classification of lung cancer*. Clin Cancer Res, 2004. 10(9): p. 2922-7.
34. Mueller, M.M. and N.E. Fusenig, *Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer*. Nat Rev Cancer, 2004. 4(11): p. 839-49.
35. Bergers, G. and L.E. Benjamin, *Tumorigenesis and the angiogenic switch*. Nat Rev Cancer, 2003. 3(6): p. 401-10.
36. Coussens, L.M. and Z. Werb, *Inflammation and cancer*. Nature, 2002. 420(6917): p. 860-7.
37. Bingle, L., N.J. Brown, and C.E. Lewis, *The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies*. J Pathol, 2002. 196(3): p. 254-65.
38. Nakayama, Y., et al., *Relationships between tumor-associated macrophages and clinicopathological factors in patients with colorectal cancer*. Anticancer Res, 2002. 22(6C): p. 4291-6.
39. Mantovani, A., et al., *Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes*. Trends Immunol, 2002. 23(11): p. 549-55.
40. Wyckoff, J., et al., *A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors*. Cancer Res, 2004. 64(19): p. 7022-9.
41. Goswami, S., et al., *Macrophages promote the invasion of breast carcinoma cells via a colony-stimulating factor-1/epidermal growth factor paracrine loop*. Cancer Res, 2005. 65(12): p. 5278-83.
42. Lin, E.Y., et al., *Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy*. J Exp Med, 2001. 193(6): p. 727-40.
43. Pollard, J.W., *Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis*. Nat Rev Cancer, 2004. 4(1): p. 71-8.
44. Wyckoff, J.B., et al., *Direct visualization of macrophage-assisted tumor cell intravasation in mammary tumors*. Cancer Res, 2007. 67(6): p. 2649-56.
45. Allavena, P., et al., *Anti-inflammatory properties of the novel antitumor agent yondelis (trabectedin): inhibition of macrophage differentiation and cytokine production*. Cancer Res, 2005. 65(7): p. 2964-71.
46. Guarino, M., B. Rubino, and G. Ballabio, *The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology*. Pathology, 2007. 39(3): p. 305-18.
47. Sivakumar, R., et al., *Autocrine loop for IGF-I receptor signaling in SLUG-mediated epithelial-mesenchymal transition*. Int J Oncol, 2009. 34(2): p. 329-38.
48. Thomson, S., et al., *Kinase switching in mesenchymal-like non-small cell lung cancer lines contributes to EGFR inhibitor resistance through pathway redundancy*. Clin Exp Metastasis, 2008. 25(8): p. 843-54.
49. Alexander, N.R., et al., *N-cadherin gene expression in prostate carcinoma is modulated by integrin-dependent nuclear translocation of Twist1*. Cancer Res, 2006. 66(7): p. 3365-9.
50. Islam, S., et al., *Expression of N-cadherin by human squamous carcinoma cells induces a scattered fibroblastic phenotype with disrupted cell-cell adhesion*. J Cell Biol, 1996. 135(6 Pt 1): p. 1643-54.

51. Lossos, I.S., et al., *Prediction of survival in diffuse large-B-cell lymphoma based on the expression of six genes*. N Engl J Med, 2004. 350(18): p. 1828-37.
52. Schacht, V., et al., *Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors*. Am J Pathol, 2005. 166(3): p. 913-21.
53. Wicki, A. and G. Christofori, *The potential role of podoplanin in tumour invasion*. Br J Cancer, 2007. 96(1): p. 1-5.
54. Wicki, A., et al., *Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton*. Cancer Cell, 2006. 9(4): p. 261-72.
55. Pappot, H., et al., *The complex between urokinase (uPA) and its type-1 inhibitor (PAI-1) in pulmonary adenocarcinoma: relation to prognosis*. Lung Cancer, 2006. 51(2): p. 193-200.
56. Cox, G., J.L. Jones, and K.J. O'Byrne, *Matrix metalloproteinase 9 and the epidermal growth factor signal pathway in operable non-small cell lung cancer*. Clin Cancer Res, 2000. 6(6): p. 2349-55.
57. Yonemura, S., S. Tsukita, and S. Tsukita, *Direct involvement of ezrin/radixin/moesin (ERM)-binding membrane proteins in the organization of microvilli in collaboration with activated ERM proteins*. J Cell Biol, 1999. 145(7): p. 1497-509.
58. Narumiya, S., *The small GTPase Rho: cellular functions and signal transduction*. J Biochem, 1996. 120(2): p. 215-28.
59. Louvet-Vallee, S., *ERM proteins: from cellular architecture to cell signaling*. Biol Cell, 2000. 92(5): p. 305-16.
60. Sattler, M. and R. Salgia, *c-Met and hepatocyte growth factor: potential as novel targets in cancer therapy*. Curr Oncol Rep, 2007. 9(2): p. 102-8.
61. Yu, Y., et al., *The homeoprotein six1 transcriptionally activates multiple protumorigenic genes but requires ezrin to promote metastasis*. Cancer Res, 2006. 66(4): p. 1982-9.
62. Suzuki, C., et al., *ANLN plays a critical role in human lung carcinogenesis through the activation of RHOA and by involvement in the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway*. Cancer Res, 2005. 65(24): p. 11314-25.
63. Leppert, J.T., et al., *Carbonic anhydrase IX and the future of molecular markers in renal cell carcinoma*. BJU Int, 2005. 96(3): p. 281-5.
64. Roberts, N., et al., *Inhibition of VEGFR-3 activation with the antagonistic antibody more potently suppresses lymph node and distant metastases than inactivation of VEGFR-2*. Cancer Res, 2006. 66(5): p. 2650-7.
65. Yuan, A., et al., *The role of interleukin-8 in cancer cells and microenvironment interaction*. Front Biosci, 2005. 10: p. 853-65.
66. Staller, P., et al., *Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL*. Nature, 2003. 425(6955): p. 307-11.
67. Chen, G., et al., *Protein profiles associated with survival in lung adenocarcinoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(23): p. 13537-42.
68. Warburg, O., Posener, K., Negelein, E., . Biochem.Z., (1924). 152: p. 319.
69. Warburg, O., *On the origin of cancer cells*. Science, 1956. 123(3191): p. 309-14.
70. Niinaka, Y., et al., *Expression and secretion of neuroleukin/phosphohexose isomerase/maturation factor as autocrine motility factor by tumor cells*. Cancer Res, 1998. 58(12): p. 2667-74.
71. Funasaka, T., et al., *Down-regulation of phosphoglucose isomerase/autocrine motility factor results in mesenchymal-to-epithelial transition of human lung fibrosarcoma cells*. Cancer Res, 2007. 67(9): p. 4236-43.
72. Douma, S., et al., *Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB*. Nature, 2004. 430(7003): p. 1034-9.
73. Donato, R., *SI00: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles*. Int J Biochem Cell Biol, 2001. 33(7): p. 637-68.
74. Beer, D.G., et al., *Gene-expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma*. Nat Med, 2002. 8(8): p. 816-24.
75. Borsig, L., et al., *Heparin and cancer revisited: mechanistic connections involving platelets, P-selectin, carcinoma mucins, and tumor metastasis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(6): p. 3352-7.
76. Stevenson, J.L., S.H. Choi, and A. Varki, *Differential metastasis inhibition by clinically relevant levels of heparins--correlation with selectin inhibition, not antithrombotic activity*. Clin Cancer Res, 2005. 11(19 Pt 1): p. 7003-11.

77. Graff, L., et al., *Expression of vesicular monoamine transporters, synaptosomal-associated protein 25 and syntaxin1: a signature of human small cell lung carcinoma.* *Cancer Res*, 2001. 61(5): p. 2138-44.
78. Grabowski, P., et al., *Expression of neuroendocrine markers: a signature of human undifferentiated carcinoma of the colon and rectum.* *Virchows Arch*, 2002. 441(3): p. 256-63.
79. Bascom, J.L., et al., *Epimorphin overexpression in the mouse mammary gland promotes alveolar hyperplasia and mammary adenocarcinoma.* *Cancer Res*, 2005. 65(19): p. 8617-21.
80. Pawelek, J.M. and A.K. Chakraborty, *Fusion of tumour cells with bone marrow-derived cells: a unifying explanation for metastasis.* *Nat Rev Cancer*, 2008. 8(5): p. 377-86.
81. Muller-Tidow, C., et al., *Identification of metastasis-associated receptor tyrosine kinases in non-small cell lung cancer.* *Cancer Res*, 2005. 65(5): p. 1778-82.
82. Frasca, F., et al., *The role of insulin receptors and IGF-I receptors in cancer and other diseases.* *Arch Physiol Biochem*, 2008. 114(1): p. 23-37.
83. Goulter, A.B., D.W. Harmer, and K.L. Clark, *Evaluation of low density array technology for quantitative parallel measurement of multiple genes in human tissue.* *BMC Genomics*, 2006. 7: p. 34.
84. Livak, K., *ABI Prism 7700 Sequence. Detection System, User Bulletin 2., in PE Applied Biosystems.* 1997.
85. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.* *Methods*, 2001. 25(4): p. 402-8.
86. Rami-Porta, R., J.J. Crowley, and P. Goldstraw, *The revised TNM staging system for lung cancer.* *Ann Thorac Cardiovasc Surg*, 2009. 15(1): p. 4-9.
87. Bartlett, J.M., et al., *Evaluating HER2 amplification and overexpression in breast cancer.* *J Pathol*, 2001. 195(4): p. 422-8.
88. Wang, Y., et al., *Large scale real-time PCR validation on gene expression measurements from two commercial long-oligonucleotide microarrays.* *BMC Genomics*, 2006. 7: p. 59.
89. Garber, M.E., et al., *Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung.* *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(24): p. 13784-9.
90. Potti, A., et al., *A genomic strategy to refine prognosis in early-stage non-small-cell lung cancer.* *N Engl J Med*, 2006. 355(6): p. 570-80.
91. Chen, H.Y., et al., *A five-gene signature and clinical outcome in non-small-cell lung cancer.* *N Engl J Med*, 2007. 356(1): p. 11-20.
92. Shedden, K., et al., *Gene expression-based survival prediction in lung adenocarcinoma: a multi-site, blinded validation study.* *Nat Med*, 2008. 14(8): p. 822-7.
93. Jassem, J., et al., *P53 and K-ras mutations are frequent events in microscopically negative surgical margins from patients with nonsmall cell lung carcinoma.* *Cancer*, 2004. 100(9): p. 1951-60.
94. Su, X., et al., *Mediastinal lymph node dissection affects survival in patients with stage I non-small cell lung cancer.* *Thorac Cardiovasc Surg*, 2008. 56(4): p. 226-30.
95. Lardinois, D., et al., *Morbidity, survival, and site of recurrence after mediastinal lymph-node dissection versus systematic sampling after complete resection for non-small cell lung cancer.* *Ann Thorac Surg*, 2005. 80(1): p. 268-74; discussion 274-5.
96. Lau, S.K., et al., *Three-gene prognostic classifier for early-stage non small-cell lung cancer.* *J Clin Oncol*, 2007. 25(35): p. 5562-9.
97. Yu, S.L., et al., *MicroRNA signature predicts survival and relapse in lung cancer.* *Cancer Cell*, 2008. 13(1): p. 48-57.
98. Raz, D.J., et al., *A multigene assay is prognostic of survival in patients with early-stage lung adenocarcinoma.* *Clin Cancer Res*, 2008. 14(17): p. 5565-70.
99. Ceppi, P., et al., *Squamous cell carcinoma of the lung compared with other histotypes shows higher messenger RNA and protein levels for thymidylate synthase.* *Cancer*, 2006. 107(7): p. 1589-96.
100. Albino, D., et al., *Identification of low intratumoral gene expression heterogeneity in neuroblastic tumors by genome-wide expression analysis and game theory.* *Cancer*, 2008. 113(6): p. 1412-22.
101. Antonov, J., et al., *Reliable gene expression measurements from degraded RNA by quantitative real-time PCR depend on short amplicons and a proper normalization.* *Lab Invest*, 2005. 85(8): p. 1040-50.
102. Rupp, G.M. and J. Locker, *Purification and analysis of RNA from paraffin-embedded tissues.* *Biotechniques*, 1988. 6(1): p. 56-60.

103. Cronin, M., et al., *Measurement of gene expression in archival paraffin-embedded tissues: development and performance of a 92-gene reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay*. Am J Pathol, 2004. 164(1): p. 35-42.
104. Chen, J.J., et al., *Tumor-associated macrophages: the double-edged sword in cancer progression*. J Clin Oncol, 2005. 23(5): p. 953-64.
105. Seike, M., et al., *Use of a cytokine gene expression signature in lung adenocarcinoma and the surrounding tissue as a prognostic classifier*. J Natl Cancer Inst, 2007. 99(16): p. 1257-69.
106. Budhu, A., et al., *Prediction of venous metastases, recurrence, and prognosis in hepatocellular carcinoma based on a unique immune response signature of the liver microenvironment*. Cancer Cell, 2006. 10(2): p. 99-111.
107. Yao, C., et al., *Interleukin-8 modulates growth and invasiveness of estrogen receptor-negative breast cancer cells*. Int J Cancer, 2007. 121(9): p. 1949-57.
108. Greiner, J., et al., *Expression of tumor-associated antigens in acute myeloid leukemia: Implications for specific immunotherapeutic approaches*. Blood, 2006. 108(13): p. 4109-17.
109. Simi, L., et al., *Quantitative analysis of carbonic anhydrase IX mRNA in human non-small cell lung cancer*. Lung Cancer, 2006. 52(1): p. 59-66.
110. Kon-no, H., et al., *Carbonic anhydrase IX expression is associated with tumor progression and a poor prognosis of lung adenocarcinoma*. Lung Cancer, 2006. 54(3): p. 409-18.
111. Nakao, M., et al., *Prognostic significance of carbonic anhydrase IX expression by cancer-associated fibroblasts in lung adenocarcinoma*. Cancer, 2009.
112. Chiche, J., et al., *Hypoxia-inducible carbonic anhydrase IX and XII promote tumor cell growth by counteracting acidosis through the regulation of the intracellular pH*. Cancer Res, 2009. 69(1): p. 358-68.
113. Parangi, S., et al., *Antiangiogenic therapy of transgenic mice impairs de novo tumor growth*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(5): p. 2002-7.
114. Goda, N., et al., *Hypoxia-inducible factor 1alpha is essential for cell cycle arrest during hypoxia*. Mol Cell Biol, 2003. 23(1): p. 359-69.
115. Scortegagna, M., et al., *Hypoxia-inducible factor-1alpha suppresses squamous carcinogenic progression and epithelial-mesenchymal transition*. Cancer Res, 2009. 69(6): p. 2638-46.
116. Han, S., et al., *Fibronectin increases matrix metalloproteinase 9 expression through activation of c-Fos via extracellular-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in human lung carcinoma cells*. J Biol Chem, 2006. 281(40): p. 29614-24.
117. Jansen, M.P., et al., *Molecular classification of tamoxifen-resistant breast carcinomas by gene expression profiling*. J Clin Oncol, 2005. 23(4): p. 732-40.
118. Helleman, J., et al., *Association of an extracellular matrix gene cluster with breast cancer prognosis and endocrine therapy response*. Clin Cancer Res, 2008. 14(17): p. 5555-64.
119. Tamura, K., et al., *Molecular features of hormone-refractory prostate cancer cells by genome-wide gene expression profiles*. Cancer Res, 2007. 67(11): p. 5117-25.
120. Descotes, F., et al., *Plasminogen activator inhibitor type 1 is the most significant of the usual tissue prognostic factors in node-negative breast ductal adenocarcinoma independent of urokinase-type plasminogen activator*. Clin Breast Cancer, 2008. 8(2): p. 168-77.
121. Varki, N.M. and A. Varki, *Heparin inhibition of selectin-mediated interactions during the hematogenous phase of carcinoma metastasis: rationale for clinical studies in humans*. Semin Thromb Hemost, 2002. 28(1): p. 53-66.
122. Engelberg, H., *Actions of heparin that may affect the malignant process*. Cancer, 1999. 85(2): p. 257-72.
123. Lebeau, B., et al., *Subcutaneous heparin treatment increases survival in small cell lung cancer. "Petites Cellules" Group*. Cancer, 1994. 74(1): p. 38-45.
124. Nitti, D., et al., *Final results of a phase III clinical trial on adjuvant intraportal infusion with heparin and 5-fluorouracil (5-FU) in resectable colon cancer (EORTC GITCCG 1983-1987). European Organization for Research and Treatment of Cancer. Gastrointestinal Tract Cancer Cooperative Group*. Eur J Cancer, 1997. 33(8): p. 1209-15.
125. Ornstein, D.L. and L.R. Zacharski, *The use of heparin for treating human malignancies*. Haemostasis, 1999. 29 Suppl S1: p. 48-60.
126. Akl, E.A., et al., *Parenteral anticoagulation for prolonging survival in patients with cancer who have no other indication for anticoagulation*. Cochrane Database Syst Rev, 2007(3): p. CD006652.
127. Hiraga, T. and H. Nakamura, *Imatinib mesylate suppresses bone metastases of breast cancer by inhibiting osteoclasts through the blockade of c-Fms signals*. Int J Cancer, 2009. 124(1): p. 215-22.

128. Dewar, A.L., et al., *Macrophage colony-stimulating factor receptor c-fms is a novel target of imatinib*. *Blood*, 2005. 105(8): p. 3127-32.
129. Hirsch, F.R. and S. Witta, *Biomarkers for prediction of sensitivity to EGFR inhibitors in non-small cell lung cancer*. *Curr Opin Oncol*, 2005. 17(2): p. 118-22.
130. Reck, M., 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*, 2009. 27(8): p. 1227-34.
131. Ebos, J.M., et al., *Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis*. *Cancer Cell*, 2009. 15(3): p. 232-9.