

Κεφάλαιο 37

Αρχές αντineοπλασματικής χημειοθεραπείας

Χ. Ανδρεάδης

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η καλή γνώση της φαρμακολογίας των αντineοπλασματικών φαρμάκων θεωρείται απαραίτητο εφόδιο στην προσπάθεια του κλινικού Ογκολόγου να μεγιστοποιήσει τα θεραπευτικά αποτελέσματα της χημειοθεραπείας, την οποία καλείται να εφαρμόσει. Η επιλογή των καταλλήλων και δραστικών φαρμάκων, οι δόσεις, οι πιθανές αλληλοεπιδράσεις, οι αντενδείξεις, οι παρενέργειες και συνέργειες, το πρόβλημα της αντίστασης είναι μερικές μόνο από τις συνιστώσες ενός συνθέτου θέματος, το οποίο ο κλινικός Ογκολόγος-Χημειοθεραπευτής καλείται να γνωρίζει το θεωρητικό του υπόστρωμα σε βάθος, αλλά και να ενημερώνεται συνεχώς προς όφελος των ασθενών του.

Η εφαρμογή της αντineοπλασματικής χημειοθεραπείας συνδέεται στενά με την γνώση της φαρμακοκινητικής και της κυτταροκινητικής των όγκων. Ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων είναι η βάση του μηχανισμού της αύξησης των όγκων και η γνώση των παραμέτρων που τον διέπουν διευκολύνει την κατανόηση της αντineοπλασματικής θεραπείας. Μαθηματικές συναρτήσεις διέπουν τις καμπύλες ανάπτυξης των όγκων, μπορούν να καταγράψουν την αύξηση ή μείωση των κυττάρων στον χρόνο, να δώσουν ενδείξεις της κλινικής εξέλιξης των νεοπλασματικών νοσημάτων και τέλος να προσδιορίσουν τις κα-

τευθύνσεις της θεραπευτικής έρευνας.

ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΗΤΙΚΗ ΤΩΝ ΟΓΚΩΝ

Η κυτταροκινητική, τα δυναμικά, δηλαδή, χαρακτηριστικά της εξέλιξης του κυττάρου και των κυτταρικών πληθυσμών αποτελεί βασικό υπόστρωμα στο οποίο στηρίχτηκαν οι έρευνες και οι εφαρμογές της αντineοπλασματικής θεραπευτικής.

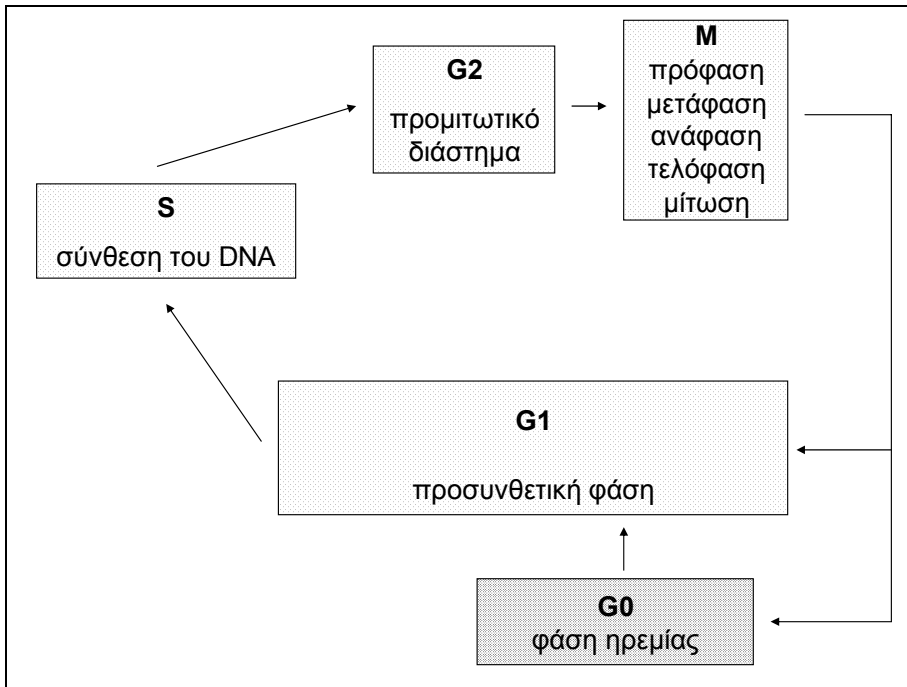
Κυτταρικός κύκλος

Κυτταρικός κύκλος είναι όλα τα βιολογικά φαινόμενα και διαδικασίες από τη στιγμή της διαίρεσης μέχρι την επόμενη διαίρεση του κυττάρου. Η διάρκεια του φαινομένου αυτού δεν είναι ίδια για όλα τα κύτταρα. Επί παραδείγματι, τα επιθηλιακά κύτταρα του βλεννογόνου του εντέρου και τα πρόδρομα κύτταρα του αίματος στον μυελό διαιρούνται πάνω από μια φορά την ημέρα, ενώ τα ηπατοκύτταρα διαιρούνται μια φορά περίπου ανά έτος. Όμως, η σειρά των φαινομένων είναι παρόμοια σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα.

Ο κυτταρικός κύκλος διαιρείται σε 4 φάσεις (σχήμα 1). Η φάση Μ (M: Mitosis) αποτελείται από τις διεργασίες της μίτωσης (διαίρεση του πυρήνα) και κυτταροκίνησης (διαίρεση του κυττάρου). Η φάση αυτή στα θηλαστικά διαρκεί περίπου 1 ώρα και αποτελεί μικρό κλάσμα του συνολικού κυτταρικού κύκλου. Η περίοδος ανάμεσα σε δύο φάσεις Μ αποτελεί την μεσόφαση, η οποία υποδιαι-

ρείται στις φάσεις G₁, S και G₂. Στη φάση G₁ (G: Gap) το κύτταρο έχει μπει πλέον

στο μιτωτικό κύκλο. Περιέχει σταθερή ποσότητα DNA.



Σχήμα 1. Κυτταρικός κύκλος

Σε μη πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα η φάση G₁ αντικαθίσταται από την φάση G₀, κατά την οποία το κύτταρο αναμένει την επίδραση ειδικού ερεθίσματος (π.χ. αυξητικού παράγοντα, ορμόνης, κλπ) για να μπει στη φάση G₁. Οι δυνητικά αναγεννώμενοι ιστοί διατηρούν τους κυτταρικούς πληθυσμούς τους με κύριο μηχανισμό τη δυνατότητα ανάκλησης κυττάρων από τη φάση G₀ στην G₁. Στη φάση S (S: Synthesis) το κύτταρο αντιγράφει το DNA του πυρήνα του. Ακολουθεί η φάση G₂, η οποία είναι μετασυνθετική και διαρκεί περίπου 6 ώρες. Το κύτταρο περιέχει διπλή ποσότητα DNA και φυσιολογικά οδηγείται προς τη μίτωση, πλην των περιπτώσεων κατά τις οποίες η φάση παρατείνεται, οπότε καλείται R2 και παραμένει πολυπλοειδικό. Η συμπύκνωση των χρωμοσωμάτων

σηματοδοτεί το τέλος της φάσης G₂ και την έναρξη της μίτωσης^{1,2}.

Κεντρικός «συντονιστής», με ρόλο κλειδί στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου φαίνεται ότι παίζει η πρωτεΐνη p53, προϊόν του κατασταλτικού ογκογονιδίου p53³. Η πρωτεΐνη p53 υπό φυσιολογικές συνθήκες βρίσκεται σε μικρή συγκέντρωση στον πυρήνα των κυττάρων, όπου λειτουργεί ως παράγοντας ρύθμισης της μεταγραφής. Επάγει την έκφραση του γονιδίου για την p21, ενός αναστολέα πολλών κυκλινο-εξαρτωμένων κινασών (E/Cdk2, D/Cdk4,6, A/Cdk2, A/Cdk1, κ.ά.) και μέσω αυτού του μηχανισμού σε περίπτωση βλάβης επιτυγχάνεται το σταμάτημα του κύκλου σε διάφορα σημεία, για να δοθεί η ευκαιρία στο κύτταρο να διορθώσει τη βλάβη. Όταν αυτό δεν καταστεί δυνατό, τότε η p53 οδηγεί το κύτταρο σε απόπτωση, μέσω επαγωγής

ταρο σε απόπτωση, μέσω επαγωγής της έκφρασης γονιδίων κυτταρικού θανάτου (bax, κ.ά.). Δεν είναι τυχαίο το γεγονός, ότι το μόριο της p53 ανευρίσκεται μεταλλαγμένο σε πολλούς όγκους⁴.

Τα καρκινικά κύτταρα, μεταξύ των άλλων δυσλειτουργιών, έχουν απολέσει την ικανότητα του ελέγχου του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, με αποτέλεσμα την ανεξέλεγκτη υπερπαραγωγή τους, την συσσώρευσή τους και τον σχηματισμό των όγκων.

Πολλαπλασιασμός των νεοπλασματικών κυττάρων

Η βιολογική συμπεριφορά ενός κακοήθους όγκου και κατά συνέπεια η κλινική εικόνα μιας κακοήθειας επηρεάζονται από τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τον τύπο της αύξησης του όγκου. Οι δύο αυτές παράμετροι σχετίζονται με βιολογικά χαρακτηριστικά όπως είναι η διηθητικότητα, η μεταστατικότητα του όγκου και η απάντησή του στη θεραπεία⁵.

Οι ρυθμιστικοί μηχανισμοί οι οποίοι λειτουργούν για τη διατήρηση του αριθμού των κυττάρων σε φυσιολογικούς ιστούς δεν υφίστανται για τα καρκινικά κύτταρα. Υπάρχουν δύο θεμελιώδη χαρακτηριστικά, τα οποία καθιστούν τα νεοπλασματικά κύτταρα «αθάνατα»: αυτά είναι η απουσία των βιολογικών διαδικασιών της γήρανσης και της απόπτωσης. Σε συνθήκες πειράματος, το σύνολο σχεδόν των κυττάρων ενός πειραματικού όγκου βρίσκονται σε κύκλο και η αύξηση του αριθμού τους είναι εκθετική^{6,7}.

Το ποσοστό των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων (Growth Fraction-GF) δεν είναι πάντα σταθερό κατά τις διαδικασίες αύξησης του μεγέθους ενός όγκου (βλέπε κατωτέρω: Μοντέλο του Gompertz).

Με τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων μεγαλώνει το μέγεθος του όγκου. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός προάγει όχι μόνο το μέγεθος του όγκου, αλλά και την ετερογένεια του όγκου με τη δημιουργία πολυκλωνικού κυτταρικού πληθυσμού (βλέπε κατωτέρω: μοντέλο Norton-Simon). Υπάρχει μία δυναμική ανάμεσα στην εμφάνιση μεταλλάξεων, στο μεταστατικό δυναμικό και την αντίσταση στα φάρμακα.

Κυτταρικός κύκλος και κυτταροτοξικά φάρμακα

Τα κυτταροτοξικά φάρμακα ανάλογα με τη δράση τους ή όχι σε κάποια φάση του κυτταρικού κύκλου διαχωρίζονται σε δύο βασικές κατηγορίες:

1. Φάρμακα που δρουν σε μια συγκεκριμένη φάση ονομάζονται ειδικά της φάσης (phase specific drugs). Τα περισσότερα κυτταροτοξικά αυτής της ομάδας δρουν μέσω καταστροφής του DNA. Η τοξικότητά τους είναι μεγαλύτερη κατά τη διάρκεια της φάσης S της σύνθεσης του DNA. Αλλά φάρμακα, όπως οι ταξάνες, δεσμεύουν την μιτωτική άτρακτο κατά την M φάση του κυτταρικού κύκλου. Παραδείγματα φαρμάκων τα οποία είναι δραστικά σε διαφορετικές φάσεις του κυτταρικού κύκλου είναι τα εξής: γλυκοκορτικοειδή, στεροειδείς ορμόνες στη G₀ φάση, L-ασπαραγινάση στη G₁ φάση, αντιμεταβολίτες στην S φάση, μπλεομυκίνη και αλκαλοειδή στη G₂ φάση, αλκαλοειδή στην M φάση.
2. Τα φάρμακα που δρουν σε οποιαδήποτε φάση του κυτταρικού κύκλου ονομάζονται μη-ειδικά της φάσης (phase nonspecific drugs). Τέτοια φάρμακα είναι τα αλκυλιωτικά, νιτροζουρίες, αντιβιοτικά (πλην της μπλεομυκίνης), προκαρβαζίνη, δακαρβαζίνη και σισπλατίνη⁸.

ΚΥΤΤΑΡΟΚΙΝΗΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ

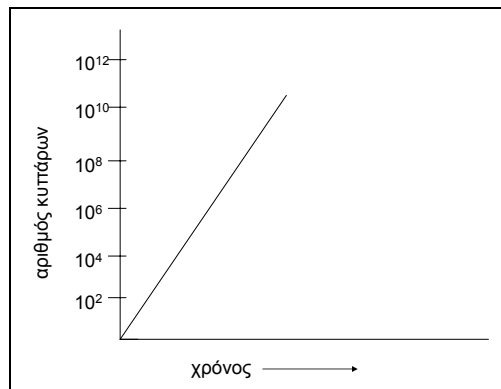
Η ευαισθησία ενός όγκου είναι μεγαλύτερη, όσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων (GF). Άρα, η ευαισθησία είναι μεγάλη κατά την εκθετική αύξηση του όγκου. Οι περισσότεροι όμως όγκοι κατά τη στιγμή της διάγνωσης βρίσκονται στην αρχή ενός «πλατώ», γι' αυτό και η «κυτταροκινητική ευαισθησία» τους είναι σχετικά χαμηλή. Έτσι, φαίνεται καθαρά η ανάγκη περιγραφής μαθηματικών μοντέλων καταγραφής καμπυλών ανάπτυξης των όγκων, οι οποίες θεωρητικά αντικειμενοποιούν την κλινική πορεία και εξέλιξη. Τέτοια μοντέλα τα οποία κατά καιρούς έχουν περιγραφεί είναι προϊόντα εργαστηριακών πειραμάτων σε κυτταροκαλλιέργειες, αλλά και κλινικών δοκιμών.

Μοντέλο των Skipper-Schabel-Wilcox

Το μοντέλο αυτό (*log-kill model*) αναπτύχθηκε και υποστηρίχθηκε θεωρητικά και πειραματικά στο Southern Research Institute των ΗΠΑ. Θεωρείται εξέχον θεωρητικό μοντέλο της κυτταρικής ανάπτυξης και της υποτροφής του όγκου μετά από θεραπευτική παρέμβαση. Βασίστηκε στη πειραματική λευχαιμία L1210 σε ποντίκια BDF₁ ή DBA, τα κύτταρα της οποίας πολλαπλασιάζονται εκθετικά, μέχρι να φτάσουν, μετά από 30 περίπου διαιρέσεις, στον θανατηφόρο όγκο αποτελούμενο από 10^9 κύτταρα και συνολικού μεγέθους 1 cm^3 .

Υπό εργαστηριακές συνθήκες το 90% των λευχαιμικών κυττάρων διαιρούνται κάθε 12-13 ώρες και το ποσοστό αυτό παραμένει σταθερό σε μικροσκοπικούς, αλλά και σε μεγάλους, δυνητικά θανατηφόρους, όγκους^{9,10}. Αποτέλεσμα της

παρατήρησης αυτής είναι ότι ο χρόνος διπλασιασμού είναι μονίμως σταθερός. Έτσι, σε γραφική παράσταση, στην οποία ο άξονας y εμφανίζει τη λογαριθμική αρίθμηση του πληθυσμού των νεοπλασματικών κυττάρων, η καμπύλη ανάπτυξης του όγκου παίρνει τη μορφή ευθείας γραμμής (εκθετική – *exponential* – ανάπτυξη του όγκου) (σχήμα 2).



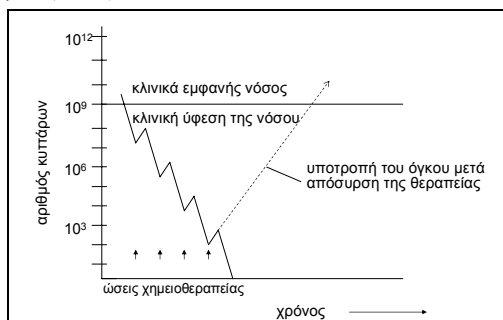
Σχήμα 2. Μοντέλο των Skipper-Schabel-Wilcox: εκθετική ανάπτυξη του όγκου

Με το μοντέλο του πειραματικού νεοπλασματος οι Skipper-Schabel-Wilcox καθόρισαν μια σειρά βασικών βιολογικών κανόνων, οι οποίοι αποτελούν της κατευθυντήριες αρχές της χημειοθεραπείας (αρχές των Skipper-Schabel-Wilcox)¹¹:

1. Ένα κακόηθες κύτταρο πολλαπλασιάζόμενο δίνει τελικώς μεγάλο αριθμό κυττάρων ικανών να φονεύσουν τον ξενιστή.
2. Η επιβίωση του ξενιστή είναι αντιστρόφως ανάλογη του αριθμού των νεοπλασματικών κυττάρων που δέχεται. Σε περίπτωση χημειοθεραπείας η επιβίωση είναι τόσο μεγαλύτερη, όσο λιγότερα είναι τα εναπομείναντα νεοπλασματικά κύτταρα. Η ίαση προϋποθέτει την εκρίζωση και του τελευταίου τέτοιου κυττάρου.
3. Οι ανοσολογικοί αμυντικοί μηχανισμοί του ξενιστή παίζουν ρόλο μόνο σε

περίπτωση μείωσης των νεοπλασματικών κυττάρων κάτωθεν ενός ελαχίστου ορίου (για τα πειραματόζωα είναι $<10^3$ κύτταρα).

4. Τα κυτταροτοξικά δρουν ακολουθώντας το φαινόμενο κινητικής 1ης τάξεως, δηλαδή κάθε ώση κυτταροστατικού σκοτώνει ένα ορισμένο ποσοστό κυττάρων (fractional cell kill) (σχήμα 3). Αυτό σημαίνει ότι για να εξαλειφθεί τελείως ο όγκος, απαιτούνται πολλαπλές και συνεχόμενες δόσεις κυτταροτοξικού και ότι οι πιθανότητες εκρίζωσης ενός νεοπλασματος είναι μεγαλύτερες, όσο ο αριθμός των κυττάρων που το αποτελεί είναι μικρότερος.



Σχήμα 3. Σχηματική αναπαράσταση του λογαριθμικού θανάτου (log kill) σε ταχέως εξελισσόμενο όγκο μετά από χημειοθεραπευτικές ώσεις. Κάθε ώση κυτταροστατικού σκοτώνει ένα ορισμένο ποσοστό κυττάρων (fractional "cell kill").

Στους ανθρωπίνους όγκους ο χρόνος διπλασιασμού δεν είναι ίδιος^{12,13}. Οι πλέον χημειοευαίσθητοι όγκοι, όπως οι όγκοι του όρχεος και το χοριοκαρκίνωμα, έχουν χρόνο διπλασιασμού μικρότερο του ενός μηνός. Όγκοι λιγότερο χημειοευαίσθητοι, όπως οι όγκοι κεφαλής και τραχήλου, διπλασιάζονται περίπου σε 2 μήνες, κ.ο.κ. Το φαινόμενο αυτό σχετίζεται με την χημειοευαισθησία των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων. Όγκοι με μεγάλα ποσοστά πολλαπλασιαζόμενων

κυττάρων αυξάνουν γρηγορότερα, αλλά και είναι πλέον ευαίσθητοι σε φάρμακα που καταστρέφουν τα κύτταρα σε φάση διαίρεσης και αντιστρόφως.

Σύμφωνα με την αρχή των Skipper-Schabel-Wilcox κατά την χορήγηση ενός χημειοθεραπευτικού φαρμάκου σε κάθε ώση καταστρέφεται πάντα ένα συγκεκριμένο ποσοστό κυττάρων, ανεξαρτήτως του ολικού αριθμού των κυττάρων του όγκου. Αυτό φαίνεται πιο εύκολα πάλι στην πειραματική λευχαιμία L1210.

Αν, επί παραδείγματι, μια συγκεκριμένη δόση φαρμάκου μειώνει τον αριθμό των κυττάρων από 10^6 σε 10^5 , η ίδια δόση σε άλλο όγκο αποτελούμενη από 10^4 κύτταρα θα τα μειώσει σε 10^3 . Αυτό καλείται λογαριθμικός θάνατος (log kill). Στις ίδιες μελέτες των Skipper-Schabel-Wilcox φάνηκε ότι ο ρυθμός αύξησης του υπολειμματικού νεοπλασματικού όγκου παραμένει ίδιος και μετά από τη χορήγηση του κυτταροτοξικού. Ένας πειραματικός όγκος θα μπορούσε να εξαφανιστεί με επαναλαμβανόμενες χημειοθεραπευτικές ώσεις, αλλά όχι με εφ' άπαξ δόση (σχήμα 3).

Γρήγορα, επίσης, διαπιστώθηκε ότι ο λογαριθμικός θάνατος των κυττάρων αυξάνει με την αύξηση της δόσης του φαρμάκου και ότι κατά τον συνδυασμό δύο ή περισσότερων φαρμάκων ο λογαριθμικός θάνατος πολλαπλασιάζεται (two-log kill, three-log kill, κ.ο.κ.)¹⁴. Βεβαίως, πρέπει να τονιστεί η σημασία που έχει το μέγεθος της νεοπλασματικής μάζας κατά την έναρξη της χημειοθεραπείας και η ανάγκη της χορήγησης των φαρμάκων στη μέγιστη δυνατή δόση, διότι έτσι οι καμπύλες δόσης-απάντησης λαμβάνουν τις πλέον ακραίες μορφές, επ' ωφελεία του ξενιστού.

Τέλος, τέθηκαν οι εφαρμογές της με-

τεγχειρωτικής χημειοθεραπείας¹⁵. Με βάση την υπόθεση ότι οι μικρομεταστάσεις είναι πολύ μικροί όγκοι (συλλογή κυττάρων), στους οποίους η πλειονότητα των κυττάρων βρίσκονται σε φάση πολλαπλασιασμού, η θεωρία των Skipper-Schabel-Wilcox θα είχε, θεωρητικώς, ακόμη πιο δραστική εφαρμογή. Μετέπειτα κλινικές εφαρμογές δεν επιβεβαίωσαν την αισιόδοξη αυτή θεωρία, δεδομένου ότι η επικουρική χημειοθεραπεία σε πολλούς όγκους έχει προσφέρει σημαντική βελτίωση του ελεύθερου νόσου διαστήματος και της ολικής επιβίωσης, όμως δεν απέτρεψε την εμφάνιση μεταστατικής νόσου. Οι λόγοι είναι διάφοροι και εν πολλοίς αναπάντητοι.

Η διάσταση της θεωρίας πάνω στην οποία βασίστηκε το μοντέλο των Skipper-Schabel-Wilcox και της κλινικής πράξης απασχόλησε τους εμπνευστές της θεμελιώδους αρχής της χημειοθεραπείας, οι οποίοι κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οφείλεται στην ανάπτυξη βιοχημικής αντίστασης στα κυτταροτοξικά. Από μελέτες που έγιναν μετέπειτα, φαίνεται ότι η εμφάνιση μεταλλάξεων και η γένεση κυττάρων με αντίσταση στα κυτταροτοξικά διενεργείται χρονικά νωρίς στην περίοδο ανάμεσα στην έναρξη της καρκινογένεσης και της κλινικής εμφάνισης του όγκου και έτσι εξηγείται η απόκλιση του θεωρητικού μοντέλου των Skipper-Schabel-Wilcox και της κλινικής πράξης¹⁶.

Αντίσταση στα κυτταροστατικά

Όπως προαναφέρθηκε, ένας από τους λόγους που το μοντέλο των Skipper-Schabel-Wilcox και οι αρχές της χημειοθεραπείας δεν επαληθεύονται στην κλινική πράξη είναι η αντίσταση στα κυτταροτοξικά φάρμακα. Το φαινόμενο της

αντίστασης δεν ερμηνεύεται με τα βιολογικά φαινόμενα της κυτταροκινητικής. Διάφοροι άλλοι μηχανισμοί μπορούν να δώσουν κάποιες εξηγήσεις.

Πρώτα, θα πρέπει να σημειωθεί, ότι πολλά νεοπλασματικά κύτταρα δυνατόν να πολλαπλασιαστούν σε ιστούς-καταφύγια, όπου δεν επιτυγχάνεται διάχυση των κυτταροτοξικών ανάλογη με αυτή που επιτυγχάνεται στους υπολοίπους ιστούς. Τα σπουδαιότερα τέτοια διαμερίσματα είναι οι όρχεις και το κεντρικό νευρικό σύστημα. Γι' αυτό, στην θεραπεία των ορχικών όγκων παρά την εφαρμογή (όταν χρειάζεται) χημειοθεραπείας ή ακτινοθεραπείας απαιτείται ορχεκτομή. Επίσης, στην οξεία λεμφοκυτταρική λευχαιμία των παιδιών, η προφυλακτική θεραπεία (χημειοθεραπεία ή ακτινοθεραπεία) του κεντρικού νευρικού συστήματος είναι αναγκαία για την αποφυγή υποτροπής της νόσου στις μήνιγγες.

Ένα άλλο πρόβλημα το οποίο πρέπει να τονιστεί είναι η «ψευδοαντίσταση», σε περιπτώσεις μειονεκτικής αποτελεσματικότητας των φαρμάκων, όταν υπάρχουν προβλήματα ατελούς απορρόφησης, ταχέως μεταβολισμού, ή αποτυχίας μετατροπής των φαρμάκων στην ενεργό μορφή τους. Εφ' όσον υπάρξει κλινική υπόνοια «ψευδοαντίστασης», αυτή υπερπηδιέται εύκολα με την αύξηση της δόσης μέχρις εμφάνισης ήπιας τοξικότητας¹⁷.

Μακράν όμως των ανωτέρω, το κυριότερο υπόστρωμα της αποτυχίας των χημειοθεραπευτικών είναι η γενετική ή βιοχημική διαφοροποίηση των νεοπλασματικών κυττάρων, όπως έχουν μελετηθεί από τους Goldie και Goldman.

Θεωρία των Goldie και Goldman

Η γενετική βάση του φαινομένου της

αντίστασης των φαρμάκων έχει τεκμηριωθεί σε πολλές μελέτες. Βασισμένοι σε προηγούμενες μελέτες των Luria και Delburg¹⁸, σύμφωνα με τις οποίες η αντίσταση των βακτηριδίων σε αντιβακτηριδιακά φάρμακα οφείλονται σε σποραδικές μεταλλάξεις, οι Goldie και Goldman επέκτειναν τις παρατηρήσεις τους σε κυτταροκαλλιέργειες νεοπλασματικών κυττάρων¹⁹. Σύμφωνα με τις παρατηρήσεις τους η αντίσταση των νεοπλασματικών κυττάρων στα κυτταροτοξικά μπορεί να είναι πρωτογενής (πριν από την έκθεση των κυττάρων σε φάρμακα) ή να αναπτυχθεί μετά από έκθεση σε φάρμακα. Οι Goldie και Goldman υπολόγισαν σε κυτταροκαλλιέργειες ότι η εμφάνιση αντίστασης στα φάρμακα είναι σταθερό γεγονός με εμφάνιση μιας σποραδικής μετάλλαξης ανά 10^6 έως 10^7 κύτταρα. Σύμφωνα με τη διαπίστωση αυτή, ένας όγκος, ο οποίος τη στιγμή της διάγνωσής του αποτελείται από 10^9 κύτταρα, εμπεριέχει 10^2 έως 10^3 ($10^9 \times 10^{-7}$ ως 10^{-6}) κύτταρα με χαρακτηριστικά αντίστασης.

Μέσω μαθηματικού μοντέλου, οι Goldie και Goldman μπόρεσαν να προβλέψουν την πιθανότητα εμφάνισης ανθεκτικών κυττάρων σε ένα πληθυσμό νεοπλασματικών κυττάρων, με βάση την κατωτέρω μαθηματική εξίσωση:

$$P_0 = 1 - [e^{-\alpha(N-1)}]^{-1}$$

όπου, P_0 : η πιθανότητα μη εμφάνισης αντοχής, N : ο αριθμός των νεοπλασματικών κυττάρων, α : ο ρυθμός εμφάνισης μεταλλάξεων, e : σταθερά).

Για παράδειγμα, με ρυθμό μεταλλάξεων $\alpha = 10^{-6}$ (μία μετάλλαξη ανά 10^6 κύτταρα), σε όγκο με πληθυσμό κυττάρων 10^5 η πιθανότητα να μην υπάρχουν ανθεκτικά κύτταρα υπολογίζεται σε 0,905. Μετά από δύο λογαριθμικές αυξήσεις

του όγκου, δηλαδή όταν ο όγκος περιέχει 10^7 κύτταρα, η ανάλογη πιθανότητα να μην υπάρχουν ανθεκτικά κύτταρα μειώνεται σε 0,000045¹⁶. Καθώς η χημειοθεραπεία του όγκου συνεχίζει, το ποσοστό των ανθεκτικών κυττάρων ανέρχεται και ενώ με κάθε ώση καταστρέφεται σημαντικό ποσοστό ευαίσθητων κυττάρων, τα ανθεκτικά συνεχίζουν τη κυτταροκινητική τους εξέλιξη, με συνέπεια η μάζα τους να αυξάνει συνεχώς και τελικά να κατακυριαρχούν στον όγκο.

Το πρότυπο των Goldie και Goldman έδειξε τον δρόμο σε δοκιμές διαφόρων τρόπων εφαρμογής της χημειοθεραπείας. Πρώτον, εφ' όσον όσο μικρότερος είναι ο όγκος, τόσο λιγότερα είναι τα κύτταρα με φαρμακευτική αντίσταση, άρα εφαρμογή της χημειοθεραπείας αμέσως μετά από την χειρουργική αφαίρεση του όγκου είναι η καλύτερη στιγμή, λόγω του ότι ο αριθμός των πιθανών υπολειμματικών νεοπλασματικών κυττάρων είναι μικρός και επομένως η πιθανότητα παρουσίας ανθεκτικών κυττάρων μικρή. Δεύτερον, η χρήση συνδυασμένης χημειοθεραπείας με πολλά φάρμακα που δεν παρουσιάζουν διασταυρούμενη αντίσταση (non-cross-resistance drugs) είναι πλέον αποτελεσματική από την μονοθεραπεία. Τρίτον, η χορήγηση των φαρμάκων με εναλλασσόμενο τρόπο (alternated) είναι (ενδεχομένως) πλέον αποτελεσματική από τον διαδοχικό (sequential)²⁰.

Το μοντέλο των Goldie και Goldman και οι θεραπευτικές του προεκτάσεις δέχθηκαν κριτικές και αμφισβητήσεις, οι περισσότερες από τις οποίες ξεκινούν από την κλινική εμπειρία. Παραδείγματα υπάρχουν πολλά: Πολλοί όγκοι, όπως το χοριοκαρκίνωμα και το λέμφωμα του Burkitt, δύο ταχέως εξελισσόμενες

νεοπλασίες θεραπεύονται με χημειοθεραπεία ακόμα και σε μεγέθη που ξεπερνούν το 10^7 κύτταρα, χωρίς να υπάρχουν σημεία αντίστασης^{21,22}. Σε άλλα κακοήθη νοσήματα, η καθυστέρηση εφαρμογής συμπληρωματικής (adjuvant) χημειοθεραπείας δεν αποβαίνει αρνητική στην επιβίωση των ασθενών. Κλασικό παράδειγμα είναι οι ασθενείς με μη-σεμινωματικούς όγκους του όρχεος σταδίου I, οι οποίοι τίθενται σε παρακολούθηση μετά από ορχεκτομή. Η αποτελεσματικότητα της χημειοθεραπείας μετά από εμφάνιση υποτροπής στους ασθενείς αυτούς δείχνει την απουσία *de novo* φαρμακευτικής αντίστασης και το *ιάσιμο* της νόσου²³. Τέλος, σε πολλά πρωτόκολλα τυχαίας κατανομής, η χορήγηση εναλλασσόμενης χημειοθεραπείας σε ασθενείς με διάφορες νεοπλασίες δεν έδειξαν όφελος, διαψεύδοντας το πρότυπο των Goldie και Goldman²⁴⁻²⁷.

Από τα ανωτέρω, φαίνεται ότι η θεωρία των Goldie και Goldman θεμελιώθηκε σε βιολογικά φαινόμενα και εκφράστηκε με μαθηματικό μοντέλο. Η μεταφορά του στη κλινική πράξη έδειξε ότι είναι εφαρμόσιμο σε πολλές νεοπλασίες, αλλά όχι σε όλες. Θεωρείται ότι έδωσε μεγάλη ώθηση στην έρευνα και ανάπτυξη των αρχών της χημειοθεραπείας, αλλά δεν έδωσε τελεσίδικες ερμηνείες.

Μοντέλο του Gompertz

Η ανάπτυξη των ανθρωπίνων νεοπλασματικών όγκων σπανίως παίρνει τη μορφή του μοντέλου που καθόρισαν οι Skipper-Schabel-Wilcox. Ελάχιστοι όγκοι (όπως ο πειραματικός L1210 και ίσως κάποιες μεταστατικές εστίες) ακολουθούν τέτοια πρότυπα ανάπτυξης. Ο λόγος είναι ότι σε πραγματικές συνθήκες οι περισσότεροι όγκοι δεν έχουν εκ-

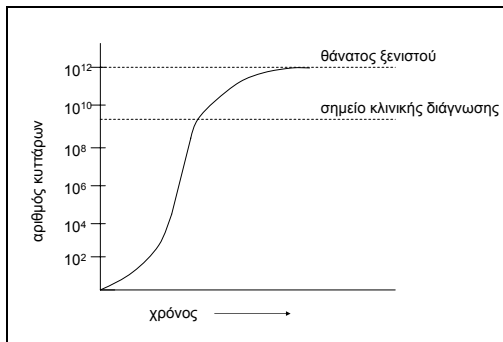
θετική ανάπτυξη και δεν είναι ομοιογενείς στην ευαισθησία τους έναντι των κυτταροτοξικών φαρμάκων. Οι ανθρωπίνοι όγκοι δεν έχουν εκθετική ανάπτυξη, διότι δεν έχουν σταθερό χρόνο διπλασιασμού. Κι αυτό, διότι ο χρόνος διπλασιασμού είναι συνισταμένη πολλών συνιστωσών, όπως ο ιστολογικός τύπος (κάθε ιστολογικός τύπος νεοπλάσματος έχει διαφορετική διάρκεια κυτταρικού κύκλου), το ποσοστό των πολλαπλασιαζομένων κυττάρων (GF) και ο ρυθμός της απώλειας κυττάρων (Cell Loss Fraction)²⁸.



Εικόνα 1. Ο Benjamin Gompertz (1779-1865).

Το 1825 ο μαθηματικός Benjamin Gompertz (εικόνα 1) διατύπωσε τον *μη εκθετικό τύπο ανάπτυξης*. Ο τύπος αυτός της ανάπτυξης τράβηξε την προσοχή των ερευνητών οι οποίοι ασχολούνται με την κυτταροκινητική, διότι διαφέρει σε πολλά σημεία από το μοντέλο των Skipper-Schabel-Wilcox¹⁶. Στο εκθετικό μοντέλο η σχέση του ρυθμού ανάπτυξης και του μεγέθους του όγκου παραμένει σταθε-

ρή. Αντιθέτως, στο Γκομπερτζιανό μοντέλο ανάπτυξης ο χρόνος διπλασιασμού αυξάνει σταθερά, όσο ο όγκος γίνεται μεγαλύτερος δείχνοντας ότι ο αριθμός των κυττάρων αυξάνει με τον χρόνο, αλλά ο σχετικός ρυθμός αύξησης πέφτει εκθετικά, όταν η μάζα φτάνει σε ένα «πλατώ» (σχήμα 4).



Σχήμα 4. Η καμπύλη ανάπτυξης κατά το μοντέλο του Gompertz. Κατά το πρώιμο στάδιο υπάρχει εκθετική ανάπτυξη. Καθώς ο όγκος μεγαλώνει σε σημείο να δίνει συμπτώματα, το μεγαλύτερο μέρος της ανάπτυξης έχει ολοκληρωθεί και η ανάπτυξη δεν είναι εκθετική, αλλά έχει πάρει σχήμα «πλατώ».

Ανάμεσα στα 10^2 κύτταρα και στα 10^9 κύτταρα, όπου ο όγκος έχει κλινική υπόσταση, η ανάπτυξη του όγκου παίρνει σχήμα ημιλογαριθμικής καμπύλης (καμπύλη του Gompertz), η οποία αποκλίνει σχηματίζοντας «πλατώ» (ασύμμετρη σιγμοειδής καμπύλη), αντιθέτως με την εκθετική καμπύλη του μοντέλου των Skipper-Schabel-Wilcox, η οποία εμφανίζει ευθεία γραμμή.

Η βιολογική βάση της κατά Gompertz ανάπτυξης του όγκου δεν είναι απολύτως γνωστή. Στην αρχική φάση της καμπύλης υπάρχει μεγάλη ανάπτυξη του όγκου συνεπεία αυξημένων μιτώσεων, οι οποίες υπερακοντίζουν την απόπτωση. Κοντά στη φάση του «πλατώ» αρχίζει να εμφανίζεται μια εξισορρόπηση ανάμεσα στα δύο φαινόμενα. Η απά-

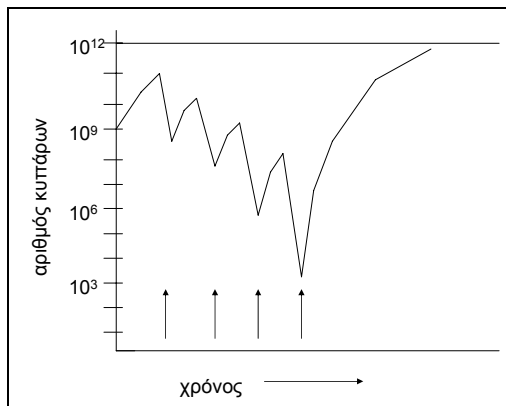
ντηση στο θέμα αυτό είναι ακόμη ανοιχτή προς ερμηνεία.

Ενδεχομένως, αυτό να οφείλεται περισσότερο στη μείωση του αριθμού των πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων, όταν ο όγκος αυξάνει σε μέγεθος και λιγότερο στην απώλεια κυττάρων. Αυτό γίνεται, διότι στους μεγάλους όγκους η αναλογία πολλαπλασιαζόμενων και ολικών κυττάρων (growth fraction) του όγκου μειώνεται. Η αιτία που παρουσιάζεται αυτό το φαινόμενο επιδέχτηκε διάφορες ερμηνείες. Μέχρι πρόσφατα, ιδιαίτερα ελκυστική ήταν η άποψη του Tannock, ότι οι μεγάλοι όγκοι παρουσιάζουν φαινόμενα μειωμένης «τροφοδοσίας» θρεπτικών υλικών, ενδεχομένως λόγω προβλημάτων αιμάτωσης και οξυγόνωσης κατά τη διαδικασία της ανάπτυξης τους²⁹. Νέες όμως μελέτες έχουν αποδείξει ότι τέτοιο φαινόμενο δεν υφίσταται.

Αντιθέτως, μάλιστα, οι όγκοι φτάνουν σε μεγάλα μεγέθη λόγω της αυξημένης δυνατότητάς τους να αναπτύσσουν νεοαγγείωση (neovascularization)³⁰. Νεότερες απόπειρες ερμηνείας του Γκομπερτζιανού μοντέλου ανάπτυξης αναφέρονται περισσότερο στη σύνθετη σχέση των καρκινικών κυττάρων με το περιβάλλον τους (microanatomy, θεωρία των fractals)³¹. Επίσης, πολλοί αυτοκρινείς και παρακρινείς αυξητικοί παράγοντες καθορίζουν διηθητικές και μεταστατικές διαδικασίες, οι οποίες επηρεάζουν τους ρυθμούς ανάπτυξης των όγκων⁵.

Το Γκομπερτζιανό μοντέλο, όπως αναφέρθηκε, δεν ερμηνεύει όλα τα βιολογικά διαδραματιζόμενα της ανάπτυξης ενός όγκου, όμως μπορεί να γίνει βάση σημαντικών παρατηρήσεων. Μία ενδιαφέρουσα παρατήρηση είναι ότι οι όγκοι στην προκλινική (προκαρκινική-precancerous) φάση έχουν ίσως ένα μακρύ

«πλατώ», με πολύ αργή αύξηση, μέχρις ενός ορίου-ουδού, πέραν του οποίου (εξ αιτίας διαφόρων βιολογικών δρώντων, π.χ. αυξητικοί παράγοντες) ο όγκος αυξάνει ξαφνικά¹⁶.



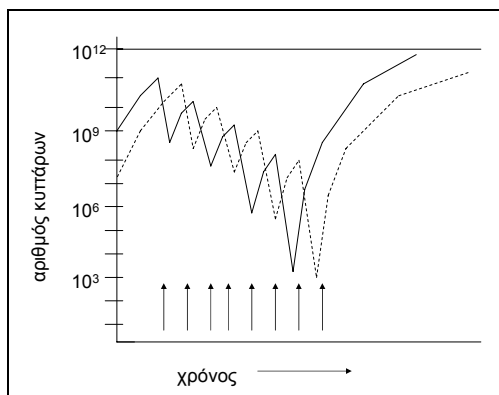
Σχήμα 5. Ο λογαριθμικός θάνατος (log kill) στο μοντέλο του Gompertz. Σε κάθε χημειοθεραπευτική ώση «πεθαίνει» ίδιο ποσοστό κυττάρων και όχι ίδιος αριθμός κυττάρων.

Βασισμένοι στο Γκομπερτζιανό μοντέλο, η χορήγηση της χημειοθεραπείας τροποποιεί την καμπύλη κατά διαφορετικό τρόπο (σχήμα 5). Όπως έχει αποδειχθεί σε πειραματικές και κλινικές μελέτες το τελικό αποτέλεσμα είναι η υποτροπή του όγκου, λόγω του πολλαπλασιασμού των ολίγων μη θανατουμένων υπολειμματικών νεοπλασματικών κυττάρων. Η προσθήκη δεύτερου φαρμάκου ενδεχομένως μεταφέρει την καμπύλη προς τα δεξιά (σχήμα 6), αλλά δεν φτάνει πάντα στην καταστροφή όλων των κυττάρων ενός όγκου. Το γεγονός αυτό δείχνει το σύνθετο πρόβλημα της κυτταροκινητικής των όγκων και συνεπεία τούτου της θεραπείας τους.

Το μοντέλο Norton-Simon

Η αρνητική εμπειρία της υποτροπής των όγκων μετά από χημειοθεραπείες είναι ο κυριότερος λόγος της προσπάθειας ανεύρεσης άλλων θεωρητικών

μοντέλων, τα οποία θα επέτρεπαν καλύτερες πληροφορίες στη σχέση ανάπτυξης όγκου και απάντησης στη χημειοθεραπεία και ως εκ τούτου καλύτερα αποτελέσματα ως προς τον τελικό στόχο (μείωση υποτροπών, καλύτερες επιβιώσεις). Το εκθετικό και το Γκομπερτζιανό μοντέλο μπορεί να ερμηνεύουν αρκετούς όγκους, όχι όμως όλους.

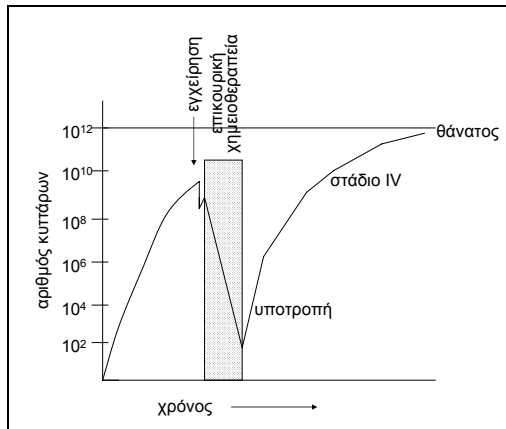


Σχήμα 6. Ο λογαριθμικός θάνατος στο μοντέλο του Gompertz κατά τη συνδυασμένη χημειοθεραπεία (two-log kill).

Τα μεγάλα θεωρητικά προβλήματα εξακολουθούν να αφορούν α) στην αδυναμία εκρίζωσης μεμονωμένων νεοπλασματικών κυττάρων που ο πολλαπλασιασμός τους οδηγεί στην υποτροπή (regrowth) του όγκου, β) στη πολυκλωνικότητα των όγκων, έτσι ώστε κάθε κλώνος θεωρητικώς έχει διαφορετική καμπύλη ανάπτυξης και διαφορετική ευαισθησία στα χημειοθεραπευτικά, και γ) στην θεωρητική απόκλιση ανάμεσα στις καμπύλες ανάπτυξης μικρών και μεγάλων όγκων.

Οι Norton και Simon προσπάθησαν να εξηγήσουν την αποτυχία της εφαρμοσμένης χημειοθεραπείας με βάση τα μοντέλα Skipper-Schabel-Wilcox και Gompertz, με την έμφασή τους στη πολυκλωνικότητα των όγκων και ως εκ

τούτου την ετερογένεια στην ευαισθησία, έτσι ώστε να απαιτούνται πολλαπλά φάρμακα ή πολλαπλά σχήματα. Οι Norton και Simon μετά από εργαστηριακές και κλινικές μελέτες εξέφρασαν την υπόθεσή τους ότι η θεραπεία προκαλεί ένα ποσοστό ύφεσης, το οποίο είναι αναλογικό προς τον αναμενόμενο για ένα συγκεκριμένο όγκο ρυθμό ανάπτυξης³².

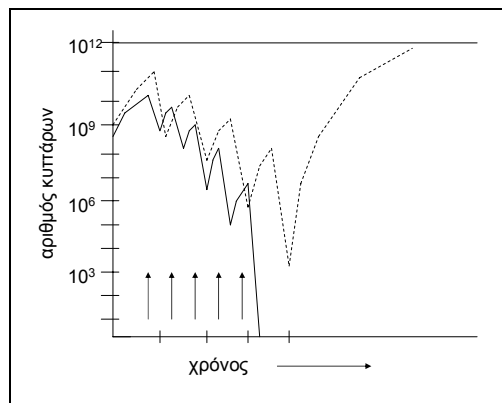


Σχήμα 7. Υποτροπή της νόσου (σύμφωνα με το Γκομπερτζιανό μοντέλο) μετά από επικουρική χημειοθεραπεία

Σύμφωνα με τους Norton και Simon η συμβατική χημειοθεραπεία σκοτώνει τα κύτταρα ευαίσθητων κλώνων, αλλά ανθεκτικά κύτταρα συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται (σχήμα 7)¹⁶. Το μοντέλο των Norton-Simon υιοθετεί την άποψη ότι ο καλύτερος τρόπος θεραπείας είναι να εκριζωθούν πρώτα τα επικρατούντα κύτταρα τα οποία αναπτύσσονται ταχέως και είναι πλέον χημειοευαίσθητα, και μετά τα πλέον αργά πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα που είναι πιο ανθεκτικά στα κυτταροτοξικά. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τη (χρονική) συμπύκνωση των ώσεων και με την διαδοχική χορήγηση των φαρμάκων (σχήμα 8)³³.

Με το μοντέλο των Skipper-Schabel-Wilcox και τις αρχές της χημειοθεραπείας, αλλά και με την κλινική εμπειρία

αποδείχτηκε πλέον αποτελεσματική η χορήγηση της μεγαλύτερης δυνατής δόσης (dose-intense therapy). Η συνεχώς αυξανόμενη δόση όμως φτάνει σε ένα καθοριστικό όριο στη σχέση δόσης/αποτελέσματος πέραν του οποίου η χημειοθεραπεία είναι τοξική χωρίς περαιτέρω βελτίωση του αποτελέσματος.

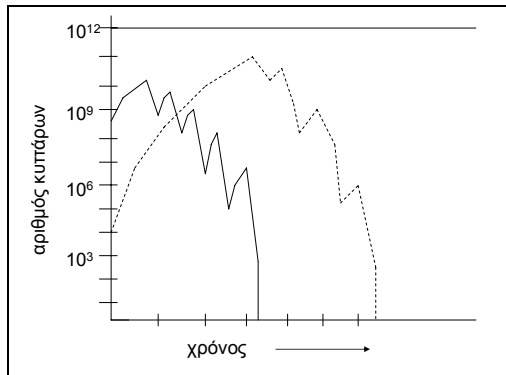


Σχήμα 8. Η χορήγηση της χημειοθεραπείας σε πιο συχνά χρονικά διαστήματα (π.χ. ανά 14 ή 10 μέρες) (dose-dense χημειοθεραπεία - με συνεχόμενη γραμμή) σύμφωνα με το μοντέλο των Norton-Simon αλλάζει την Γκομπερτζιανή κυτταροκινητική των νεοπλασματικών κυττάρων.

Στο μοντέλο των Norton-Simon η αποτελεσματικότητα αυξάνει με την αύξηση της πυκνότητας χορήγησης των χημειοθεραπευτικών (dose-dense therapy) και τη διαδοχική (sequential) χορήγηση φαρμάκων (σχήμα 9). Τα φάρμακα ή οι συνδυασμοί που χορηγούνται στην αρχή πρέπει να είναι τα πιο δραστικά και να ακολουθούν φάρμακα ή συνδυασμοί με μη διασταυρούμενη αντίσταση³⁴.

Το μοντέλο της διαδοχικής χορήγησης αναπτύχθηκε επιτυχώς κατ' αρχήν σε εργαστήρια με πειραματικούς όγκους και αργότερα σε κλινικές μελέτες. Επί παραδείγματι, όγκοι L1210 θεραπεύτηκαν με 2-3 ώσεις κυτοσίνης αραβινοσίδης και 6-θειογουανίνης ακολουθούμε-

νοι από μία ώση κυκλοφωσφαμίδης και BCNU³⁵. Στην κλινική πράξη γνωστές είναι οι μελέτες κατ' αρχήν της ομάδας του Μιλάνου, όπου η διαδοχική χορήγηση του συνδυασμού CMF (Cyclophosphamide, Methotrexate, Fluorouracil) και της αδριαμυκίνης σε γυναίκες με καρκίνο μαστού αποδείχθηκε δραστικότερη της εναλλασσόμενης χορήγησης^{36,37}.



Σχήμα 9. Διαδοχική (sequential) και σε συχνά χρονικά διαστήματα (dose-dense) χορήγηση της χημειοθεραπείας σύμφωνα με το μοντέλο των Norton-Simon.

Μετέπειτα μεγάλες μελέτες τυχαίας κατανομής ασθενών, με αποκορύφωμα τη μελέτη 9741 του Cancer and Leukemia Group B, επιβεβαίωσαν τα ανωτέρω αποτελέσματα³⁸. Παρόμοιες μελέτες απέδειξαν την δραστικότητα της μεθόδου και σε άλλες κακοήθειες, όπως στο οστεοσάρκωμα, στη νόσο του Hodgkin, σε λευχαιμίες, κ.ά.³⁹⁻⁴¹.

Οι υποστηρικτές της μεθόδου πιστεύουν ότι υπάρχει προοπτική για περαιτέρω βελτιώσεις με διάφορους τρόπους, όπως:

- 1) μειώνοντας ακόμη περισσότερο το μεσοδιάστημα των ώσεων σε 10 ή 11 μέρες,
- 2) μακραίνοντας τη περίοδο χορήγησης των ανθρακυκλινών και ταξανών,
- 3) προσθέτοντας στη χημειοθεραπεία μη κυτταροτοξικά φάρμακα, όπως αντι-HER2 αντισώματα-trastuzumab,
- 4) προ-

σθέτοντας αντιαγγειογενετικούς παράγοντες (π.χ. bevacizumab)⁴².

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΗ ΚΥΤΤΑΡΟΤΟΞΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

Παλαιότερα (π.χ. ορμόνες) και νέα φάρμακα (π.χ. μονοκλωνικά αντισώματα, αντιαγγειογενετικοί παράγοντες) αλλάζουν το τοπίο των θεωρητικών μοντέλων εφαρμογής των αντινεοπλασματικών φαρμάκων δρώντας με άλλους δρόμους.

Σε πολλές νεοπλασίες, η κακοήθης εξαλλαγή αλλοιώνει την γονιδιακή έκφραση αυξητικών παραγόντων, τους υποδοχείς τους και τις πρωτεΐνες μεταφοράς του ενδοκυττάρου σήματος. Από την άλλη μεριά, η συνέργεια κυτταροτοξικών και μη κυτταροτοξικών φαρμάκων σε πολλές περιπτώσεις έχει αποδειχθεί ότι βελτιώνει την αντινεοπλασματική δράση. Έτσι, π.χ. η ενεργοποίηση της kinase C πρωτεΐνης ενισχύει την κυτταροτοξικότητα της σισπλατίνης, χωρίς να αυξάνει την πρόσληψη του φαρμάκου.

Αντισώματα έναντι του υποδοχέως του επιδερμικού αυξητικού παράγοντος (EGFR) δρουν συνεργατικά με τη σισπλατίνη και την αδριαμυκίνη¹⁴. Τέλος, πολλές κλινικές μελέτες έχουν αποδείξει μεγαλύτερη δραστικότητα όταν κυτταροτοξικά (ανθρακυκλίνες, ταξανές, κλπ) συνδυάζονται με μονοκλωνικά αντισώματα (trastuzumab)⁴³. Νέοι παράγοντες (αντισώματα, αναστολείς κινασών, αναστολείς ras) και άλλα μικρά μόρια με στόχο την μεταγωγή του σήματος μπήκαν ή μπαίνουν στην έρευνα και την κλινική εφαρμογή^{44,45}. Ο δρόμος είναι ακόμη μακρύς, αλλά η ανάλυση της καμπύλης ανάπτυξης των όγκων θα έχει πάντα θέση στη μελέτη της φυσικής ιστορίας των νεοπλασματικών νόσων,

την πρόγνωση και την απάντηση στα αντινεοπλασματικά φάρμακα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. McIntosh JR, Koonce MP. Mitosis. *Science* 1989;246:622-8
2. Laskey RA, Fairman MP, Blow JJ. S-phase of the cell cycle. *Science* 1989;246:609-14
3. Bellamy CO. p53 and apoptosis. *Br Med Bull* 1997;53:522-38
4. Leake R. The cell cycle and regulation of cancer cell growth. *Ann NY Acad Sci* 1996;784:252-62
5. Park MT, Lee SJ. Cell cycle and cancer. *J Biochem Mol Biol* 2003;36(1):60-5
6. Sandhu C, Slingerland J. Deregulation of the cell cycle in cancer. *Cancer Detect Prev* 2000;24(2):107-18
7. McDonald ER 3rd, El-Deiry WS. Cell cycle control as a basis for cancer drug development. *Int J Oncol.* 2000;16(5):871-86
8. Casciato DA. Cancer Chemotherapy Agents. In: Casciato DA, ed. *Manual of Clinical Oncology*, 5th edition. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, 2004:49-101
9. Skipper HE. Laboratory models. The historical perspective. *Cancer Treat Rep* 1986;70:3-7
10. Simpson-Herren L, Lloyd HH. Kinetic parameters and growth curves for experimental tumor systems. *Cancer Chemother Rep* 1970;54:143-74
11. Skipper HE. Improvement of the model systems. *Cancer Res* 1969;29(12):2329-33
12. Shackney SE, McCormack GW, Cuchural GJ Jr. Growth rate patterns of solid tumors and their relation to responsiveness to therapy: an analytical review. *Ann Intern Med* 1978;89(1):107-21
13. Chu E, DeVita VT Jr. Principles of Medical Oncology. In: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA (eds), *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 7th edition. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, 2005:295-306
14. Yarbrow JW. The scientific basis of cancer chemotherapy. In: Perry MC (ed). *The chemotherapy source book*, 2nd edition. Williams and Wilkins, Baltimore, 1997:3-18
15. Skipper HE. Adjuvant chemotherapy. *Cancer*;41(3):936-40
16. Norton L. The Norton-Simon Hypothesis. In: Perry MC, ed: *The Chemotherapy Source Book*, 2nd edition. William & Wilkins. Baltimore, 1997:43-61
17. Cooper MR, Cooper RM. Principles of Medical Oncology. In: Holleb AI, Fink DJ, Murphy GP (eds), *American Cancer Society Textbook of Clinical Oncology*. American Cancer Society, 1991:47-68
18. Luria SE, Delbrück M. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics* 1943;28:491
19. Goldie JH, Coldman AJ. A mathematic model for relating the drug sensitivity of tumors to their spontaneous mutation rate. *Cancer Treat Rep* 1979;63:1727-33
20. Goldie JH, Coldman AJ. Theoretical considerations regarding the early use of adjuvant chemotherapy. *Recent Results Cancer Res* 1986;103:30-5
21. Bociak RG. Adult Burkitt's lymphoma. *Clin Lymphoma* 2005;6(1):11-20
22. Hussain A. Germ cell tumors. *Curr Opin Oncol* 2005;17(3):268-74
23. Hahn NM, Sweeney CJ. Germ cell tumors: an update of recent data and review of active protocols in stage I and metastatic disease. *Urol Oncol* 2005;23(4):293-302
24. Buzzoni R, Bonadonna G, Valagussa P, Zambetti M. Adjuvant chemotherapy with doxorubicin plus cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in the treatment of resectable breast cancer with more than three positive axillary nodes. *J Clin Oncol* 1991;9:2134-40
25. Bonadonna G, Zambetti M, Valagussa P. Sequential or alternating doxorubicin and CMF regimens in breast cancer with more than three positive nodes. *JAMA* 1995;273:542-7
26. Wampler GL, Heim WJ, Ellison NM, Ahlgren JD, Fryer JG. Comparison of cyclophosphamide, doxorubicin, and vincristine with an alternating regimen of meth-

- otrexate, etoposide, and cisplatin/cyclophosphamide, doxorubicin, and vincristine in the treatment of extensive-disease small-cell lung carcinoma: a Mid-Atlantic Oncology Program study. *J Clin Oncol*. 1991; 9(8):1438-45
27. Longo DL, DeVita VT Jr, Duffey PL, et al. Superiority of ProMACE-CytaBOM over ProMACE-MOPP in the treatment of advanced diffuse aggressive lymphoma. Results of a prospective randomized trial. *J Clin Oncol* 1991;9:25-38
 28. Tubiana M. Tumor cell proliferation kinetics and tumor growth rate. *Acta Oncol* 1989;28:113-21
 29. Tanock IF. The relationship between cell proliferation and the vascular system in a transplanted mouse mammary tumor. *Br J Cancer* 1968;22:258-73
 30. Auguste P, Lemiere S, Larrieu-Lahargue F, Bikfalvi A. Molecular mechanisms of tumor vascularization. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005;54(1):53-61
 31. Baish JW, Jain RK. Fractals and cancer. *Cancer Res* 2000;60:3683-88
 32. Norton L, Simon R. The Norton-Simon hypothesis revisited. *Cancer Treat Rep* 1986;70(1):163-9
 33. Fornier M, Norton L. Dose-dense adjuvant chemotherapy for primary breast cancer. *Breast Cancer Res* 2005;7(2):64-9
 34. Hudis C, Seidman A, Raptis G, et al. Sequential adjuvant therapy: the Memorial Sloan-Kettering Cancer Center experience. *Semin Oncol* 1996;23(1 Suppl 1):58-64
 35. Skipper HE. Analyses of multiarmed trials in which animals bearing different burdens of L1210 leukemia cells were treated with two, three, and four drug combinations delivered in different ways with varying dose intensities of each drug and varying average dose intensities. *South Res Inst Booklet* 7 1986;42:87
 36. Bonadonna G, Zambetti M, Valagusa P. Sequential or alternating doxorubicin and CMF regimens in breast cancer with more than three positive nodes. *JAMA* 1995; 273:542-7
 37. Bonadonna G, Zambetti M, Moliterni A et al. Clinical relevance of different sequencing of doxorubicin and cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in operable breast cancer. *J Clin Oncol* 2004;22:1614-20
 38. Citron ML, Berry DA, Cirincione C, et al. Randomized Trial of Dose-Dense Versus Conventionally Scheduled and Sequential Versus Concurrent Combination Chemotherapy as Postoperative Adjuvant Treatment of Node-Positive Primary Breast Cancer: First Report of Intergroup Trial C9741/Cancer and Leukemia Group B Trial 9741. *J Clin Oncol* 21:1431-9
 39. Cortes EP, Holland JF. Adjuvant chemotherapy for primary osteogenic sarcoma. *Surg Clin North Am* 1981; 61(6):1391-404
 40. Day RS. Treatment sequencing, asymmetry, and uncertainty: protocol strategies for combination chemotherapy. *Cancer Res* 1986;46(8):3876-85
 41. Mayer RJ, Davis RB, Schiffer CA, et al. Intensive postremission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. *Cancer and Leukemia Group B. N Engl J Med*. 1994 ;331(14):896-903
 42. Norton L. Conceptual and Practical Implications of Breast Tissue Geometry: Toward a More Effective, Less Toxic Therapy. *Oncologist* 2005;10:370-81
 43. Romond EH, Perez EA, Bryant J, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353(16):1673-84
 44. Beeram M, Patnaik A, Rowinsky EK. Raf: a strategic target for therapeutic development against cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23(27):6771-90
 45. Krause DS, Van Etten RA. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N Engl J Med* 2005;353(2):172-87