







**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ  
ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ**

**ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ  
ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΣΤΑ ΟΥΡΑ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕ  
ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΠΝΕΥΜΟΝΑ ΧΩΡΙΣ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΕΜΦΑΝΩΝ  
ΜΕΤΑΣΤΑΣΕΩΝ ΣΤΟ ΟΥΡΟΠΟΙΗΤΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ**

**ΕΥΑΓΓΕΛΟΥ Γ. ΒΟΥΛΓΑΡΗ  
ΙΑΤΡΟΥ  
ΠΑΘΟΛΟΓΟΥ ΟΓΚΟΛΟΓΟΥ**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2012**



Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν.5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)



**Ημερομηνία αίτησης του κ. Βούλαρη Ευάγγελου: 29-9-2007**

**Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 615<sup>α</sup>/16-10-2007**

**Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:**

Επιβλέπων

Παυλίδης Νικόλαος Καθηγητής Παθολογίας –Ογκολογίας Ιατρικής Σχολής  
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Μαλάμου –Μήτση Βασιλική Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής  
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Σοφικίτης Νικόλαος Καθηγητής Ουρολογίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου  
Ιωαννίνων

**Ημερομηνία ορισμού θέματος: 10-12-2007**

*«Ανίχνευση καρκινικών κυττάρων στα ούρα ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα χωρίς  
την παρουσία εμφανών μεταστάσεων στο ουροποιητικό σύστημα»*

**ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ :**

<b>Μαλάμου –Μήτση Βασιλική</b>	Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Παυλίδης Νικόλαος</b>	Καθηγητής Παθολογίας -Ογκολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Φώτσης Θεόδωρος</b>	Καθηγητής Βιολογικής Χημείας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Σοφικίτης Νικόλαος</b>	Καθηγητής Ουρολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Μπατιστάτου Άννα</b>	Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Γούσια Άννα</b>	Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων
<b>Πενθερουδάκης Γεώργιος</b>	Επίκουρος Καθηγητής Ογκολογίας, Ιατρικής Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 14-12-2011

**ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΣΧΟΛΗΣ**

**Μαργαρίτα Τζαφλίδου**

Καθηγήτρια Ιατρικής Φυσικής



Η Γραμματέας της Σχολής

**ΜΑΡΙΑ ΚΑΠΙΤΟΠΟΥΛΟΥ**





## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θα ήθελα να εκφράσω την ειλικρινή ευγνωμοσύνη μου σε όλους τους συναδέλφους και συνεργάτες που με υποδέχτηκαν με φιλία, με στήριξαν και βοήθησαν ποικιλοτρόπως κατά την εκπόνηση της εργασίας αυτής. Ιδιαίτερα:

Τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής,  
Νικόλαο Παυλίδη, Καθηγητή Ογκολογίας, για την πολύπλευρη και ουσιαστική στήριξη, ενθάρρυνση και επιστημονική καθοδήγηση.  
Βασιλική Μαλάμου-Μήτση, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής, για την πολύτιμη καθοδήγηση και ανεκτίμητη βοήθεια της.  
Νικόλαο Σοφικίτη, Καθηγητή Ουρολογίας, για την εποικοδομητική κριτική συμβολή του στη δομή της διατριβής.

Τους εκλεκτούς κυρίους και κυρίες,  
Γεώργιο Πενθερουδάκη, Επίκουρο Καθηγητή Ογκολογίας, για την ουσιαστική καθοδήγησή του και την αμέριστη συμπαράστασή του στην εκπόνηση της διατριβής μου,  
Λίνα Παππά, Κυτταρολόγο, Διευθύντρια ΕΣΥ, για την ανεκτίμητη βοήθεια της στην ανάλυση των κυτταρολογικών παρασκευασμάτων,  
Μαρία Μπάφα, Κυτταρολόγο, Διευθύντρια ΕΣΥ, για την ανεκτίμητη συνεισφορά της στην ανάλυση την κυτταρολογικών παρασκευασμάτων,  
Άννα Γούσια, Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής, για τη βοήθειά της στη μελέτη των χημειοκινών.  
Τον κύριο Π. Δαλέζη, την κυρία Χ. Τσομπανίδου, τον κύριο Γ. Γερομίχαλο, τον κύριο Α. Παπαγεωργίου για τη βοήθεια στην εκτέλεση του πειραματικού σκέλους στο Γ.Ν. «Θεαγένειο» Θεσσαλονίκης καθώς και τον Καθηγητή Φυσιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών κύριο Μ. Κουτσιλιέρη για την καθοδήγησή του.

Τα μέλη της επταμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, Καθηγητή Βιολογικής Χημείας κ. Φώτση και Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής κ. Μπατιστάτου.

Τους συναδέλφους μου ιατρούς, το νοσηλευτικό προσωπικό της Ογκολογικής Κλινικής και τους ασθενείς μας.



ΑΦΙΕΡΩΝΕΤΑΙ

Στη σύζυγο μου και την κόρη μας  
για την αμέριστη υποστήριξη και αγάπη τους.



## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ολοκληρώνοντας το βασικό μέρος της (τριετούς) εκπαίδευσης στην Παθολογία στο 424 ΓΣΝΕ, επέλεξα να βρεθώ στα Γιάννενα για να συνεχίσω το ειδικό μέρος της ειδικότητας στην Πανεπιστημιακή Ογκολογική Κλινική, υπό την καθοδήγηση του Καθηγητή κ. Νικόλαου Παυλίδη. Ένα «περίεργο» εύρημα σε ασθενή της κλινικής μας, που έπασχε από μεταστατικό καρκίνο του πνεύμονα, έδωσε το έναυσμα για την εκπόνηση της διδακτορικής αυτής διατριβής. Ο ασθενής εμφάνισε θετική για κακοήθεια κυτταρολογική εξέταση ούρων χωρίς να έχει εμφανείς μεταστάσεις στο ουροποιητικό του σύστημα. Τα κύτταρα στην εξέταση ήταν, μορφολογικά, πανομοιότυπα με τα κύτταρα της πρωτοπαθούς εστίας. Η εμφάνιση θετικής κυτταρολογικής εξέτασης ούρων είναι αναμενόμενη σε ασθενείς με κακοήθειες του ουροποιητικού ή σε παρουσία μεταστάσεων στο ουροποιητικό και έχει περιγραφεί πολλάκις στη βιβλιογραφία. Αντίθετα, επί απουσίας εμφανών μεταστάσεων στο ουροποιητικό ή άλλων κακοηθειών εκτός ουροποιητικού συστήματος, η θετική κυτταρολογική ούρων είναι μη αναμενόμενη. Το φαινόμενο αυτό προκάλεσε ιδιαίτερο ενδιαφέρον αφού μέχρι τότε δεν είχε αναφερθεί ξανά στη βιβλιογραφία, πλην κάποιων σποραδικών αναφορών σε ασθενείς με μη-Hodgkin's λεμφώματα. Μια αρχική μελέτη του φαινομένου σε ένα μικρό πληθυσμό ασθενών έδειξε ότι το εύρημα δεν ήταν τυχαίο, αφού πέντε ακόμα ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα εμφάνισαν το ίδιο φαινόμενο. Η παρατήρηση δημοσιεύτηκε από την κλινική μας σε διεθνές περιοδικό και αποφασίστηκε η διερεύνηση του φαινομένου, προοπτικά, σε ευρύτερο αριθμό ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα (μεταστατικό και μη) καθώς και σε ομάδες ελέγχου (control groups). Η μελέτη πήρε τη μορφή πρωτοκόλλου και αποτέλεσε το θέμα της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Σκοπός της ήταν να εκτιμηθεί η συχνότητα του φαινομένου σε ασθενείς με μικροκυτταρικό και μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα όλων των σταδίων καθώς και η πιθανή συσχέτιση με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους. Προσπαθήσαμε επίσης να βρούμε αν το εύρημα αυτό έχει κάποια προγνωστική ή προβλεπτική αξία για τους ασθενείς μας όπως επίσης και τους πιθανούς μηχανισμούς παθογένειας πίσω από αυτό. Στα πλαίσια διερεύνησης των παθογενετικών μηχανισμών διενεργήθηκε και μελέτη του φαινομένου σε πειραματόζωα σε συνεργασία με το νοσοκομείο «Θεαγένειο» της Θεσσαλονίκης.

Τα κεφάλαια της διδακτορικής αυτής διατριβής περιγράφουν το γενικό μέρος του πρωτοκόλλου με διερεύνηση της βιβλιογραφίας, τις πληθυσμιακές ομάδες αρρώστων που συμμετείχαν και τη χρησιμοποιηθείσα μεθοδολογία, τα αποτελέσματα της έρευνας και την κριτική συζήτηση.

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

<b>ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	5
<b>Ιστορική αναδρομή και βιβλιογραφική ανασκόπηση</b>	7
<b>1. Καρκίνος του Πνεύμονα</b>	7
1.1 Επιδημιολογία, παράγοντες κινδύνου και ογκογένεση	7
1.2 Πρόληψη και screening	10
1.3 Ιστολογικοί τύποι και μοριακή διαγνωστική	11
1.4 Διαγνωστική προσέγγιση	15
1.5 Σταδιοποίηση της νόσου	17
1.6 Προγνωστικοί και προβλεπτικοί παράγοντες	18
1.7 Θεραπευτική προσέγγιση στο μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα	20
1.8 Θεραπευτική προσέγγιση στο μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα	24
1.9 Θέσεις μεταστατικών εστιών	25
1.10 Επιβίωση	27
<b>2. Κυτταρολογία ουροποιητικού συστήματος</b>	33
2.1 Ανατομία και ιστολογία	33
2.2 Κυτταρολογική εξέταση ούρων	33
<b>ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	37
<b>Σκοπός της μελέτης</b>	39
<b>Υλικά και Μέθοδοι</b>	41
<b>1. Ασθενείς</b>	41
1.1 Ομάδες ασθενών	41
1.2 Χαρακτηριστικά ασθενών και όγκου	41
<b>2. Μέθοδοι</b>	45
2.1 Κυτταρολογική εξέταση ούρων	45
2.2 Αιματολογικός και βιοχημικός έλεγχος ασθενών	45
2.3 Παθολογοανατομική εξέταση πρωτοπαθών όγκων (μελέτη χημειοκινών)	46
2.4 Απεικονιστικές και ενδοσκοπικές εξετάσεις	46
2.5 Πειραματική μελέτη	47
2.6 Πρωτόκολλο πειραματικής μελέτης	47
2.7 Στατιστική ανάλυση	48
<b>Αποτελέσματα</b>	
<b>3. Συχνότητα εμφάνισης του φαινομένου</b>	49
3.1 Συχνότητα εμφάνισης στους ασθενείς με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα	49
3.2 Συχνότητα εμφάνισης στους ασθενείς με μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα	51
3.3 Συχνότητα εμφάνισης στους ασθενείς της ομάδας ελέγχου	53
<b>4. Ανοσοϊστοχημική μελέτη</b>	53
4.1 Ανοσοϊστοχημική χρώση κυττάρων στα ούρα	53
4.2 Ανοσοϊστοχημική μελέτη χημειοκινών στους πρωτοπαθείς όγκους	55
<b>5. Πειραματική μελέτη</b>	57
5.1 Κυτταρολογική ούρων	57
5.2 Παθολογοανατομική μελέτη	60
<b>6. Συσχετίσεις με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους</b>	61
<b>7. Προγνωστική και προβλεπτική σημαντικότητα φαινομένου</b>	63

<b>ΚΡΙΤΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ</b>	65
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	71
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b>	73
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΣΤΑ ΑΓΓΛΙΚΑ</b>	77
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	79



## **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



## ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΚΑΙ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

### 1. Καρκίνος του πνεύμονα

#### 1.1 Επιδημιολογία, παράγοντες κινδύνου και ογκογένεση

Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι το πιο συχνό αίτιο θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως για άνδρες και γυναίκες, προκαλώντας περίπου 1.2 εκατομμύρια θανάτους το χρόνο [1]. Στις Η.Π.Α. υπολογίζεται ότι το 2010 διαγνώστηκαν 222.000 νέες περιπτώσεις καρκίνου πνεύμονα και υπήρξαν 157.000 θάνατοι από το ίδιο αίτιο [1]. Η συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του πνεύμονα έχει αυξηθεί δραματικά. Τη δεκαετία του 1950 ο καρκίνος του πνεύμονα ήταν η πρώτη αιτία θανάτου από καρκίνο στους άνδρες, ενώ το 1985 έγινε η πρώτη αιτία θανάτου από καρκίνο και στις γυναίκες. Οι θάνατοι από καρκίνο στους άνδρες έχουν αρχίσει να μειώνονται ταυτόχρονα με την ελάττωση του καπνίσματος [2]. Ο αριθμός των θανάτων από καρκίνο του πνεύμονα στις γυναίκες φαίνεται ότι έχει σταθεροποιηθεί, αν και οι μισοί θάνατοι από καρκίνο του πνεύμονα πλέον είναι σε γυναίκες [2, 3]. Τα επιδημιολογικά στοιχεία των πιο συχνών κακοηθειών στα δύο φύλα σε σχέση με το χρόνο συνοψίζονται στους πίνακες 1.1.1 και 1.1.2 .

Ένας μεγάλος αριθμός περιβαλλοντικών παραγόντων και συνηθειών έχουν ενοχοποιηθεί για την ανάπτυξη καρκίνου του πνεύμονα, εκ των οποίων το *κάπνισμα* είναι ο πιο σημαντικός, που ευθύνεται για το 90% των περιπτώσεων. Ο κίνδυνος ανάπτυξης καρκίνου του πνεύμονα σε έναν καπνιστή με 40 pack-years (1 πακέτο ημερησίως για 40 χρόνια) είναι 20 φορές μεγαλύτερος συγκριτικά με κάποιον που δεν κάπνισε ποτέ. Η πιθανότητα το κάπνισμα να σχετίζεται με την εμφάνιση καρκίνου του πνεύμονα περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Adler το 1912 [4]. Η πρώτη επιστημονική αναφορά συσχέτισης του καπνίσματος με το βρογχογενή καρκίνο έγινε το 1938 [5], αλλά η πρώτη ξεκάθαρη επιδημιολογική μελέτη συσχέτισης παρουσιάστηκε το 1950 από τους Doll και Hill [6, 7]. Μεγάλος αριθμός προοπτικών και αναδρομικών μελετών έχουν αποδείξει την αιτιολογική συνάφεια του καπνίσματος με τον καρκίνο του πνεύμονα. Μετά από 10 έτη διακοπής του καπνίσματος, ο κίνδυνος καρκινώματος του πνεύμονα μειώνεται κατά 30-50%. Έτσι, μετά από 15 χρόνια διακοπής, ένας καπνιστής έχει διπλάσιο κίνδυνο να αναπτύξει καρκίνο του πνεύμονα συγκριτικά με κάποιον που δεν κάπνισε ποτέ [8, 9]. Άτομα τα οποία εκτίθενται σε *παθητικό κάπνισμα* στο εργασιακό ή οικογενειακό περιβάλλον έχουν επίσης αυξημένο κίνδυνο της νόσου σε σχέση με τους μη εκτιθέμενους.

Η συμβολή του παθητικού καπνίσματος στην ανάπτυξη καρκινώματος πνεύμονα θεωρείται καλά τεκμηριωμένη και υπεύθυνη για 300.000 περίπου θανάτους το χρόνο [10]. Άλλοι παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη της νόσου είναι η *χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια* και η έκθεση σε ραδόνιο, ακτινοβολία, νικέλιο, πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες, αμίαντο, χρωμιούχα, αρσενικό, χλωρομεθυλικούς αιθέρες και βενζοπυρένιο. *Επαγγελματική έκθεση* στους παραπάνω παράγοντες έχει αποδειχθεί ότι συνδέεται με ανάπτυξη καρκινώματος πνεύμονα. Όταν η έκθεση στους παραπάνω παράγοντες γίνεται σε κλειστούς εργασιακούς χώρους ο κίνδυνος για τη νόσο αυξάνει σημαντικά. Καπνιστές με επαγγελματική έκθεση σε αμίαντο έχουν εκθετικά αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου [11]. Η παρατεταμένη έκθεση σε μολυσμένη ατμόσφαιρα ή *προηγούμενες πνευμονικές νόσοι* που δημιουργούν ουλές στο παρέγχυμα, αποτελούν παράγοντες αυξημένου κινδύνου για ανάπτυξη της νόσου.

Δεδομένου ότι το 10-20% των καπνιστών αναπτύσσουν καρκίνωμα του πνεύμονα, γενετικοί παράγοντες έχουν επίσης ενοχοποιηθεί καθώς φαίνεται ότι μπορεί να υπάρχει και *κληρονομική προδιάθεση*. Στον καρκίνο του πνεύμονα έχουν περιγραφεί πολλές μοριακές γενετικές αλλαγές, όπως χρωμοσωμικές ανωμαλίες στα χρωμοσώματα 3p, 8p, 9p, 11p, 15p, and 17p [12-16], υπερέκφραση και μεταλλάξεις των ογκογονιδίων Ras, EGFR, Her-2, c-Met, Bcl-2, EML4-ALK [17-35], μεταλλάξεις σε ογκοκατασταλτικά γονίδια όπως το p53 [36-40], το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος (Rb gene) [41-43] και τα P16INK4A και p15INK4B [44, 45]. Παρά το γεγονός ότι τα δεδομένα που συνδέουν τις παραπάνω γενετικές μεταβολές με την εκδήλωση του καρκίνου του πνεύμονα είναι πολύ ισχυρά, δεν έχουν τεκμηριωθεί οικογενή σύνδρομα ή επικρατούσα χρωμοσωμική διαταραχή ή χαρακτηριστική γονιδιακή βλάβη που να προδιαθέτουν για καρκίνωμα πνεύμονα [46]. Πιθανολογείται ότι για την ανάπτυξη και την εξέλιξη της νόσου είναι απαραίτητες πολλές χρωμοσωμικές βλάβες και απώλειες ή αυξήσεις κανονιστικών γονιδίων. Είναι σαφές ότι οι γενετικές αλλαγές που αναφέρθηκαν είναι πιο συχνές στους καπνιστές από τους μη καπνιστές και ότι οι χρωμοσωμικές διαταραχές παραμένουν σε πρώην καπνιστές γεγονός που δικαιολογεί τη διατήρηση της πιθανότητας ανάπτυξης καρκίνου του πνεύμονα σε αυτό τον πληθυσμό [46]. Οι προκαρκινικές μη διηθητικές βλάβες, που έχουν ταυτοποιηθεί και μπορούν να οδηγήσουν στους διάφορους ιστολογικούς υπότυπους του μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα είναι:

- Η επιθηλιακή δυσπλασία/ καρκίνωμα in situ
- Άτυπη αδενωματώδης υπερπλασία
- Διάχυτη ιδιοπαθής πνευμονική νευροενδοκρινική νεοπλασία

Στα πλακώδη καρκινώματα του πνεύμονα προηγούνται διαταραχές ανάλογες εκείνων του πλακώδους καρκινώματος κεφαλής-τραχήλου, ενώ στο αδenoκαρκίνωμα η πιθανότερη προκαρκινική αλλοίωση είναι η άτυπη αδενωματώδης υπερπλασία. Για τα μικροκυτταρικά καρκινώματα θεωρείται ότι δεν υπάρχουν προκαρκινικές αλλοιώσεις και ότι αναπτύσσονται απευθείας από το βρογχικό επιθήλιο [11, 47]. Στα μη-μικροκυτταρικά καρκινώματα, πιθανολογείται ότι ο χρόνιος ερεθισμός του φυσιολογικού βρογχικού επιθηλίου από καρκινογόνα οδηγεί σε γενετικές και κυτταρικές βλάβες. Μεταλλάξεις στα ογκοκατασταλτικά γονίδια p53 και Rb και επαγωγή ογκογονιδίων όπως το k-ras, το c-myc και το c-raf οδηγούν στην παραγωγή τροφικών-αυξητικών παραγόντων, οι οποίοι αποτελούν τη μοριακή βάση της νόσου. Η εξέλιξη της αρχικής βρογχικής βλάβης σε διηθητικό καρκίνωμα ακολουθεί τα εξής στάδια [11]:

- Υπερπλασία
- Μεταπλασία
- Δυσπλασία
- In situ Καρκίνωμα
- Διηθητικό Καρκίνωμα

Η ανάπτυξη διηθητικού καρκινώματος συνοδεύεται από επαγωγή της αγγειογένεσης και της μεταναστευτικής ικανότητας των νεοπλασματικών κυττάρων.

Ο υποδοχέας EGFR (epidermal growth factor receptor) ή HER-1 ή c-erbB-1 ανήκει στην οικογένεια των HER (human epidermal receptor) υποδοχέων και παίζει ιδιαίτερο ρόλο στην ανάπτυξη και την εξέλιξη του μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα. Είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη 170 kDa με ένα εξωκυττάριο τμήμα και ένα ενδοκυττάριο με δράση τυροσινικής κινάσης που εμπλέκεται στη μεταγωγή του κυτταρικού σήματος. Αρκετά κακοήθη νεοπλάσματα στον άνθρωπο (πνεύμονα, κεφαλής-τραχήλου, μαστού, ωοθηκών) συνοδεύονται από υπερέκφραση ή μεταλλάξεις του EGFR:

- Υπερέκφραση του EGFR στον μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα έχει συσχετιστεί με προχωρημένη νόσο και πτωχή πρόγνωση σε πολλές μελέτες [27, 48, 49].
- Μεταλλάξεις του EGFR παρατηρούνται στο 10-15% περίπου των αδενοκαρκινωμάτων, στο 30-40% των βρογχοκυψελιδικών αλλά σπανίως σε πλακώδη καρκινώματα του πνεύμονα. Είναι συχνότερες σε ασθενείς με αδενοκαρκινώματα, μη καπνιστές, γυναίκες και ασιατικής καταγωγής. Μεταλλάξεις στο εξόνιο 19 και στο εξόνιο 21 (L858R) είναι ο καλύτερος προβλεπτικός δείκτης ανταπόκρισης στους αναστολείς τυροσινικής κινάσης erlotinib και gefitinib [50-52]. Οι μεταλλάξεις στον EGFR αποκλείουν μετάλλαξη στο k-ras. Μεταλλάξεις στο k-ras παρατηρούνται στο 25% των αδενοκαρκινωμάτων και σχετίζονται με πτωχή πρόγνωση και αντίσταση στη δράση αναστολέων της τυροσινικής κινάσης [53].

## 1.2 Πρόληψη και screening

Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι μια μοναδική νόσος με την έννοια ότι, όπως αναφέρθηκε, έχει βρεθεί ο απόλυτος αιτιολογικός παράγοντας γένεσης της νόσου. Το ενεργητικό και το παθητικό κάπνισμα ευθύνονται συνολικά για το 80-85% των περιστατικών καρκίνου του πνεύμονα και ενοχοποιούνται για μια ακόμα σειρά καρκίνων όπως τον καρκίνο κεφαλής-τραχήλου και τραχήλου της μήτρας. Τα περιστατικά αυτά μπορούν να αποφευχθούν με την πρωτογενή πρόληψη (διακοπή του καπνίσματος). Τα προγράμματα διακοπής του καπνίσματος που χρησιμοποιούν φάρμακα σε συνδυασμό με ψυχολογική υποστήριξη από ειδικούς μπορεί να οδηγήσουν σε διακοπή του καπνίσματος το 10-20% των καπνιστών κατ' έτος [54]. Η καθυστερημένη διάγνωση αποτελεί σημαντικό εμπόδιο στην προσπάθεια για αύξηση των ποσοστών επιβίωσης στον καρκίνο του πνεύμονα [55, 56] και με δεδομένο ότι ο κίνδυνος της νόσου παραμένει πολύ υψηλός και για τους πρώην καπνιστές πολλά χρόνια μετά τη διακοπή, έχουν αναπτυχθεί στρατηγικές δευτερογενούς πρόληψης της νόσου μέσω προγραμμάτων screening. Το ζητούμενο σε κάθε περίπτωση είναι η διάγνωση σε όσο το δυνατόν πιο πρώιμο στάδιο ώστε να είναι δυνατή η ριζική χειρουργική παρέμβαση. Πιλοτικές μελέτες με τη χρήση ελικοειδούς (spiral) αξονικής θώρακος άπαξ ετησίως είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικές καθώς το 80% των καρκινωμάτων που ανιχνεύονται είναι σταδίου I [57-59]. Η μελέτη της I-ELCAP (International Early Lung Cancer Action Program) έδειξε ποσοστά δεκαετούς

επιβίωσης σε ασθενείς σταδίου I, που χειρουργήθηκαν, άνω του 90%. Εντούτοις, μελέτες παρατήρησης δεν κατέδειξαν αύξηση της επιβίωσης των ασθενών με καρκίνωμα του πνεύμονα, πιθανώς λόγω υπερδιάγνωσης και αυξημένου χρόνου παρατήρησης των ασθενών που σχετίζεται με τη χρονικά νωρίτερη διάγνωση της νόσου.

### **1.3 Ιστολογικοί τύποι και μοριακή διαγνωστική**

Περίπου το 95% όλων των καρκινωμάτων του πνεύμονα ανήκουν σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τα μη μικροκυτταρικά (Non small cell lung cancer, NSCLC) και τα μικροκυτταρικά (Small cell lung cancer, SCLC). Η διάκριση αυτή είναι απαραίτητη για την περαιτέρω σταδιοποίηση, τη θεραπεία και τον καθορισμό της πρόγνωσης της νόσου. Οι υπόλοιποι ιστολογικοί τύποι αποτελούν το 5% των κακοηθειών του πνεύμονα. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (World Health Organization, WHO) αναγνωρίζει 4 μεγάλους ιστολογικούς τύπους στον καρκίνο του πνεύμονα με τις ακόλουθες συχνότητες [60] :

- Αδενοκαρκίνωμα ( περιλαμβάνεται το βρογχοκυψελιδικό) ~ 38%
- Πλακώδες καρκίνωμα ~20%
- Μεγαλοκυτταρικό ~5%
- Μικροκυτταρικό ~13%
- Άλλα μη μικροκυτταρικά που δε μπορούν να κατηγοριοποιηθούν περαιτέρω ~18%
- Άλλα ~6%

Η σχετική συχνότητα εμφάνισης του αδενοκαρκινώματος έχει αυξηθεί δραματικά τα τελευταία χρόνια με αντίστοιχη μείωση της συχνότητας εμφάνισης των άλλων υπότυπων NSCLC και των SCLC. Η κατηγοριοποίηση του 2004 από τη WHO για τα καρκινώματα του πνεύμονα φαίνεται στον πίνακα 1.3.

#### ***Αδενοκαρκινώμα***

Το αδενοκαρκίνωμα είναι ο συχνότερος ιστολογικός τύπος καρκίνου του πνεύμονα και ο συχνότερος τύπος σε γυναίκες καθώς και σε μη καπνιστές και των δύο φύλων. Η εντόπιση

των αδενοκαρκινωμάτων είναι, κατά κύριο ρόλο, περιφερική στο 75% περίπου των περιπτώσεων. Παρουσιάζουν αδενική διαφοροποίηση ή παραγωγή βλέννης με κυψελιδικό, θηλώδες, βρογχοκυψελιδικό πρότυπο ανάπτυξης. Το πρότυπο ανάπτυξης μπορεί επίσης να είναι συμπαγές με παραγωγή βλέννης ή συνδυασμός των παραπάνω προτύπων. Μακροσκοπικά εμφανίζονται (σύνηθες πρότυπο ανάπτυξης) ως διάχυτη αλλοίωση τύπου πνευμονίας, ως αμφοτερόπλευρη διάχυτη πνευμονική νόσος, ως διήθηση και εκτεταμένη διασπορά κατά μήκος του σπλαχνικού υπεζωκότα ή σε έδαφος υποκείμενης ίνωσης [61]. Τα αδενοκαρκινώματα *μικτού υπότυπου* είναι ο συχνότερος υπότυπος, όπου παρατηρείται συνδυασμός διαφόρων ιστολογικών υποτύπων με διαφορετικούς βαθμούς διαφοροποίησης και κυτταρολογικής ατυπίας. Προγνωστικά δεν φαίνεται να αποτελεί μια ξεχωριστή οντότητα συγκριτικά με τα αμιγή αδενοκαρκινώματα [62]. Οι κύριοι αμιγείς ιστολογικοί τύποι του αδενοκαρκινώματος είναι ο *κυψελιδικός* υπότυπος, ο *θηλώδης* υπότυπος, το *συμπαγές αδενοκαρκίνωμα με βλέννη* και το *βρογχοκυψελιδικό* καρκίνωμα. Το βρογχοκυψελιδικό καρκίνωμα εμφανίζει ανάπτυξη νεοπλασματικών κυττάρων κατά μήκος των κυψελίδων, χωρίς στοιχεία διήθησης του στρώματος, των αγγείων ή του υπεζωκότα [63] και περιλαμβάνει τη βλεννώδη και τη μη-βλεννώδη ποικιλία. Είναι συνήθως εντοπισμένο περιφερικά ως μονήρης βλάβη αλλά μπορεί να εμφανιστεί ως πολυεστιακό ή διάχυτο. Τα βλεννώδη βρογχοκυψελιδικά θεωρούνται χαμηλού βαθμού κακοήθειας. Ανοσοϊστοχημικά στα αδενοκαρκινώματα εκφράζονται οι βασικοί επιθηλιακοί δείκτες (EMA, CEA, CAM5.2, AEI/AE3) ενώ η κερατίνη 7 (CK7) εκφράζεται πιο συχνά από την κυτοκερατίνη 20 (CK20). Ο θυρεοειδικός μεταγραφικός παράγοντας (TTF1) εκφράζεται συνήθως, με εξαίρεση τα βλεννώδη βρογχοκυψελιδικά τα οποία συνήθως δεν εκφράζουν TTF1 αλλά μπορεί να εκφράζουν CK7 και CK20 [63].

### ***Πλακώδες Καρκίνωμα***

Το πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα ήταν ο πιο συχνός ιστολογικός τύπος καρκίνου του πνεύμονα μέχρι τα μισά περίπου της δεκαετίας του 1980. Έχει κεντρική εντόπιση στο 60-80% των περιπτώσεων αλλά μπορεί να εμφανιστεί και περιφερικά ή επί εδάφους βλάβης από βρογχεκτασία του πνεύμονα. Στο 5% των πλακωδών καρκινωμάτων παρατηρείται και κεντρική νέκρωση που μπορεί να οδηγήσει σε εικόνα σπηλαιοποίησης του πνεύμονα. Το πλακώδες καρκίνωμα εμφανίζει κερατινοποίηση, ή σχηματισμούς πέρλας κερατίνης και μεσοκυττάρων γεφυρών. Ανοσοϊστοχημικά, στα πλακώδη καρκινώματα του πνεύμονα



εκφράζεται η κερατίνη υψηλού μοριακού βάρους (34βE12), οι κυτοκερατίνες 5/6 και η πρωτεΐνη του γονιδίου p63. Η πρόγνωση του πλακώδους καρκινώματος φαίνεται να είναι καλύτερη από του αδενοκαρκινώματος για το ίδιο στάδιο νόσου [64].

### ***Μεγαλοκυτταρικό Καρκίνωμα***

Το μεγαλοκυτταρικό καρκίνωμα είναι ένα επιθηλιακό κακόηθες νεόπλασμα το οποίο δεν εμφανίζει κυτταρολογικούς και αρχιτεκτονικούς χαρακτήρες μικροκυτταρικού καρκινώματος και αδενική ή πλακώδη διαφοροποίηση. Ένας συνδυασμός μικροσκόπησης και ανοσοϊστοχημείας μπορεί να δείξει στοιχεία αδενικής, πλακώδους ή και νευροενδοκρινούς διαφοροποίησης χωρίς τα στοιχεία αυτά να έχουν περαιτέρω προγνωστική αξία [65, 66]. Αρκετοί υπότυποι του μεγαλοκυτταρικού καρκινώματος αναγνωρίζονται, συμπεριλαμβανομένου του νευροενδοκρινικού, του βασικοειδούς και του τύπου λεμφοεπιθηλιώματος. Ιστοπαθολογικά είναι φτωχά διαφοροποιημένοι όγκοι και η διάγνωση γίνεται αφού αποκλειστεί η παρουσία στοιχείων αδενοκαρκινώματος, πλακώδους καρκινώματος ή μικροκυτταρικού καρκινώματος. Τα μεγαλοκυτταρικά καρκινώματα συνήθως εμφανίζονται ως μεγάλες περιφερικές μάζες με εμφανή νέκρωση. Η βιολογική τους συμπεριφορά είναι ανάλογη των άλλων χαμηλής διαφοροποίησης μη-μικροκυτταρικών καρκινωμάτων.

### ***Μικροκυτταρικό Καρκίνωμα***

Τα μικροκυτταρικά καρκινώματα αντιπροσωπεύουν το 20-25% περίπου όλων των βρογχογενών καρκινωμάτων. Υπάρχει πολύ στενή συσχέτιση με το κάπνισμα και είναι πάρα πολύ σπάνιο σε μη καπνιστές. Ξεχωρίζουν από τα μη μικροκυτταρικά από τον ταχύτατο χρόνο διπλασιασμού, την αυξημένη μιτωτική δραστηριότητα και τη γρήγορη ανάπτυξη απομακρυσμένων μεταστάσεων. Αν και είναι αρκετά χημειοευαίσθητα και ακτινοευαίσθητα, τα μικροκυτταρικά καθίστανται ανθεκτικά σε κάθε θεραπεία εντός ενός ή δύο ετών από τη διάγνωση. Με βάση την πιο πρόσφατη κατηγοριοποίηση [67] της WHO και της IASLC ( International Association for the Study of Lung Cancer) τα μικροκυτταρικά καρκινώματα διακρίνονται σε:

- Αμιγή μικροκυτταρικά καρκινώματα
- Μεγαλοκυτταρικά νευροενδοκρινικά καρκινώματα
- Μικτά ( αποτελούμενα κυρίως από SCLC και στοιχεία NSCLC)

Η διάγνωση του μικροκυτταρικού καρκινώματος γίνεται μορφολογικά στο μικροσκόπιο. Τα κακοήθη κύτταρα είναι μικρά με «μπλε» χρώμα και με διπλάσιο περίπου μέγεθος από τα λεμφοκύτταρα. Το κυτταρόπλασμα είναι αραιό με ομαλή κατανομή της χρωματίνης στο πυρήνα και χωρίς την παρουσία πυρηνίων. Ο μιτωτικός δείκτης είναι υψηλός και η παρουσία εστιακής νέκρωσης συχνή. Η πρόγνωση των μικτών υπότυπων (μικρο και μεγαλοκυτταρικών ή μικρο και μη μικροκυτταρικών) συγκριτικά με τα αμιγή μικροκυτταρικά, δεν είναι ξεκάθαρη. Οι μικτοί υπότυποι περιγράφονται αλλού ως έχοντες χειρότερη [68-70], καλύτερη [71-73] ή ίδια πρόγνωση [74, 75] με τα αμιγή μικροκυτταρικά.

### ***Σαρκωματοειδές Καρκίνωμα***

Τα σαρκωματοειδή καρκινώματα του πνεύμονα αποτελούν μια ετερογενή ομάδα μη-μικροκυτταρικών καρκινωμάτων που περιέχουν στοιχεία σαρκώματος ή σαρκωματομορφα στοιχεία. Διακρίνονται σε:

- Πλειόμορφα καρκινώματα
- Ατρακτοκυτταρικά καρκινώματα
- Γιγαντοκυτταρικά καρκινώματα
- Καρκινοσαρκώματα
- Βλαστώματα

### ***Μη μικροκυτταρικοί νευροενδοκρινείς όγκοι***

Οι όγκοι αυτοί έχουν χαρακτηριστικά μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά, συμπεριλαμβανομένων:

- Παρουσία κυτοπλασματικών νευροενδοκρινών οζιδίων
- Τη δυνατότητα σύνθεσης νευροπεπτιδίων

Οι όγκοι αυτοί αποτέλεσαν αντικείμενο έντονης διαμάχης ως προς τη κατηγοριοποίηση τους. Η τελευταία κατηγοριοποίηση κατά WHO το 2004 θεωρεί ότι οι νευροενδοκρινείς όγκοι καταλαμβάνουν ένα φάσμα που εκτείνεται από τη διάχυτη ιδιοπαθή πνευμονική

νευροενδοκρινική υπερπλασία και φτάνει μέχρι το μικροκυτταρικό και το μεγαλοκυτταρικό νευροενδοκρινικό καρκίνωμα [60]. Μέσα στο πλαίσιο αυτό τα τυπικά και τα άτυπα καρκινοειδή θεωρούνται χαμηλής και μέτριας κακοήθειας νευροενδοκρινικοί όγκοι.

#### 1.4 Διαγνωστική προσέγγιση

Η λήψη ενός καλού ατομικού ιστορικού και η λεπτομερής φυσική εξέταση αποτελούν τη βάση για τη διάγνωση του βρογχογενούς καρκίνου. Σκοπός είναι η αναγνώριση συμπτωμάτων και σημείων δηλωτικών τοπικά εκτεταμένης ή μεταστατικής νόσου και η εκτίμηση της συνολικής κατάστασης υγείας του ασθενούς. Η ύπαρξη συννοσηρότητας μπορεί να επηρεάσει τόσο τη διαγνωστική προσέγγιση όσο και το θεραπευτικό χειρισμό του ασθενούς [76, 77]. Τα περισσότερα συμπτώματα και σημεία είναι συνήθως μη ειδικά ( βήχας, αιμόπτυση κ.α.) αλλά κάποια από αυτά μπορεί να υποδηλώνουν και εκτεταμένη νόσο. Τέτοια μπορεί να είναι:

- Συστηματικά συμπτώματα όπως απώλεια βάρους, ανορεξία, καταβολή ή κατάθλιψη
- Εντοπισμένο οστικό άλγος επί οστικών μεταστάσεων
- Δυσφαγία σε εκτεταμένη νόσο στο μεσοθωράκιο
- Συμπτώματα από το κεντρικό νευρικό σύστημα ( πχ κεφαλαλγία, αδυναμία, μείωση ανώτερων νοητικών λειτουργιών)
- Σύνδρομο Horner
- Βράγχος φωνής
- Σύνδρομο άνω κοίλης φλέβας
- Καρδιακός επιπωματισμός
- Λεμφαδενοπάθεια (υπερκλείδιοι ή σκαληνοί)
- Ψηλαφητό ήπαρ

Παρανεοπλασματικά σύνδρομα μπορεί να εμφανιστούν τόσο στο μικροκυτταρικό όσο και στο μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα. Η παρουσία των συνδρόμων αυτών δεν υποδηλώνει μεταστατική νόσο κατ' ανάγκη και δε θα πρέπει να επηρεάζει τις

θεραπευτικές αποφάσεις. Τα κυριότερα παρανεοπλασματικά σύνδρομα φαίνονται στον πίνακα 1.4.

Όλοι οι ασθενείς θα πρέπει να υποβάλλονται σε πλήρη *εργαστηριακό και απεικονιστικό έλεγχο*. Γενική εξέταση αίματος και πλήρης βιοχημικός έλεγχος πρέπει να προηγούνται των απεικονιστικών καθώς μπορούν να κατευθύνουν τον περαιτέρω έλεγχο. Για παράδειγμα, η αύξηση των ηπατικών ενζύμων ή της αλκαλικής φωσφατάσης μπορούν να κατευθύνουν προς διερεύνηση πιθανών ηπατικών μεταστάσεων κατά προτεραιότητα. Οι καρκινικοί δείκτες του ορού μπορεί να έχουν προγνωστική σημασία σε ορισμένες περιπτώσεις αλλά γενικά η αξία τους στον καρκίνο του πνεύμονα είναι περιορισμένη και δεν συνιστάται η χρήση τους ως εξετάσεις ρουτίνας. Όλοι οι ασθενείς για τους οποίους υπάρχει υποψία ύπαρξης βρογχογενούς καρκίνου θα πρέπει να υποβάλλονται σε αξονική τομογραφία (ΑΤ) θώρακος και κοιλίας με λήψη σκιαγραφικού. Η σταδιοποίηση με βάση το TNM σύστημα, που θα περιγραφεί παρακάτω, γίνεται με χρήση των αποτελεσμάτων της ΑΤ αφού η εξέταση:

- Μπορεί να διακρίνει τον πρωτοπαθή όγκο και να περιγράψει την ανατομική του σχέση με το θωρακικό τοίχωμα και τις παρακείμενες δομές.
- Μπορεί να διακρίνει τους μεσοθωρακικούς λεμφαδένες που είναι διογκωμένοι και ύποπτοι για μεταστατική διήθηση.
- Μπορεί να διακρίνει την απομακρυσμένη νόσο.

Πολλοί ασθενείς χρειάζονται περαιτέρω απεικονιστικό έλεγχο για εκτίμηση της έκτασης της νόσου τους. Ο έλεγχος αυτός μπορεί να γίνει με ολοσωματικό PET/CT (positron emission tomography), με μαγνητική τομογραφία (MRI) και πιθανώς σπινθηρογράφημα οστών. Κάθε ύποπτο εύρημα σε οποιονδήποτε απεικονιστικό έλεγχο θα πρέπει να επιβεβαιώνεται με *λήψη ιστού* πριν χαρακτηριστεί ως νόσος. Θα πρέπει να τονιστεί ότι η βιοψία της πρωτοπαθούς εστίας είναι μόνο διαγνωστική ενώ η βιοψία πιθανών μεταστατικών εστιών (π.χ. διογκωμένοι λεμφαδένες, πλευριτικές συλλογές) εκτός από διαγνωστική μπορεί να βοηθήσει και στη σταδιοποίηση της νόσου. Γενικά, θα πρέπει να επιδιώκεται η βιοψία εκείνης της βλάβης που, πιθανή θετικότητα της, θα σταδιοποιήσει υψηλότερα τη νόσο. Πολύ συχνά χρειάζεται λήψη ιστού ή κυττάρων και από την πρωτοπαθή και από την πιθανή μεταστατική εστία. Η λήψη υλικού μπορεί να γίνει με:

- Διαδερμική (ακτινολογικά) κατευθυνόμενη βιοψία ή αναρρόφηση δια βελόνης
- Βιοψία με ενδοβρογχικό υπέρηχο (EBUS-guided biopsy)
- Βιοψία ή αναρρόφηση με συμβατική βρογχοσκόπηση (TBNA)

Η EBUS-guided βιοψία φαίνεται να υπερέχει της απλής βιοψίας υπό βρογχοσκόπηση ιδίως για μικρότερες βλάβες [78], ενώ η διαδερμικά κατευθυνόμενη βιοψία φαίνεται ότι έχει τη μεγαλύτερη διαγνωστική ακρίβεια όταν εκτελείται από εκπαιδευμένο ιατρικό προσωπικό. Για ασθενείς με σημαντική συννοσηρότητα η κυτταρολογική των πτυέλων μπορεί βοηθήσει στη διάγνωση, ιδίως για όγκους κεντρικής εντόπισης. Η *θωρακοσκόπηση* πρέπει να χρησιμοποιείται για επιβεβαίωση της πιθανής μεταστατικής διήθησης των λεμφαδένων του μεσοθωρακίου στο μη-μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα, όταν υπάρχουν ύποπτα ευρήματα στον απεικονιστικό έλεγχο (αξονική τομογραφία ή/και PET CT) καθώς μπορεί να αυξήσει την ακρίβεια της προεγχειρητικής σταδιοποίησης [79]. Το ίδιο ισχύει και στην περίπτωση των πλευριτικών συλλογών που είναι παρούσες κατά τη διάγνωση στο 1/3 περίπου των ασθενών με μη-μικροκυτταρικό καρκίνωμα [80]. Θετική κυτταρολογική πλευριτικού υγρού επηρεάζει τη σταδιοποίηση (στάδιο IV) και αλλάζει το θεραπευτικό πλάνο και την πρόγνωση. Ποσότητα 50-100 ml πλευριτικού υγρού συνήθως επαρκεί για την επιβεβαίωση ύπαρξης κακοήθειας στο 65% ύποπτων πλευριτικών συλλογών [80]. Δεύτερη παρακέντηση θα πρέπει να πραγματοποιείται όταν η πρώτη είναι αρνητική. Υπολογίζεται ότι 30% των δεύτερων παρακεντήσεων είναι θετικές όταν τα αποτελέσματα των πρώτων ήταν ψευδώς αρνητικά [81]. Σε περίπτωση και δεύτερης αρνητικής κυτταρολογικής πρέπει να εκτελείται θωρακοσκόπηση [82-84].

### 1.5 Σταδιοποίηση της νόσου

Με το πέρας των εργαστηριακών και απεικονιστικών εξετάσεων καθώς και της λήψης βιοψιών υπάρχουν συνήθως όλα τα στοιχεία που χρειάζονται για τη σταδιοποίηση της νόσου. Η σταδιοποίηση βασίζεται στο TNM σύστημα ( από τα αρχικά των λέξεων Tumor, Node, Metastasis), το οποίο στηρίζεται:

1. Στα χαρακτηριστικά του πρωτοπαθούς όγκου (T) και εκτιμάται με αριθμητική κλίμακα από το 1 μέχρι το 4, ανάλογα με το μέγεθος και τη διήθηση παρακείμενων δομών.

2. Το γράμμα **N** αφορά τους λεμφαδένες όπου η ταξινόμηση γίνεται αριθμητικά από 1 ως 3.
3. Το γράμμα **M** αφορά την ύπαρξη ή όχι μεταστάσεων. **M0** όταν δεν υπάρχουν και **M1** επί παρουσίας μεταστάσεων.

Η έβδομη έκδοση του συστήματος TNM, που είναι η νεότερη έκδοση και τέθηκε σε ισχύ από τον Ιανουάριο του 2010 φαίνεται στους πίνακες 1.5.1 και 1.5.2. Στον καρκίνο του πνεύμονα το TNM σύστημα χρησιμοποιείται πρακτικά για τη σταδιοποίηση του μη-μικροκυτταρικού και σπανίως για τον μικροκυτταρικό, παρά το γεγονός ότι είναι πιο περιγραφικό συγκριτικά με το σύστημα VALSG (Veterans' Affairs Lung Study Group) που χρησιμοποιείται ευρέως στον τελευταίο. Το TNM μπορεί να είναι χρήσιμο στο μικροκυτταρικό μόνο για τους ασθενείς σταδίου I (δυσνητικά χειρουργήσιμοι) αλλά αυτοί αποτελούν μόνο το 10% των ασθενών. Το VALSG σύστημα διακρίνει τη νόσο σε δύο στάδια:

- *Περιορισμένη* νόσος που περιορίζεται στο ημιθώρακιο, μεσοθώρακιο ή/και υπερκλείδιους λεμφαδένες και μπορεί να περιληφθεί σε ένα πεδίο ακτινοβολήσης (αντιστοιχεί περίπου στα στάδια I-IIIb του μη μικροκυτταρικού)
- *Εκτεταμένη* νόσος όταν δεν μπορεί να περιληφθεί σε ένα πεδίο ακτινοβολήσης

Πρέπει να τονιστεί ότι το 60-70% των ασθενών με μικροκυτταρικό καρκίνο έχουν εκτεταμένη νόσο κατά τη διάγνωση και το 30-40% περιορισμένη. Η διάκριση είναι πολύ σημαντική γιατί οι ασθενείς με περιορισμένη νόσο λαμβάνουν χημειοθεραπεία και ακτινοθεραπεία σε αντίθεση με αυτούς που έχουν εκτεταμένη που λαμβάνουν μόνο χημειοθεραπεία.

## **1.6 Προγνωστικοί και προβλεπτικοί παράγοντες**

Το στάδιο της νόσου κατά TNM στους ασθενείς με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα παίζει το σημαντικότερο ρόλο για την πρόγνωση. Εκτός από το στάδιο της νόσου κατά τη διάγνωση και άλλοι κλινικοπαθολογικοί-μοριακοί παράγοντες βρέθηκαν να παίζουν προγνωστικό και προβλεπτικό ρόλο. Παράγοντες με προγνωστικό ρόλο είναι εκείνοι που είναι ενδεικτικοί της επιβίωσης ανεξάρτητα της θεραπείας που θα δοθεί ενώ

προβλεπτικοί είναι εκείνοι που προβλέπουν ανταπόκριση ή όχι στη θεραπεία. Τέτοιοι παράγοντες βρέθηκαν κυρίως κατά τη διάρκεια μελέτης ασθενών με προχωρημένη ή μεταστατική νόσο (στάδια III και IV) και είναι:

- Η κακή κατάσταση ικανότητας (performance status, PS) και η απώλεια βάρους ή η μειωμένη όρεξη που έχουν συσχετιστεί με μειωμένη επιβίωση [85-89]
- Η πτωχή διαφοροποίηση των όγκων και η διήθηση των λεμφαγγείων που σχετίζονται με πτωχότερη πρόγνωση [90-95]
- Το υψηλό SUV (standardized uptake value) στο PET CT που φαίνεται να σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση [96, 97].
- Η παρουσία μεταλλάξεων του EGFR (απώλεια στο εξόνιο 19 και η μετάλλαξη L858R στο εξόνιο 21) που είναι προβλεπτικές για ανταπόκριση στη θεραπεία από αναστολείς τυροσινικής κινάσης (erlotinib ή gefitinib) [98, 99]
- Υψηλά επίπεδα ERCC1 (endonuclease of the nucleotide excision repair complex) στον όγκο που σχετίζονται με καλύτερη επιβίωση συγκρινόμενα με χαμηλά επίπεδα ERCC1. Υψηλά επίπεδα του ERCC1 σχετίζονται επίσης και με μικρή ανταπόκριση σε θεραπεία με πλατινούχα χημειοθεραπευτικά [100-102]
- Οι μεταλλάξεις του k-ras που σχετίζονται με χειρότερη πρόγνωση και προβλέπουν έλλειψη οφέλους από χημειοθεραπεία με πλατίνα/βινορελμπίνη ή θεραπεία με αναστολείς των τυροσινικών κινασών [18, 98, 103]
- Υψηλά επίπεδα RRM1 (regulatory subunit of ribonucleotide reductase) στον όγκο που σχετίζονται με καλύτερη επιβίωση συγκριτικά με χαμηλά επίπεδα RRM1. Υψηλά επίπεδα RRM1 σχετίζονται επίσης με μικρή ανταπόκριση σε θεραπεία με γεμισιταμπίνη [102, 104-106]
- Λευκοκυττάρωση, υπερασβεστιαμία

Όσον αφορά το μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα, ο κύριος προγνωστικός παράγοντας είναι το στάδιο της νόσου κατά τη διάγνωση. Για τους ασθενείς με περιορισμένη νόσο, η μέση επιβίωση βρίσκεται μεταξύ των 15 και 20 μηνών και η πενταετής επιβίωση περίπου 10-15%. Αντίθετα, η μέση επιβίωση ασθενών με εκτεταμένη νόσο είναι μεταξύ οκτώ και 13 μηνών με την πενταετή επιβίωση μόλις στο 1-2%.

### 1.7 Θεραπευτική προσέγγιση στο μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα

Χειρουργείο, ακτινοθεραπεία και χημειοθεραπεία είναι οι τρεις θεραπευτικοί χειρισμοί που χρησιμοποιούνται (ξεχωριστά ή σε συνδυασμό ανάλογα με το στάδιο της νόσου) στο μη- μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα.

#### *Χειρουργική επέμβαση*

Για ασθενείς με νόσο σταδίου I και II, το χειρουργείο προσφέρει τις περισσότερες πιθανότητες για ίαση της νόσου. Η αντιμετώπιση θα πρέπει να γίνεται από εξειδικευμένες ομάδες θωρακοχειρουργών μετά από συζήτηση του περιστατικού σε ογκολογικό συμβούλιο. Ασθενείς με στάδιο νόσου IB και πάνω θα πρέπει να παραπέμπονται σε παθολόγο ογκολόγο για περαιτέρω αντιμετώπιση. Η sleeve «δίκην μανικίου» λοβεκτομή είναι η προτιμώμενη μέθοδος, αλλά εφόσον δεν είναι τεχνικά εφικτή πρέπει να διενεργείται λοβεκτομή ή πνευμονεκτομή. Μικρότερες εκτομές (σφηνοειδής εκτομή ή τμηματεκτομή) εφαρμόζονται αν δεν υπάρχουν αναπνευστικές εφεδρείες ή σε υπερήλικες ασθενείς όταν ο όγκος έχει κάποιο από τα ακόλουθα χαρακτηριστικά: περιφερικός και  $\leq 2$ εκ με χαρακτηριστικά αμιγούς βρογχοκυψελιδικού ή χρόνο διπλασιασμού  $\geq 400$  ημέρες [107, 108]. Για τις επεμβάσεις αυτές μπορεί να χρησιμοποιηθεί η θωρακοσκοπική τεχνική (VATS) με ίδια ποσοστά τοπικής υποτροπής (για το στάδιο I) και πολύ μικρότερη νοσηρότητα συγκριτικά με τις προαναφερόμενες τεχνικές εφόσον τηρούνται οι βασικοί κανόνες ογκολογικής χειρουργικής [109-111]. Όλοι οι ασθενείς θα πρέπει να έχουν λεμφαδενικό καθαρισμό των N1 λεμφαδένων (ομόπλευρων περιβρογχικών και πυλαίων) και βιοψία σε τουλάχιστον τρεις N2 λεμφαδενικές θέσεις (μεσοθωρακικούς και της τρόπιδας) ή πλήρη λεμφαδενικό καθαρισμό. Πλήρης λεμφαδενικός καθαρισμός μεσοθωρακίου απαιτείται σε χειρουργεία για νόσο σταδίου IIIA. Διόγκωση μεσοθωρακικών λεμφαδένων δε σημαίνει πάντοτε διήθηση από νόσο καθώς πάντα υπάρχει η πιθανότητα αντιδραστικής λεμφαδενοπάθειας. Καθώς η εξέταση με αξονική τομογραφία έχει αρκετούς περιορισμούς στη διάγνωση ενεργού νόσου στο μεσοθωράκιο [112, 113] , κάθε ασθενής με διαγνωσμένο καρκίνο του πνεύμονα και λεμφαδενικές διογκώσεις ( 1-2 εκ) στο μεσοθωράκιο θα πρέπει να υποβάλλεται σε μεσοθωρακοσκόπηση για βιοψία και σωστή σταδιοποίηση της νόσου. Η μεσοθωρακοσκόπηση ενδείκνυται για κάθε T2 και T3 νόσο ακόμα και αν το PET CT είναι αρνητικό για μετάσταση σε



μεσοθωρακικούς λεμφαδένες [114, 115]. Το ίδιο ισχύει και για νόσο T1ab κεντρικής εντόπισης [116].

### *Ακτινοθεραπεία*

Στο μη-μικροκυτταρικό καρκίνο, η ακτινοθεραπεία μπορεί να χορηγηθεί 1) μετεγχειρητικά με σκοπό τη μείωση των ποσοστών τοπικής υποτροπής 2) ριζικά σε νόσο μη χειρουργήσιμη ή σε ασθενείς με σημαντική συννοσηρότητα 3) παρηγορικά σε μεταστατική νόσο. *Μετεγχειρητικά*, ασθενείς με διήθηση λεμφαδένων μεσοθωρακίου (N2) καθώς και αυτοί με διήθηση των ορίων εκτομής, έχουν σημαντικό κίνδυνο τοπικοπεριοχικής υποτροπής. Οι ασθενείς με διήθηση λεμφαδένων μεσοθωρακίου και υγιή όρια εκτομής θα πρέπει να υποβάλλονται σε συμπληρωματική χημειοθεραπεία και ακτινοθεραπεία αν και η σειρά διενέργειας αυτών δεν έχει απολύτως ξεκαθαριστεί [117-119]. Αντίθετα, οι ασθενείς με νόσο που διηθεί μεσοθωρακικούς λεμφαδένες και με θετικά όρια εκτομής θα πρέπει να υποβάλλονται σε σύγχρονη χημειοθεραπεία-ακτινοθεραπεία [120, 121]. Η ακτινοθεραπεία θα πρέπει να ξεκινά το συντομότερο δυνατό γιατί η τοπική υποτροπή εμφανίζεται πολύ γρήγορα σε αυτούς τους ασθενείς [122]. *Ριζική* ακτινοθεραπεία με ή χωρίς χημειοθεραπεία θα πρέπει να προσφέρεται σε όλους τους ασθενείς με νόσο σταδίων I-III που δε μπορούν να χειρουργηθούν και βρίσκονται σε καλή φυσική κατάσταση [123]. Στους ασθενείς αυτούς θα πρέπει να αποφεύγεται με κάθε τρόπο η διακοπή των συνεδριών ακτινοθεραπείας ή οι μεγάλες μειώσεις στις δόσεις της ακτινοθεραπείας. Οι ανεπιθύμητες ενέργειες πρέπει να αντιμετωπίζονται επιθετικά και μπορούν να προληφθούν με αρχικό καλό σχεδιασμό της σύμμορφης ακτινοθεραπείας για προφύλαξη των πέριξ ιστών. *Παρηγορητικά* μπορεί να χορηγηθεί ακτινοθεραπεία σε ασθενείς με απομακρυσμένες μεταστάσεις για αναλγησία ή σε περίπτωση απόφραξης των αεροφόρων οδών. Η *εισαγωγική* χημειοθεραπεία-ακτινοθεραπεία ( ιδίως δόσεις άνω των 45Gy) θα πρέπει να αποφεύγεται όταν ο ασθενής πρόκειται να χειρουργηθεί, καθώς το χειρουργείο γίνεται τεχνικά δυσκολότερο και η μετεγχειρητική τοξικότητα-νοσηρότητα αυξάνεται σημαντικά [123, 124]. Οι συνιστώμενες δόσεις ακτινοβολίας προεγχειρητικά, μετεγχειρητικά, ριζικά και παρηγορητικά φαίνονται στον πίνακα 1.7.1.

### *Χημειοθεραπεία και συνδυασμένη χημειο-ακτινοθεραπεία*

Όπως προαναφέρθηκε, το χειρουργείο προσφέρει τις περισσότερες πιθανότητες ίασης από τη νόσο στους ασθενείς με χειρουργήσιμο μη-μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα (στάδια I, II). Στους ασθενείς αυτούς η συμπληρωματική χημειοθεραπεία έχει προσφέρει όφελος επιβίωσης [125-127]. Η μελέτη IALT περιέλαβε 1867 ασθενείς σταδίων I, II και III που είχαν χειρουργηθεί σε υγιή όρια. Οι ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν να λάβουν συμπληρωματική χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα ή τίποτε [125]. Από τη μελέτη αυτή βρέθηκε στατιστικά σημαντικό όφελος στην επιβίωση (44.5% πενταετής επιβίωση έναντι 40.5%) υπέρ των ασθενών που έλαβαν συμπληρωματική χημειοθεραπεία. Ακολούθησαν οι μελέτες JBR-10 και ANITA [126, 127] που συνέκριναν τη συμπληρωματική χημειοθεραπεία με πλατίνα και βινορελμπίνη έναντι της απλής παρακολούθησης, σε ασθενείς με χειρουργημένη νόσο σταδίων IB,II και IIIA (IIIA μόνο η ANITA). Η πρώτη μελέτη έδειξε όφελος για επιβίωση μόνο στους ασθενείς με στάδιο νόσου II ενώ η δεύτερη επιβεβαίωσε ότι οι ασθενείς με χειρουργηθέν στάδιο I δεν έχουν όφελος από συμπληρωματική θεραπεία. Ο συνδυασμός σισπλατίνης-βινορελμπίνης θεωρείται από πολλούς ο καλύτερος συνδυασμός για τους ασθενείς αυτούς καθώς έχει μελετηθεί πιο πολύ από όλους τους άλλους. Μια πρόσφατη μετα-ανάλυση σε 4500 περίπου χειρουργημένους ασθενείς με νόσο σταδίων II και III, έδειξε ότι το όφελος στην επιβίωση από την επικουρική θεραπεία με βάση την πλατίνα (πλατίνα και βινορελμπίνη ή ετοποσίδη ή άλλα) είναι περίπου 5.5% στην πενταετία ανεξάρτητα από το συνδυασμό [128]. Η μελέτη CALGB 9633 επίσης δεν κατάφερε να δείξει όφελος από χρήση συμπληρωματικής ΧΜΘ με καρμποπλατίνα και πακλιταξέλη σε ασθενείς σταδίου I [129]. Για τους ασθενείς με νόσο σταδίου III δυνητικά μπορεί να χρησιμοποιηθούν και το χειρουργείο και η ακτινοβολία και η χημειοθεραπεία. Ωστόσο, υπάρχει αντιπαράθεση όσον αφορά την αντιμετώπιση της νόσου και τη σειρά με την οποία πρέπει να χρησιμοποιούνται οι διαφορετικές αυτές θεραπευτικές προσεγγίσεις. Η ταυτόχρονη χημειο-ακτινοθεραπεία φαίνεται ότι έχει καλύτερα αποτελέσματα από την απλή ακτινοθεραπεία για τα ανεγχείρητα καρκινώματα σταδίου IIIA και IIIB, ενώ φαίνεται να είναι και ανώτερη της διαδοχικής χημειοθεραπείας και ακτινοθεραπείας [130-134]. Για χειρουργημένους ασθενείς σταδίου III προτιμάται η διαδοχική χημειο-ακτινοθεραπεία αν τα όρια εκτομής του χειρουργείου είναι υγιή και η ταυτόχρονη επί θετικών ορίων εκτομής. Τα χημειοθεραπευτικά σχήματα που χρησιμοποιούνται φαίνονται στον πίνακα 1.7.2 [135-

137]. Για τους ασθενείς με μεταστατική νόσο σπάνια έχει ένδειξη το χειρουργείο και αυτοί αντιμετωπίζονται με χημειοθεραπεία ή και παρηγορητικά με ακτινοθεραπεία. Εξάιρεση αποτελούν οι ασθενείς με μονήρη μεταστατική εστία στον εγκέφαλο που η χειρουργική εξάιρεση έχει δείξει όφελος στην επιβίωση [138]. Η χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα, σε ασθενείς σταδίου IV με καλό PS, έχει δείξει όφελος επιβίωσης [139-141]. Τα φάρμακα που σε συνδυασμούς με την πλατίνα είναι δραστικά στη μεταστατική νόσο είναι οι ταξάνες, η βινορελμπίνη, η γεμισιταμπίνη, η ετοποσιδίη, η ιρινοτεκάνη και η πεμετρεξέδη. Οι συνδυασμοί των φαρμάκων αυτών έχουν δώσει ετήσια επιβίωση της τάξης του 30-40% και είναι καλύτεροι από τη χορήγηση των ίδιων φαρμάκων σε σειρά κατά μόνας [142, 143]. Οι συνδυασμοί της καρμποπλατίνας με ταξάνες, γεμισιταμπίνη ή της γεμισιταμπίνης με δοσεταξέλη είναι άλλοι δόκιμοι συνδυασμοί [144-146]. Παρά την χρήση νέων χημειοθεραπευτικών φαρμάκων, η πρόγνωση του μεταστατικού καρκίνου του πνεύμονα είναι εξαιρετικά πτωχή.

Οι *στοχεύουσες* θεραπείες που αναπτύχθηκαν τα τελευταία χρόνια έχουν βρει εφαρμογή και στην αντιμετώπιση του μεταστατικού μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα [147, 148]. Το 2006 εγκρίθηκε η χορήγηση, σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία, της μπεβασιζουμάμπης (bevacizumab), ενός ανασυνδυασμένου μονοκλωνικού αντισώματος έναντι του VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) με βάση μελέτες φάσης II και III (ECOG 4599) [149]. Το bevacizumab μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ασθενείς με μη-πλακώδη, μη-μικροκυτταρικά καρκινώματα του πνεύμονα και χωρίς ιστορικό αιμόπτυσης. Το erlotinib και το gefitinib, αναστολείς τυροσινικής κινάσης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην πρώτη ή μετά την πρώτη γραμμή σε ασθενείς με μεταλλάξεις του EGFR [150-152]. Μεταλλάξεις στο εξόνιο 19 και στο εξόνιο 21 (L858R) είναι ο καλύτερος προβλεπτικός δείκτης ανταπόκρισης στα φάρμακα αυτά [50-52]. Μια μεγάλη τυχαιοποιημένη μελέτη (FLEX) διερεύνησε τη δράση της σετουξιμάμπης (cetuximab) σε συνδυασμό με σισπλατίνη και βινορελμπίνη σε ασθενείς με προχωρημένο-μεταστατικό καρκίνο του πνεύμονα [153]. Η μελέτη αυτή έδειξε μικρό όφελος επιβίωσης υπέρ των ασθενών που ελάμβαναν και cetuximab συγκριτικά με αυτούς που έλαβαν μόνο χημειοθεραπεία (11.3 έναντι 10.1 μηνών,  $p=0.04$ ).

Η *θεραπεία συντήρησης* μπορεί να δοθεί σε ασθενείς μετά από 4-6 κύκλους χημειοθεραπείας εφόσον δεν υπάρχει επιδείνωση της νόσου. Ως θεραπεία συντήρησης μπορεί να δοθεί ένας από τους παράγοντες που χρησιμοποιήθηκε ως χημειοθεραπεία

(continuous maintenance) ή κάποιος άλλος που δεν έχει χρησιμοποιηθεί (switch maintenance). Το bevacizumab μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως θεραπεία συντήρησης αφού έχει δοθεί αρχικά σε συνδυασμό με 4-6 κύκλους χημειοθεραπείας με βάση την πλατίνα (continuous maintenance)[149]. Άλλα φάρμακα που μπορούν χρησιμοποιηθούν ως continuous maintenance είναι η σετουξιμάμπη και η πεμετρεξέδη [153, 154]. Η θεραπεία συντήρησης θα πρέπει να δίνεται μέχρι επιδείνωσης της νόσου ή μέχρι μη αποδεκτής τοξικότητας. Όσον αφορά την περίπτωση της switch maintenance, δύο μεγάλες μελέτες έδειξαν όφελος στο ελεύθερο νόσου διάστημα και την ολική επιβίωση με τη χρήση του erlotinib, του remetrexed ή του docetaxel ως θεραπεία συντήρησης μετά από 4-6 κύκλους χημειοθεραπείας με βάση την πλατίνα [155].

### **1.8 Θεραπευτική προσέγγιση στο μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα**

Για τους ασθενείς με μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, η χημειοθεραπεία αποτελεί τη βάση της θεραπευτικής αντιμετώπισης. Για τους περισσότερους ασθενείς με περιορισμένη νόσο και καλή κατάσταση ικανότητας (PS) η θεραπεία συνίσταται σε συνδυασμένη ταυτόχρονη χημειοθεραπεία και ακτινοθεραπεία [156-158]. Για τους ασθενείς με εκτεταμένη νόσο η χημειοθεραπεία μόνο είναι η θεραπεία εκλογής. Σε ασθενείς με εγκεφαλικές μεταστάσεις, η ακτινοθεραπεία μπορεί να δοθεί πριν ή μετά από την χημειοθεραπεία αναλόγως με το αν υπάρχουν συμπτώματα από το Κεντρικό Νευρικό Σύστημα ή όχι. Μονοθεραπείες ή συνδυασμοί φαρμάκων έχουν δείξει δραστικά στο μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα [159, 160]. Ο πιο συχνός συνδυασμός θεραπείας που χρησιμοποιείται στην πρώτη γραμμή είναι αυτός της σισπλατίνης με την ετοποσίδη (EP) αφού αποτελεί και τον πιο δραστικό [156, 158-160]. Ο συνδυασμός αυτός με ταυτόχρονη χορήγηση ακτινοθεραπείας είναι η θεραπεία εκλογής και για την περιορισμένη νόσο [161-164]. Πολύ συχνά η σισπλατίνα αντικαθίσταται από την καρμποπλατίνα καθώς η δεύτερη είναι λιγότερο νεφροτοξική αλλά η αντικατάσταση αυτή θα πρέπει να γίνεται μόνο όταν αυτό είναι απολύτως απαραίτητο και σπάνια στην περιορισμένη νόσο που είναι δυνητικά ιάσιμη ( δεν υπάρχουν μελέτες ισοδυναμίας στη δραστικότητα μεταξύ των δύο φαρμάκων) [165, 166]. Για την εκτεταμένη νόσο, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ο συνδυασμός της σισπλατίνης με την ιρινοτεκάνη ή ο συνδυασμός κυκλοφωσφαμίδης, δοξορουβικίνης και βινκριστίνης. Στη δεύτερη γραμμή θεραπείας

μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι ταξάνες, η ιφωσφαμίδη, η γεμισιταμπίνη και η τοποτεκάνη με πολύ πτωχές ανταποκρίσεις.

### **1.9 Θέσεις μεταστατικών εστιών**

Οι πιο συχνές μεταστατικές εστίες εκτός του θωρακικού κλωβού είναι το ήπαρ, τα οστά, τα επινεφρίδια και ο εγκέφαλος.

#### *Ηπατικές μεταστάσεις*

Οι συμπτωματικές μεταστάσεις στο ήπαρ είναι ασυνήθεις νωρίς στην πορεία της νόσου. Υποψία ύπαρξης ηπατικών μεταστάσεων (ασυμπτωματικών) μπορεί να τεθεί λόγω αυξημένων τιμών των ηπατικών ενζύμων ή με την αξονική τομογραφία ή το PET/CT κατά τη σταδιοποίηση της νόσου. Σε ασθενείς με αλλιώς χειρουργήσιμη νόσο στον πνεύμονα, η αξονική τομογραφία εντοπίζει ηπατικές μεταστάσεις στο 3% περίπου των περιπτώσεων ενώ το PET/CT στο 4% [167-169]. Η συχνότητα εμφάνισης ηπατικών μεταστάσεων αυξάνεται σημαντικά στην πορεία της νόσου. Μελέτες που έγιναν σε νεκροτομικό υλικό έδειξαν ότι ηπατικές μεταστάσεις μπορεί να βρίσκονται στο 40-50% των ασθενών που απεβίωσαν από μικροκυτταρικό ή μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα [170, 171].

#### *Οστικές μεταστάσεις*

Αντίθετα με τις ηπατικές μεταστάσεις, οι οστικές μεταστάσεις είναι τις περισσότερες φορές συμπτωματικές τη στιγμή της διάγνωσης. Οσφυαλγία ή ραχιαλγία, πλευροδυνία ή εντοπισμένος πόνος στα άκρα, που μπορεί να συνδυάζεται και με αυξημένη αλκαλική φωσφατάση, είναι τα κύρια συμπτώματα. Περίπου το 20% των ασθενών με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα υπολογίζεται ότι έχουν οστικές μεταστάσεις τη στιγμή της διάγνωσης [172]. Οι οστεολυτικές εστίες είναι πιο συχνές από τις οστεοβλαστικές με κύριο σημείο εντόπισης τα σπονδυλικά σώματα. Οι οστικές μεταστάσεις είναι ακόμα πιο συχνές στους ασθενείς με μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα και μπορεί να βρεθούν στο 30-40% αυτών [173]. Το PET και το PET/CT έχει μεγαλύτερη ευαισθησία στη διάγνωση των οστικών μεταστάσεων συγκριτικά με την αξονική τομογραφία και το σπινθηρογράφημα οστών [174].

### *Επινεφριδικές μεταστάσεις*

Τα επινεφρίδια αποτελούν συχνή θέση μεταστάσεων από τον καρκίνο του πνεύμονα αλλά σπάνια οι μεταστάσεις αυτές είναι συμπτωματικές. Υποψίες για ύπαρξη επινεφριδικής μεταστάσης εγείρονται όταν σε ασθενή με καρκίνο του πνεύμονα βρίσκεται στην αξονική κοιλίας μονόπλευρη επινεφριδική μάζα. Τα ευρήματα αυτά βρίσκονται στο 4-5% των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα και μόνο οι μισές είναι μεταστάσεις αφού τα υπόλοιπα είναι αδενώματα, οζώδης υπερπλασία και αιμορραγικές κύστεις [175-177]. Αντίστροφα, αξονική κοιλίας χωρίς ευρήματα δε μπορεί να αποκλείσει επινεφριδικές μεταστάσεις. Η έλλειψη ειδικότητας της αξονικής τομογραφίας στη διάκριση επινεφριδικών μεταστάσεων από άλλες καλοήθειες διογκώσεις δημιουργεί πρόβλημα κυρίως σε ασθενείς με δυνητικά χειρουργήσιμη νόσο στον πνεύμονα. Στα περιστατικά αυτά η χρήση του PET/CT μπορεί να βοηθήσει στη διάκριση των διογκώσεων αυτών. Άλλες απεικονιστικές εξετάσεις, όπως η μαγνητική τομογραφία των επινεφριδίων, και η βιοψία μπορούν να βοηθήσουν στη διάγνωση. Η επινεφριδικές μεταστάσεις είναι πιο συχνές σε ασθενείς με μεγάλο φορτίο νόσου. Σε νεκροτομικά υλικά το ποσοστό αυτό φτάνει μέχρι και στο 40% των ασθενών που απεβίωσαν από καρκίνο του πνεύμονα [170].

### *Εγκεφαλικές μεταστάσεις*

Τα συμπτώματα από μεταστάσεις στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) μοιάζουν με τα συμπτώματα που προκαλούνται από άλλους πρωτοπαθείς όγκους του ΚΝΣ. Τα συχνότερα είναι:

- η κεφαλαλγία
- η ναυτία-ίλιγγος
- η μερική ή πλήρης απώλεια οπτικών πεδίων
- η ημιπάρεση
- η πάρεση κρανιακών νεύρων
- οι επιληπτικές κρίσεις

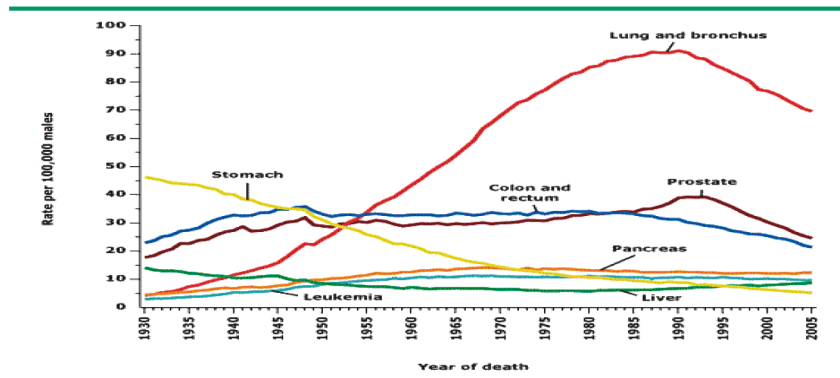
Στους ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνωμα του πνεύμονα, οι εγκεφαλικές μεταστάσεις εμφανίζονται συχνότερα σε ασθενείς με αδenoκαρκίνωμα και σπανιότερα σε ασθενείς με πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα. Η συχνότητα εμφάνισης εγκεφαλικών

μεταστάσεων αυξάνεται όσο μεγαλύτερος είναι ο πρωτοπαθής όγκος στον πνεύμονα και επί παρουσίας επιχώριων λεμφαδενικών μεταστάσεων [178]. Στους ασθενείς με μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, οι εγκεφαλικές μεταστάσεις ανευρίσκονται σε ποσοστό 20-30% τη στιγμή της διάγνωσης [179]. Επί παρουσίας μονήρους εγκεφαλικής μετάστασης, η χειρουργική αφαίρεση ακολουθούμενη από ολοκρανιακή ή στερεοτακτική ακτινοθεραπεία αποτελεί θεραπευτική επιλογή σε αυστηρά επιλεγμένο πληθυσμό ασθενών. Ασθενείς με μονήρη εγκεφαλική μετάσταση που δεν επιθυμούν ή δεν μπορούν να χειρουργηθούν πρέπει να αντιμετωπίζονται μόνο με ολοκρανιακή ή στερεοτακτική ακτινοθεραπεία [180-182]. Ο ρόλος της προφυλακτικής ολοκρανιακής ακτινοβολήσης (PCI) στο μη-μικροκυτταρικό καρκίνωμα δεν είναι ξεκάθαρος. Η μελέτη RTOG 0214, παρά το γεγονός ότι έκλεισε πρόωρα λόγω πτωχής συμμετοχής, έδειξε μείωση της συχνότητας εμφάνισης εγκεφαλικών μεταστάσεων σε ασθενείς με σταδίου III μη-μικροκυτταρικό καρκίνο χωρίς όμως αύξηση της ολικής επιβίωσης. Μια μεγάλη μετα-ανάλυση για το ρόλο της PCI στο μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, έδειξε μείωση κατά 25% στη συχνότητα εμφάνισης εγκεφαλικών μεταστάσεων στην τριετία [183]. Το όφελος από την PCI περιλαμβάνει τόσο τους ασθενείς με περιορισμένη νόσο όσο και τους ασθενείς με εκτεταμένη νόσο. Δύο ακόμα μελέτες έδειξαν και όφελος στην επιβίωση από την PCI σε ασθενείς με περιορισμένη και εκτεταμένη νόσο συγκριτικά με ασθενείς που δεν έλαβαν PCI [184, 185]. Η απόφαση για προφυλακτική ολοκρανιακή ακτινοβολήση θα πρέπει να λαμβάνεται μετά από συζήτηση με τον ασθενή και αφορά μόνο εκείνους τους ασθενείς που καλή μερική ή πλήρη ύφεση της νόσου από την χημειοθεραπεία. Η PCI δεν έχει ένδειξη σε ασθενείς με κακή γενική κατάσταση ή σε ασθενείς με επηρεασμένες ανώτερες πνευματικές λειτουργίες και δε θα πρέπει να δίνεται ταυτόχρονα με τη χημειοθεραπεία λόγω μεγάλης τοξικότητας.

### **1.10 Επιβίωση**

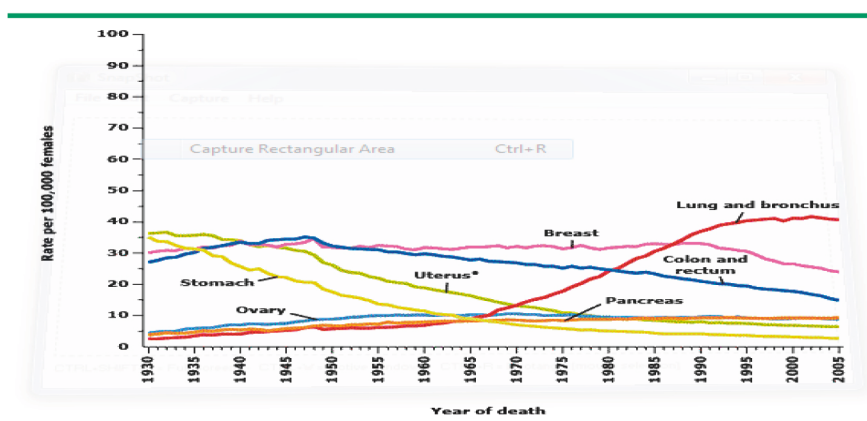
Τα πιο αξιόπιστα στοιχεία σχετικά με την επιβίωση στο μη-μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονα προέρχονται από τη βάση δεδομένων της SEER ( Surveillance, Epidemiology and End Results) η οποία χρησιμοποιήθηκε για την έβδομη έκδοση της TNM σταδιοποίησης. Με βάση τις επιβιώσεις 31000 περίπου ασθενών, βρέθηκε ότι η επιβίωση μειώνεται σταδιακά όσο το στάδιο της νόσου αυξάνεται. Συγκεκριμένα, η μέση

επιβίωση των ασθενών με στάδιο ΙΑ είναι 59 μήνες και φτάνει μόλις τους τέσσερις σε ασθενείς με στάδιο ΙV (πίνακας 1.10.1) [186]. Για τους ασθενείς με μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, ο σημαντικότερος προγνωστικός δείκτης είναι το στάδιο της νόσου κατά τη διάγνωση. Για τους ασθενείς με περιορισμένη νόσο η μέση επιβίωση κυμαίνεται μεταξύ 15 και 20 μηνών και η πενταετής επιβίωση βρίσκεται στο 15-20%. Αντίθετα, για τους ασθενείς με εκτεταμένη νόσο η επιβίωση βρίσκεται μεταξύ στους εννέα και 13 μήνες ενώ η πενταετής επιβίωση δεν ξεπερνά το 2%.



**Πίνακας 1.1.1 :** Κατανομή θανάτων ανά τύπο κακοήθειας στις Η.Π.Α. (έτη 1930-2005, άνδρες)

Jemal, A, Siegel, R, Ward, E, et al. Cancer Statistics, 2009. CA Cancer J Clin 2009; 59:225.



**Πίνακας 1.1.2 :** Κατανομή θανάτων ανά τύπο κακοήθειας στις Η.Π.Α. (έτη 1930-2005, γυναίκες)

Jemal, A, Siegel, R, Ward, E, et al. Cancer Statistics, 2009. CA Cancer J Clin 2009; 59:225.



<p><b>I. Επιθηλιακά νεοπλάσματα</b></p> <p><i>A. Καλοήγη</i></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Θηλώματα</li> <li>2. Αδενώματα</li> </ol> <p><i>B. Κακοήγη καρκινώματα</i></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Ακανθοκυτταρικό ή επιδερμοειδές (squamous cell)</li> <li>2. Αδιαφοροποίητο μικροκυτταρικό (small cell undifferentiated)</li> <li>3. Αδενοκαρκίνωμα (adenocarcinoma)</li> <li>4. Αδιαφοροποίητο μεγαλοκυτταρικό (large cell undifferentiated)</li> <li>5. Καρκινοειδές (carcinoid)</li> <li>6. Κυλίνδρωμα (cylindroma)</li> <li>7. Βλεννοεπιδερμοειδές (mucoepidermoid)</li> </ol> <p><b>II. Νεοπλάσματα συνδετικού ιστού</b></p> <p><i>A. Καλοήγη</i></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Λίπωμα, 2. Ίνωμα, 3. Νευρίνωμα, 4. Λεμφαγγείωμα, 5. Αιμαγγείωμα, 6. Μυοβλάστωμα, 7. Χόνδρωμα κ.ά.</li> </ol> <p><i>B. Κακοήγη</i></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Σαρκώματα (αγγειοσάρκωμα, χονδροσάρκωμα, ινοσάρκωμα, λειομυοσάρκωμα, λιπιοσάρκωμα, νευροϊνοσάρκωμα, οστεοσάρκωμα)</li> <li>2. Αιμαγγειοπερικύττωμα</li> <li>3. Πλασματοκύττωμα</li> </ol>	<p><b>III. Μεσοθηλιακά νεοπλάσματα</b></p> <p><i>A. Καλοήγη</i></p> <p><i>B. Κακοήγη</i></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Καρκινωσάρκωμα</li> <li>2. Πνευμονικό βλάστωμα</li> <li>3. Κακοήγη μελάνωμα</li> <li>4. Κακοήγη λέμφωμα</li> </ol> <p><b>IV. Διάφορα</b></p> <p><i>A. Καλοήγη</i></p> <p><i>B. Κακοήγη</i></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Καρκινωσάρκωμα</li> <li>2. Πνευμονικό βλάστωμα</li> <li>3. Κακοήγη μελάνωμα</li> <li>4. Κακοήγη λέμφωμα</li> </ol> <p><b>V. Μεταστατικά νεοπλάσματα</b></p> <p><b>VI. Αμαρτώματα</b></p>
---	--

### 1.3 Ιστολογική ταξινόμηση των όγκων του πνεύμονα κατά WHO (2004)

<b>Συστηματικά</b>	<b>Ενδοκρινικά</b>	<b>Νευρολογικά</b>	<b>Δερματικά</b>	<b>Αιματολογικά</b>
Ανορεξία-Κακουχία-Απώλεια Βάρους	Άμετρη έκκριση ACTH	Περιφερική Νευροπάθεια	Υπερτροφική πνευμονική οστεοαρθροπάθεια	Αναμία
Πυρετός	Υπερασβεστιαμία	Μυασθενικό σύνδρομο Eaton- Lambert	Εν τω βάθει φλεβική θρόμβωση	Πολυκυτταραιμία
Άσηπτη ενδοκαρδίτιδα	Υπονατριαμία	Νεκρωτική μυελοπάθεια	Γυροειδές ερύθημα	Υπεργλοιοτήτα αίματος
	Υπεργλυκαμία	Παρεγκεφαλική εγκεφαλοπάθεια	Πέμφιγα	Θρομβωτική θρομβοπενική πορφύρα
	Γυναικομαστία	Ορθοστατική υπόταση	Δερματομυοσίτιδα	Ηωσινοφιλία
	Υπερθυρεοειδισμός			Λευκοκυττάρωση
	Υποφωσφαταμία			

**Πίνακας 1.4** Συχνότερα παρανεοπλασματικά σύνδρομα σχετιζόμενα με τον καρκίνο του πνεύμονα

Πρωτοπαθής Όγκος (T)	T0	Δεν υπάρχει μαρτυρία πρωτοπαθούς όγκου
	T1	Όγκος μικρότερος ή ίσος από 3εκ που περιορίζεται εντός του πνευμονικού παρεγχύματος ή εντός των ορίων του σπλαχνικού υπεζωκότα, χωρίς βρογχοσκοπική μαρτυρία διήθησης εγγύτερου λοβαίου βρόγχου
	T2	Όγκος μεγαλύτερος από 3εκ αλλά μικρότερος ή ίσος από 7εκ ή με ένα από τα ακόλουθα χαρακτηριστικά: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Προσβολή του στελεχιαίου βρόγχου σε απόσταση μεγαλύτερη των 2εκ από την τρόπιδα</li> <li>• Διήθηση του περισπλάχνιου πετάλου του υπεζωκότα</li> <li>• Συνοδεύεται από ατελεκτασία ή απόφραξη που δεν καταλαμβάνει όλο τον πνεύμονα</li> </ul>
	T2a	Όγκος μεγαλύτερος από 3εκ αλλά μικρότερος ή ίσος από 5εκ
	T2b	Όγκος μεγαλύτερος από 5εκ αλλά μικρότερος ή ίσος από 7εκ
	T3	Όγκος μεγαλύτερος από 7εκ ή οποιουδήποτε μεγέθους που διηθεί άμεσα ένα από τα παρακάτω: θωρακικό τοίχωμα (περιλαμβάνονται οι όγκοι ranoast), διάφραγμα, μεσοθωρακικό υπεζωκότα ή τοιχωματικό περικάρδιο Όγκος σε απόσταση μικρότερη των 2εκ από την τρόπιδα, χωρίς διήθηση αυτής Συνοδεύεται από αποφρακτική πνευμονίτιδα ή ατελεκτασία ολόκληρου του πνεύμονα ή κακοήθη δορυφορικά οζίδια στον ίδιο λοβό
	T4	Όγκος οποιουδήποτε μεγέθους που διηθεί ένα από τα παρακάτω όργανα: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Μεσοθωράκιο-καρδιά</li> <li>• Μεγάλα αγγεία-τραχεία</li> <li>• Οισοφάγος-σώματα σπονδύλων</li> <li>• Τρόπιδα</li> </ul> Κακοήθη οζίδια σε άλλους λοβούς του ίδιου πνεύμονα
Επιχώριοι Λεμφαδένες (N)	N0	Δεν υπάρχουν επιχώριοι λεμφαδένες
	N1	Μετάσταση σε περιβρογχικούς λεμφαδένες ομοπλεύρως ή πυλαίους λεμφαδένες ομοπλεύρως και ενδοπνευμονικούς λεμφαδένες από άμεση επέκταση του πρωτοπαθούς όγκου
	N2	Μετάσταση σε λεμφαδένες του μεσοθωρακίου ομοπλεύρως ή σε λεμφαδένες της τρόπιδας
	N3	Μετάσταση σε ετερόπλευρους λεμφαδένες του μεσοθωρακίου, ετερόπλευρους πυλαίους, ετερόπλευρους ή ομόπλευρους σκαληνούς ή υπερκλείδιους λεμφαδένες
Μεταστάσεις (M)	M0	Δεν υπάρχουν μεταστάσεις
	M1a	Παρουσία κακοηθών όζων στον ετερόπλευρο πνεύμονα και διακριτών υπεζωκοτικών εμφυτεύσεων/ παρουσία κακοήθους υπεζωκοτικής συλλογής
	M1b	Απομακρυσμένη μετάσταση

Πίνακας 1.5.1 Η σταδιοποίηση καρκίνου του πνεύμονα (TNM-IASLC, 7<sup>th</sup> edition)

<b>Στάδιο Νόσου</b>	<b>TNM (7<sup>η</sup> έκδοση)</b>
IA	T1a,bN0M0
IB	T2aN0M0
IIA	T1a,1b,2aN1M0 T2bN0M0
IIB	T2bN1M0 T3N0M0
IIIA	T3N1M0 T4N0,1M0
IIIB	T4N2M0 T1-4N3M0
IV	Κάθε T, N, M1

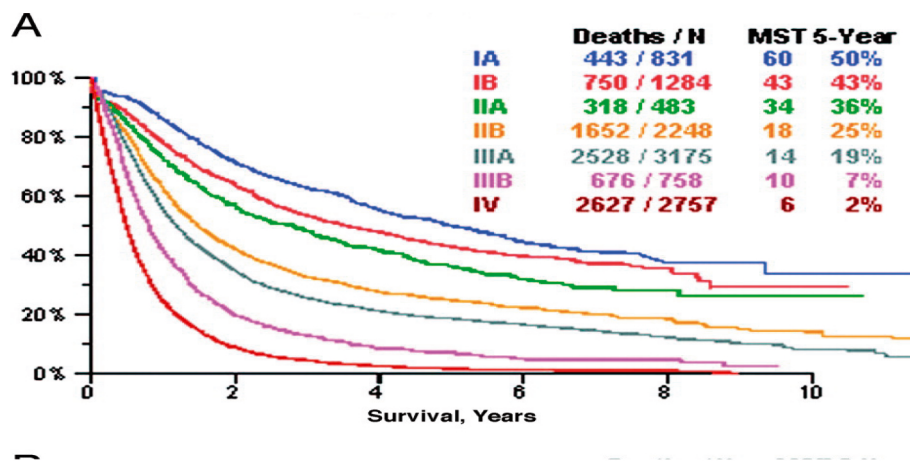
**Πίνακας 1.5.2** Τα στάδια του καρκίνου του πνεύμονα κατά TNM (IASLC, 7<sup>th</sup> edition)

<b>Είδος Θεραπείας</b>	<b>Συνολική Δόση</b>	<b>Ημερήσια Δόση</b>	<b>Διάρκεια</b>
<b>Προεγχειρητική</b>	45-50 Gy	1.8-2 Gy	4-5 εβδ
<b>Μετεγχειρητική</b>			
• Υγρή Όρια	50 Gy	1.8-2 Gy	4-5 εβδ
• Μικροσκοπική Υπολειμματική Νόσος	55-60 Gy	1.8-2 Gy	5-6 εβδ
• Υπολειμματική Νόσος	60-70 Gy	1.8-2 Gy	6-7 εβδ
<b>Ριζική</b>			
• Χωρίς χημειοθεραπεία	60-75 Gy	2 Gy	6-7 εβδ
• Με σύγχρονη χημειοθεραπεία	60-70 Gy	2 Gy	6-7 εβδ
<b>Παρηγορητική</b>			
• Σύνδρομο άνω κοίλης φλέβας ή απόφραξη βρόγχου	30-40 Gy	3 Gy	2-3 εβδ
• Οστικές μεταστάσεις	8-30 Gy	3 Gy	2-3 εβδ
• Εγκεφαλικές μεταστάσεις	30 Gy	3 Gy	2 εβδ

**Πίνακας 1.7.1** Συνιστώμενες δόσεις ακτινοθεραπείας στον καρκίνο του πνεύμονα

Σχήματα ταυτόχρονης χημειο-ακτινοθεραπείας	Σχήματα διαδοχικής χημειο-ακτινοθεραπείας
Σισπλατίνη 50mg/m <sup>2</sup> (ημέρες 1,8,29,36) Ετοποσίδη 50mg/m <sup>2</sup> (ημέρες 1-5, 29-33) RT θωρακικού τοιχώματος (61 Gy)	Σισπλατίνη 100mg/m <sup>2</sup> (ημέρες 1 και 29) Βινμπλαστίνη 5mg/m <sup>2</sup> (εβδομαδιαίως για 5 εβδομάδες) RT θωρακικού τοιχώματος (60Gy ξεκινώντας την ημέρα 50)
Σισπλατίνη 100mg/m <sup>2</sup> (ημέρες 1 και 29) Βινμπλαστίνη 5mg/m <sup>2</sup> (εβδομαδιαίως για 5 εβδομάδες) RT θωρακικού τοιχώματος (100Gy)	Πακλιταξέλη 200mg/m <sup>2</sup> (2 κύκλοι κάθε 3 εβδομάδες) Καρμποπλατίνη AUC 6 (2 κύκλοι κάθε 3 εβδομάδες) RT θωρακικού τοιχώματος (63 Gy ξεκινώντας την ημέρα 42)
Πακλιταξέλη 50mg/m <sup>2</sup> (εβδομαδιαίως) Καρμποπλατίνη AUC 2 (εβδομαδιαίως) RT θωρακικού τοιχώματος (63 Gy)	

**Πίνακας 1.7.2** Συνιστώμενα σχήματα χημειο-ακτινοθεραπείας (ταυτόχρονης και διαδοχικής)



**Πίνακας 1.10.1** Επιβίωση ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα ανά στάδιο νόσου [186]

## **2. Κυτταρολογία Ουροποιητικού Συστήματος**

### **2.1 Ανατομία και ιστολογία**

Τα ούρα παράγονται από τους νεφρούς. Στη φλοιώδη μοίρα του νεφρού το αίμα φιλτράρεται στο νεφρικό σπείραμα. Το διήθημα περνάει από το εγγύς εσπειραμένο σωληνάριο, την αγκύλη του Henle, και το άπω εσπειραμένο σωληνάριο. Τελικά τα ούρα περνούν διαμέσου των αθροιστικών σωληναρίων στην νεφρική πύελο, και εν συνεχεία στους ουρητήρες και στην ουροδόχο κύστη, όπου και αποθηκεύονται μέχρι την ούρηση μέσω της ουρήθρας, η οποία στους άνδρες διασχίζει τον προστάτη αδένα. Ο βλεννογόνος του ουροποιητικού συστήματος αποτελείται από ένα πολύστιβο επιθήλιο με 7-8 στιβάδες κατά μέσο όρο, που αποτελούνται από εξειδικευμένα κύτταρα τα οποία συνδέονται σε βασική μεμβράνη. Το πάχος του βλεννογόνου της ουροδόχου κύστης ποικίλλει, και εξαρτάται από την κατάσταση της ουροδόχου κύστης. Όταν διατείνεται υπάρχουν λίγες μόνο στιβάδες ουροθηλιακών κυττάρων, ενώ όταν είναι άδεια παρατηρείται ένα παχύ πολύστιβο επιθήλιο. Τα κύτταρα στις κατώτερες στιβάδες είναι μικρά και μονοπύρρηνα. Τα επιφανειακά κύτταρα είναι μεγαλύτερα και συχνά πολυπύρρηνα με 2 έως και 55 πυρήνες. Κάθε επιφανειακό κύτταρο καλύπτει δύο ή περισσότερα από τα κύτταρα των κατώτερων στιβάδων (κύτταρα 'ομπρέλα'). Το ουροθήλιο της φυσιολογικής ουροδόχου κύστης συχνά παρουσιάζει μερικές εμβαθύνσεις που ονομάζονται φωλιές του von Brunn. Συχνά καλύπτονται από βλεννοεκκριτικά κυλινδρικά κύτταρα παρά από ουροθηλιακά κύτταρα. Η ιστολογική εικόνα που παρατηρείται όταν αυτά διατείνονται με βλέννη, ονομάζεται κυστική κυστίτιδα ή κυστική αδενίτιδα (cystitis cystica or cystitis glandularis).

### **2.2 Κυτταρολογική εξέταση ούρων**

Η κυτταρολογική εξέταση ούρων περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Παπανικολάου και Marshall το 1945 και έκτοτε αποτέλεσε τη βάση για τη διάγνωση και την παρακολούθηση των ασθενών με καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης (TCC, transitional cell carcinoma) [187]. Μέχρι τη δεκαετία του 1960 είχαν περιγραφεί και τα κυτταρολογικά, ιστολογικά και κλινικά χαρακτηριστικά του υψηλού βαθμού κακοήθειας ουροθηλιακού καρκινώματος. Παρά τις πολλές προσπάθειες να αναπτυχθούν και άλλες διαγνωστικές τεχνικές με υψηλότερη ευαισθησία και ειδικότητα, η κυτταρολογική εξέταση ούρων παραμένει μια από τις καλύτερες εξετάσεις για τη διάγνωση ουροθηλιακών κακοηθειών αφού πρόκειται για μια γρήγορη, φθηνή και αξιόπιστη μέθοδο [188, 189]. Η

κύρια ένδειξη για τη διενέργεια της κυτταρολογικής εξέτασης ούρων είναι η αιματουρία [190-192] αν και μόνο στο 5-10% των ασθενών με αιματουρία διαγιγνώσκεται κακοήθεια [193-195]. Η διάγνωση και η παρακολούθηση (follow up) ασθενών με ουροθηλιακά καρκινώματα επίσης γίνεται και τη βοήθεια της κυτταρολογικής εξέτασης ούρων αφού οι ασθενείς αυτοί παρουσιάζουν υψηλή πιθανότητα υποτροπής ή και εμφάνισης δεύτερων κακοηθειών του ουροποιητικού [193]. Η εξέταση δεν έχει θέση στον προληπτικό έλεγχο (screening) ασυμπτωματικών ομάδων πληθυσμού λόγω σχέσης κόστους-οφέλους [196-198], ενδείκνυται όμως για το screening μεγάλων ομάδων που βρίσκονται σε υψηλό κίνδυνο λόγω έκθεσης σε γνωστά καρκινογόνα (πχ χρώματα με ανιλίνη, αρωματικές αμίνες σε πετροχημικά εργοστάσια ή θεραπεία με κυκλοφωσφαμίδη σε μικρή ηλικία) [199-201].

Η συλλογή των δειγμάτων μπορεί να γίνει με έξι διαφορετικούς τρόπους καθένας από τους οποίους παρουσιάζει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα:

- Αυτόματη ούρηση
- Καθετηριασμός κύστης
- Εκπλύματα (washing) ουροδόχου κύστης
- Εκπλύματα (washing) ανώτερου ουροποιητικού
- Λήψη κυττάρων με βουρτσάκι (brushing) από το ανώτερο ουροποιητικό
- Λήψη ούρων από νεοκύστη τμήματος ειλεού (μετά από κυστεκτομή)

Η συλλογή δειγμάτων από αυτόματη ούρηση είναι ο πιο απλός και ο λιγότερο επεμβατικός τρόπος. Δεν είναι ξεκάθαρο ποιά είναι η ελάχιστη ποσότητα ούρων που απαιτείται αλλά φαίνεται ότι 75 με 100 ml είναι απαραίτητα για σωστή διάγνωση. Το κύριο μειονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι το γεγονός ότι συχνά τα δείγματα είναι υποκυτταρικά ή εκφυλισμένα. Μπορεί επίσης να περιέχουν σημαντική ποσότητα κυττάρων από το δέρμα ή και από το κοιλικό επιθήλιο θήλεων. Η ευαισθησία της μεθόδου αυξάνεται σημαντικά όταν τα δείγματα λαμβάνονται σε συνεχόμενες μέρες. Συγκεκριμένα, η ευαισθησία της μεθόδου αυξάνεται από 41% σε 51% και 60% για δείγματα τριών συνεχόμενων ημερών [202]. Η εκφύλιση των ουροθηλιακών κυττάρων ξεκινά πριν ακόμα την αποφολίδωση και συνεχίζεται κατά την επαφή των κυττάρων με τα ούρα πριν και μετά τη συλλογή. Η παρατεταμένη επαφή με τα ούρα μπορεί να επηρεάσει τη διάγνωση και γι'

αυτό το λόγο δε θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ούρα από 24ωρες συλλογές ή από ουροσυλλέκτες [203, 204]. Τα δείγματα από καθετηριασμό ή εκπλύματα της κύστης έχουν συνήθως υψηλότερη κυτταροβρίθεια και μικρότερα ποσοστά επιμόλυνσης αλλά, καθώς λαμβάνονται με επεμβατική μέθοδο, μπορεί να εμφανίζουν artifacts και να δυσχεράνουν τη διάγνωση από τον κυτταρολόγο [205]. Η πιθανότητα, επίσης, απόσπασης μεγάλων ομάδων ουροθηλιακών κυττάρων με την άκρη του καθετήρα είναι μεγάλη και τα κύτταρα αυτά μπορούν να μιμηθούν κυτταρολογικά τα κύτταρα από θηλώδες καρκίνωμα. Τα δείγματα θα πρέπει να αποστέλλονται στο εργαστήριο το συντομότερο δυνατόν. Εάν μικρή καθυστέρηση είναι αναπόφευκτη το δοχείο θα πρέπει να διατηρηθεί σε ψυχρό περιβάλλον. Στην περίπτωση μακράς καθυστέρησης θα πρέπει να προστεθεί στο δείγμα αλκοόλη ή μονιμοποιητικό διάλυμα σε ίση ποσότητα.

Ούρα από αυτόματη ούρηση ή από καθετήρα μπορούν να προετοιμαστούν για μικροσκόπηση με τις ακόλουθες μεθόδους:

- Φυγοκέντρηση που ακολουθείται από κυτταροφυγοκέντρηση. Η μονιμοποίηση με διάλυμα 50% αιθυλικής αλκοόλης είναι απαραίτητη πριν χρησιμοποιηθεί η χρωστική μέθοδος κατά Παπανικολάου. Η κυτταροφυγοκέντρηση θα πρέπει να δώσει ένα δείγμα το οποίο να είναι σχεδόν μία στιβάδα κυττάρων και να έχει περίπου 6mm διάμετρο.

- Άμεσα επιχρίσματα. Αυτά ετοιμάζονται ευκολότερα αλλά συνήθως δεν έχουν ικανοποιητική κυτταροβρίθεια.

- Δείγματα από φιλτράρισμα μέσω μεμβράνης. Αυτά έχουν καλή κυτταροβρίθεια αλλά η προετοιμασία τους είναι δύσκολη. Τα δείγματα μονιμοποιούνται σε αλκοόλη και στη στην συνέχεια βάφονται κατά Παπανικολάου.

Κυτταρολογικά δείγματα λεπτής επίστρωσης όπως το ThinPrep (Cytoc Corporation, Boxborough, MA, USA) χρησιμοποιούνται επίσης για την προετοιμασία δείγματος ούρων. Η διατήρηση των κυττάρων είναι συνήθως πολύ καλή και η διαδικασία είναι ευκολότερη από αυτήν του φιλτραρίσματος μέσω μεμβράνης [206]. Στα φυσιολογικά ευρήματα της εξέτασης περιλαμβάνονται:

- Μικρή κυτταροβρίθεια, αποτελούμενη συνήθως από μεμονωμένα κύτταρα (ειδικά στα ούρα από αυτόματη ούρηση)

- Κύτταρα «ομπρέλα», και πλακώδη κύτταρα κυριαρχούν στην κυτταρολογική εικόνα, αλλά πάντοτε υπάρχουν κύτταρα από βαθύτερες στιβάδες.

- Στα δείγματα ούρων από καθετήρα και από έκπλυση της ουροδόχου κύστης παρατηρούνται σταθερά δισδιάστατες και τρισδιάστατες ομάδες ουροθηλιακών κυττάρων.
- Η παρουσία λίγων πολυμορφοπυρήνων είναι συνηθισμένο εύρημα.
- Σπερματοζώαρια και αμυλοειδή σωματίδια μπορεί να παρατηρηθούν στους άνδρες.

Τα πλακώδη κύτταρα είναι συχνό εύρημα στα δείγματα από γυναίκες και προέρχονται από τον κόλπο. Στους άνδρες το εύρημα αυτό συνήθως αντιπροσωπεύει μετάπλαση στο τρίγωνο της ουροδόχου κύστης. Τα κύτταρα από τη σπερματοδόχο κύστη μπορούν να διαγνωστούν λανθασμένα ως κακοήθη. Μπορεί να έχουν μεγάλους υπερχρωματικούς πυρήνες και υψηλή πυρηνο/κυτταροπλασματική αναλογία. Η παρουσία κιτρινωπών κοκκίων χρωστικής ουσίας στο κυτταρόπλασμα επιτρέπει συνήθως τη σωστή ταξινόμηση. Τα ουροθηλιακά κύτταρα μπορούν να παρουσιάσουν εκφυλιστικές μη-νεοπλασματικές αλλοιώσεις: κενοτοπίωση του κυτταροπλάσματος, πυρηνική υπερχρωμασία, κόκκινα ενδοπλασματικά έγκλειστα [206].

Τα καρκινώματα της κύστης είναι στο 90% των περιπτώσεων εκ μεταβατικού επιθηλίου με προέλευση από το ουροθήλιο. Σε ποσοστό 6-8% πρόκειται για πλακώδη καρκινώματα ενώ στο υπόλοιπο 2% της πρόκειται για αδenoκαρκινώματα. Τα αδenoκαρκινώματα μπορεί να έχουν προέλευση από τον ουραχό (συνηθέστερα) ή να μην έχουν προέλευση από τον ουραχό. Τα τελευταία θεωρούνται αποτέλεσμα μεταπλασίας του μεταβατικού επιθηλίου της κύστης από χρόνια ερεθισμό [207]. Περίπου το 70-80% των νέων ασθενών διαγιγνώσκονται σε αρχικό στάδιο (Ta, Tis ή T1).



## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**



## Σκοπός της μελέτης

Ο καρκίνος του πνεύμονα είναι το πιο συχνό αίτιο θανάτου από καρκίνο παγκοσμίως για άνδρες και γυναίκες, προκαλώντας περίπου 1.2 εκατομμύρια θανάτους το χρόνο [1]. Παρά το γεγονός ότι πολλά νέα φάρμακα υπάρχουν πλέον στη φαρέτρα της ογκολογίας για την αντιμετώπιση της νόσου, τα αποτελέσματα όσον αφορά τη βελτίωση των ποσοστών επιβίωσης των ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα δεν είναι εξίσου θεαματικά. Στην εποχή των νέων στοχευουσών θεραπειών, και καθώς το κόστος της φαρμακευτικής δαπάνης για την αντιμετώπιση του καρκίνου αυξάνεται δραματικά παγκοσμίως, είναι επιτακτική η ανακατεύθυνση προς την «προσωποποιημένη/εξατομικευμένη» θεραπεία. Μεγάλο κομμάτι της σύγχρονης ογκολογικής έρευνας στοχεύει ακριβώς σε αυτή την κατεύθυνση. Η ανακάλυψη νέων προγνωστικών και προβλεπτικών δεικτών στον καρκίνο του πνεύμονα είναι βασική προϋπόθεση για την επίτευξη καλύτερων αποτελεσμάτων από τη θεραπεία και ταυτόχρονα τη μείωση του κόστους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η ανακάλυψη των μεταλλάξεων του EGFR που μπορούν να προβλέψουν ανταπόκριση στη θεραπεία με erlotinib και gefitinib ή των μεταλλάξεων του k-ras στη θεραπεία με μονοκλωνικά αντισώματα (cetuximab, panitumumab) στον καρκίνο του παχέος εντέρου.

Στα πλαίσια της έρευνας αυτής εντάσσεται και η δική μας μελέτη που αποτελεί θέμα της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Η αρχική μας παρατήρηση, η θετική κυτταρολογική ούρων δηλαδή σε μικρό πληθυσμό ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα που δεν είχαν εμφανείς μεταστάσεις στο ουροποιητικό, οδήγησε στην απόφαση για την προοπτική διερεύνηση του φαινομένου σε ευρύτερο αριθμό ασθενών με καρκίνο του πνεύμονα (μεταστατικό και μη) καθώς και σε ομάδες ελέγχου (control groups). Η μελέτη έλαβε χώρα στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ιωαννίνων και διήρκεσε από τον Νοέμβριο του 2007 ως και τον Μάρτιο του 2009. Βασικός στόχος της μελέτης ήταν, αρχικά, να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη του φαινομένου και στη συνέχεια να εκτιμηθεί η συχνότητά του σε ασθενείς με μικροκυτταρικό και μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα όλων των σταδίων. Πρόκειται για ένα φαινόμενο το οποίο δεν είχε ξαναπεριγραφεί στην ιατρική βιβλιογραφία σε συμπαγείς όγκους. Υπήρχαν κάποιες μεμονωμένες αναφορές για εμφάνιση του φαινομένου σε ασθενείς με μη-Hodgkin's λεμφώματα αλλά καμία προοπτική μελέτη. Η δεύτερη μεγάλη προσπάθεια ήταν να βρεθούν πιθανές συσχετίσεις του φαινομένου με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους. Μελετήθηκαν πιθανές συσχετίσεις με το φύλο, την κατάσταση ικανότητας (performance status, PS), τον ιστολογικό τύπο του

όγκου, το στάδιο της νόσου, τον αριθμό και τη θέση των μεταστατικών εστιών, τη χημειοθεραπεία (αριθμό κύκλων και είδος) και την ύπαρξη ή όχι νεφρικής έκπτωσης. Για να μπορέσουμε να συνδέσουμε τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής με την καθημερινή κλινική πράξη, βασική προσπάθειά μας ήταν να βρούμε τις πιθανές συσχετίσεις του φαινομένου με τα ποσοστά επιβίωσης ή την ανταπόκριση στη θεραπεία, δηλαδή την πιθανή προγνωστική και η προβλεπτική αξία του φαινομένου. Εκτός όμως από τη μελέτη των πιθανών συσχετίσεων, σημαντικό κομμάτι της έρευνάς μας επικεντρώθηκε και στη μελέτη των παθογενετικών μηχανισμών πίσω από το φαινόμενο. Καθώς πρόκειται για πρώτη περιγραφή του φαινομένου και δεν υπάρχει εκτεταμένη βιβλιογραφία, αναπτύξαμε θεωρίες για πιθανούς μηχανισμούς που στη συνέχεια ερευνήσαμε με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία, τα κλινικά και εργαστηριακά μας δεδομένα. Έγινε μελέτη της έκφρασης των χημειοκινών στα κύτταρα του όγκου για διερεύνηση τροπισμού των κυττάρων προς το ουροθήλιο και οργανώθηκε πειραματική διερεύνηση του φαινομένου σε πειραματόζωα. Η μελέτη της έκφρασης των χημειοκινών έγινε στο τμήμα Παθολογικής Ανατομικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων. Η πειραματική μελέτη σε ποντίκια έγινε με τη βοήθεια του εργαστηρίου Πειραματικής Χημειοθεραπείας του Νοσοκομείου «Θεαγένειο» στη Θεσσαλονίκη.

Τα κεφάλαια του **ειδικού** μέρους της διδακτορικής αυτής διατριβής περιγράφουν τις πληθυσμιακές ομάδες αρρώστων που συμμετείχαν και τη χρησιμοποιηθείσα μεθοδολογία, τα αποτελέσματα της έρευνας και την κριτική συζήτηση των αποτελεσμάτων.

## **Υλικά και Μέθοδοι**

### **1. Ασθενείς**

#### **1.1 Ομάδες Ασθενών**

Μεταξύ Νοεμβρίου 2007 και Μαρτίου 2009, μελετήθηκαν 150 ασθενείς με πρώιμο και προχωρημένο-μεταστατικό καρκίνο του πνεύμονα. Η μελέτη ήταν προοπτική και οι ασθενείς έπασχαν από μικροκυτταρικό ή μη-μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονα όλων των ιστολογικών τύπων. Τα κριτήρια για συμμετοχή στη μελέτη ήταν μη-ειδικά αφού ήταν απαραίτητη μόνο η ιστολογική ή κυτταρολογική επιβεβαίωση της νόσου και η συγκατάθεση του ασθενούς για συλλογή ούρων από αυτόματη ούρηση. Εκτός από τους ασθενείς αυτούς, το φαινόμενο μελετήθηκε και σε τρεις ομάδες ασθενών που χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδες ελέγχου (control groups). Καθεμία από τις ομάδες αποτελούνταν από 15 ασθενείς. Η πρώτη ομάδα ασθενών έπασχε από μεταστατικό καρκίνο του πνεύμονα, η δεύτερη από μεταστατικό καρκίνο παχέος εντέρου και η τρίτη από σταδίου IV μη-Hodgkin's λέμφωμα.

#### **1.2 Χαρακτηριστικά ασθενών και όγκου**

Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν τα 63 έτη (εύρος ηλικίας, 29-84 έτη). Στη μελέτη συμπεριλήφθησαν 102 άντρες ασθενείς και 48 γυναίκες. Από μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονα έπασχαν οι 28 ασθενείς (20 άντρες και 8 γυναίκες), από τους οποίους 16 είχαν εκτεταμένη (extensive) και 12 περιορισμένη (limited) νόσο. Οι υπόλοιποι ασθενείς (n: 122) έπασχαν από μη-μικροκυτταρικό καρκίνωμα όλων των ιστολογικών τύπων. Οι ασθενείς με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο ήταν στην πλειοψηφία τους άντρες ( 82 άντρες και 40 γυναίκες). Στάδια νόσου I-III είχαν 38 ασθενείς και στάδιο IV οι υπόλοιποι (n:84). Αδενοκαρκίνωμα είχε διαγνωστεί σε 50 ασθενείς, πλακώδες σε 41, αδιαφοροποίητο σε εννιά, ενώ σε 22 ασθενείς δεν είχε γίνει ιστολογική ταυτοποίηση αφού η διάγνωση είχε γίνει με βάση κυτταρολογική ή το δείγμα δεν ήταν επαρκές. Τα επιδημιολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών της μελέτης μας φαίνονται συγκεντρωτικά στον πίνακα 1.2.1

Για να διευκολυνθεί η μελέτη των παθογενετικών μηχανισμών οι ασθενείς κατηγοριοποιήθηκαν επίσης με βάση τον αριθμό και τη θέση των μεταστατικών εστιών. Συγκεκριμένα, από τους 16 ασθενείς με εκτεταμένο μικροκυτταρικό καρκίνο του

πνεύμονα οι έξι είχαν μονήρη μεταστατική εστία και οι δέκα περισσότερες από μία εστίες. Οι συχνότερες θέσεις μετάστασης ήταν το ήπαρ και ο εγκέφαλος. Οι ασθενείς με μεταστατικό μη-μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονα είχαν κυρίως εγκεφαλικές, ηπατικές και οστικές μεταστάσεις. Συγκεκριμένα, οι 45 ασθενείς είχαν μονήρη μεταστατική εστία και οι 39 πολλαπλές. Ο αριθμός και οι θέσεις μεταστατικών εστιών στους ασθενείς της μελέτης μας φαίνονται στον πίνακα 1.2.2.

Η πλειονότητα των ασθενών είχε λάβει χημειοθεραπεία. Συνδυασμοί χημειοθεραπευτικών με βάση την πλατίνα και την γεμισιταβίνη, την πακλιταξέλη, τη δοσεταξέλη ή τη βινορελμπίνη είχαν χρησιμοποιηθεί ως επικουρική ή παρηγορική χημειοθεραπεία σε ασθενείς με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Οι ασθενείς με μικροκυτταρικό καρκίνο είχαν λάβει σισπλατίνα (ή καρμποπλατίνα) σε συνδυασμό με ετοποσίδη ως πρώτη γραμμή θεραπείας. Σε επιδείνωση νόσου είχαν λάβει τοποτεκάνη, ιρινοτεκάνη ή δοσεταξέλη. Τρεις ασθενείς με μικροκυτταρικό και 11 με μη-μικροκυτταρικό δεν είχαν λάβει καμία θεραπεία κατά τη στιγμή της λήψης των ούρων ενώ δύο βρίσκονταν υπό ανακουφιστική αγωγή (best supportive care). Σε πρώτη γραμμή θεραπείας βρίσκονταν 66 ασθενείς με NSCLC και 17 με SCLC, σε δεύτερη γραμμή 34 και 8 αντίστοιχα. Εννέα ασθενείς με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο υποβάλλονταν σε τρίτη γραμμή θεραπείας (πίνακας 1.2.3).

	NSCLC	SCLC	ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ		
			Ca ΜΑΣΤΟΥ	Ca ΠΑΧΕΟΣ	NHL
N	122	28	15	15	15
<u>ΦΥΛΟ</u> Άρρεν Θήλυ	82 40	20 8	0 15	7 8	7 8
<u>ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ</u> <u>ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ (PS)</u> 0 1 2 3 4	78 28 13 3 0	20 7 1 0 0			
<u>ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΟΣ</u> <u>ΤΥΠΟΣ</u> Αδενοκαρκίνωμα Πλακώδες Αδιαφοροποίητο Άγνωστο	50 41 9 22				
<u>ΣΤΑΔΙΟ</u> I-III IV  Περιορισμένο Εκτεταμένο	38 84	12 16	15	15	15

**Πίνακας 1.2.1:** Επιδημιολογικά χαρακτηριστικά ασθενών

	NSCLC	SCLC	ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ		
			Ca ΜΑΣΤΟΥ	Ca ΠΑΧΕΟΣ	NHL
N	122	28	15	15	15
<u>ΑΡΙΘΜΟΣ ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΩΝ ΕΣΤΙΩΝ</u>					
Μονήρης	45	6	5	4	5
Πολλαπλές	39	10	10	11	10
<u>ΘΕΣΕΙΣ ΜΕΤΑΣΤΑΤΙΚΩΝ ΕΣΤΙΩΝ</u>					
Εγκέφαλος	16	7			
Πνεύμονες	12	3			
Ήπαρ	18	8			
Οστά	15	3			
Επινεφρίδια	8	4			
Νεφροί	1	0			

**Πίνακας 1.2.2:** Αριθμός και θέσεις μεταστατικών εστιών

	NSCLC	SCLC	ΟΜΑΔΑ ΕΛΕΓΧΟΥ		
			Ca ΜΑΣΤΟΥ	Ca ΠΑΧΕΟΣ	NHL
N	122	28	15	15	15
<u>ΧΗΜΕΙΟΘΕΡΑΠΕΙΑ</u>					
Καμία	11	3			
1 <sup>η</sup> γραμμή	66	17	8	7	8
2 <sup>η</sup> γραμμή	34	8	7	6	2
3 <sup>η</sup> γραμμή	9			2	5
Υποστήριξη	2				

**Πίνακας 1.2.3:** Αριθμός ασθενών ανά γραμμή χημειοθεραπείας



## **2. Μέθοδοι**

### **2.1 Κυτταρολογική εξέταση ούρων**

Η κυτταρολογική εξέταση ούρων έγινε σε δείγματα ούρων προερχόμενα από αυτόματη ούρηση των ασθενών. Τρία δείγματα ούρων ελήφθησαν από κάθε ασθενή, ένα ανά ημέρα για τρεις συνεχόμενες ημέρες. Ο όγκος των ούρων σε κάθε δείγμα ήταν 20 ml, τα ούρα έπρεπε να προέρχονται από πρώτη πρωινή ούρηση και τοποθετούνταν απευθείας σε μονιμοποιητικό διάλυμα (Cytolyt®) με αναλογία 1:1. Η μεταφορά των δειγμάτων γίνονταν εντός 24 ωρών στο εργαστήριο Κυτταρολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων για περαιτέρω επεξεργασία. Η επεξεργασία των δειγμάτων έγινε με την τεχνική λεπτής επίστρωσης ThinPrep (Cytoc Corporation, Boxborough, MA, USA) χρησιμοποιώντας τον Thin-Prep 2000 Processor. Ακολούθησε χρώση των δειγμάτων με την τροποποιημένη τεχνική Παπανικολάου [208].

Τα δείγματα μελετήθηκαν από τους κυτταρολόγους και, για όσα ανιχνεύθηκαν καρκινικά κύτταρα, ακολούθησε ανοσοϊστοχημική χρώση για κυτοκερατίνες 7 και 20 (CK7 και CK20) καθώς και για τον θυρεοειδικό μεταγραφικό παράγοντα 1 (TTF-1, thyroid transcription factor-1). Η ανοσοκυτταροχημική χρώση είχε ως σκοπό να επιβεβαιώσει τη ιστογενετική προέλευση των κυττάρων από τον πρωτοπαθή όγκο του πνεύμονα. Για τη χρώση χρησιμοποιήθηκαν τα μονοκλωνικά αντισώματα CK7 (Biocare, USA, ready-to-use), CK20 (Dako, Denmark, ready-to-use) και TTF-1 (Cellmarque, USA, ready-to-use). Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για τη χρώση ήταν το βασικό πρωτόκολλο που χρησιμοποιείται από τη συσκευή BenchMark XT (Ventana, USA). Οι κυτταρολόγοι μελέτησαν τα δείγματα «τυφλά», δεν ήταν δηλαδή ενήμεροι για το στάδιο της νόσου ή τη νεφρική λειτουργία των ασθενών στους οποίους αντιστοιχούσαν τα δείγματα.

### **2.2 Αιματολογικός και βιοχημικός έλεγχος ασθενών**

Όλοι οι ασθενείς της μελέτης υπεβλήθησαν σε πλήρη αιματολογικό και βιοχημικό έλεγχο καθώς και γενική εξέταση ούρων. Συγκεκριμένα, γενική αίματος και βιοχημικός έλεγχος αίματος με σάκχαρο, ουρία, κρεατινίνη, SGOT, SGPT, LDH, Na, K, Ca, ουρικό οξύ ελήφθησαν στο σύνολο των ασθενών. Γενική εξέταση ούρων με μέτρηση πρωτεΐνης, γλυκόζης, αιμοσφαιρίων, pH, κετονών, ουροχολινογόνου διενεργήθηκε σε όλους τους ασθενείς της μελέτης πριν από τη λήψη των δειγμάτων για κυτταρολογική εξέταση.

### 2.3 Παθολοανατομική εξέταση πρωτοπαθών όγκων (μελέτη χημειοκινών)

Μελετήθηκε το προφίλ των χημειοκινών CXCR4 (chemokine receptor 4) και SLC/CCL21 (secondary lymphoid tissue chemokine) στους πρωτοπαθείς όγκους των ασθενών με θετική κυτταρολογική σύρων. Ως ομάδα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν οι πρωτοπαθείς όγκοι ασθενών του ίδιου σταδίου και της ίδιου ιστολογικού τύπου που είχαν όμως αρνητική κυτταρολογική σύρων. Οι ανοσοϊστοχημικές μελέτες έγιναν σε τομές 4μm από κύβους παραφίνης των πρωτοπαθών όγκων με την τεχνική αβιδίνη-βιοτίνης και χρησιμοποιώντας τη συσκευή ανοσοϊστοχημικής χρώσης/ in situ υβριδισμού, BenchMark XT. Για τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα αντισώματα: προερχόμενα από κουνέλι αντι-CXCR4 πολυκλωνικά (Sigma-Aldrich, Inc, Missouri, USA) με διάλυση 1:100 και τα προερχόμενα από αίγα αντι-CCL21 πολυκλωνικά (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA) με διάλυση 1:70. Για κάθε τομή με χρώση, μια τομή του πρωτοπαθούς όγκου χωρίς το αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικό δείγμα σύγκρισης (negative control). Ως θετικό δείγμα σύγκρισης (positive control) χρησιμοποιήθηκαν τομές από φυσιολογικούς λεμφαδένες. Η ένταση της χρώσης αξιολογήθηκε από δύο παθολογοανατόμους ανεξάρτητα και «τυφλά», χωρίς να έχουν γνώση των κλινικών πληροφοριών του ασθενή. Η ένταση της χρώσης των δειγμάτων ορίστηκε ως εξής:

- 0 = αρνητική χρώση
- +1= ασθενώς θετική χρώση
- +2= μετρίως θετική χρώση
- +3= ισχυρά θετική χρώση

Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, η ανοσοϊστοχημεία θεωρούνταν θετική όταν υπήρχε χρώση τουλάχιστον στο 20% των κυττάρων [209].

### 2.4 Απεικονιστικές και ενδοσκοπικές εξετάσεις

Με σκοπό τον αποκλεισμό μακροσκοπικών μεταστάσεων στο ουροποιητικό σύστημα, όλοι οι ασθενείς υπεβλήθησαν σε λεπτομερή απεικονιστικό έλεγχο κοιλίας-πυέλου με αξονική τομογραφία και με τη χρήση σκιαγραφικού. Σε τέσσερεις ασθενείς διενεργήθηκε κυστεοσκόπηση με λήψη τυχαίων βιοψιών από το βλεννογόνο για το αποκλεισμό ουροθηλιακών μικροσκοπικών μεταστάσεων μετά από γραπτή συγκατάθεσή τους.

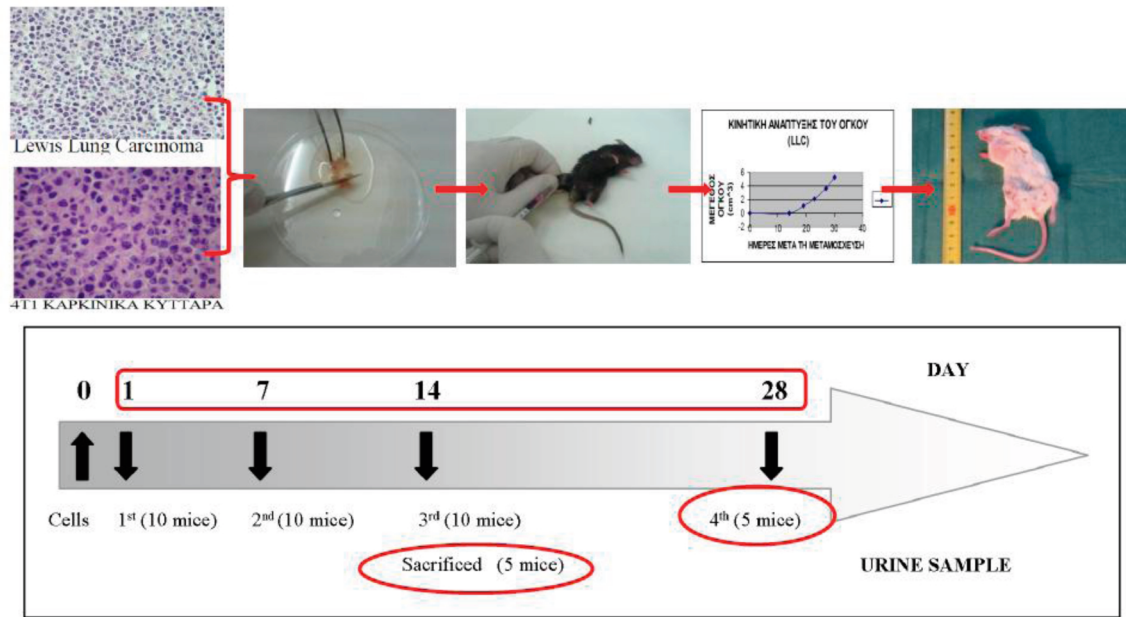
Δυστυχώς, στην πλειοψηφία των ασθενών, δεν ήταν δυνατή η διενέργεια κυστεοσκόπησης είτε λόγω κακής γενικής κατάστασης είτε λόγω άρνησης των ασθενών να δώσουν τη συγκατάθεσή τους για τη διενέργεια της εξέτασης.

## **2.5 Πειραματική μελέτη**

Για την πειραματική μελέτη του φαινομένου χρησιμοποιήθηκαν θηλυκοί και αρσενικοί επίμυες C57Bl/6 καθώς και θηλυκοί BALB/c. Το πείραμα έλαβε χώρα στο Εργαστήριο Πειραματικής Χημειοθεραπείας του νοσοκομείου «Θεαγένειο» στη Θεσσαλονίκη. Στο πρώτο πειραματικό μοντέλο, χρησιμοποιήθηκαν καρκινικά κύτταρα πνεύμονα Lewis Lung Carcinoma (LLC) τα οποία αγοράστηκαν από το εμπόριο (DCTD, NCI, Frederick, MD, USA). Τα κύτταρα ενοφθαλμίστηκαν υποδοριώς στα πειραματόζωα την ημέρα 0 (d0) σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Εθνικού Ινστιτούτου Καρκίνου των ΗΠΑ (NCI) [210]. Στο δεύτερο πειραματικό μοντέλο, σε θηλυκούς επίμυες BALB/c ενοφθαλμίστηκαν υποδοριώς  $1 \times 10^6$  καρκινικά κύτταρα μαστού 4T1, τα οποία ελήφθησαν από το ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA). Και στις δύο περιπτώσεις ο ενοφθαλμισμός έγινε στην αριστερή βουβωνική περιοχή και τα πειραματόζωα ήταν ηλικίας 6-8 εβδομάδων [211].

## **2.6 Πρωτόκολλο πειραματικής μελέτης**

Τα πειράματα ξεκίνησαν την ημέρα 0 (d0) με τον υποδόριο ενοφθαλμισμό των κυττάρων στα πειραματόζωα. Δείγματα ούρων ελήφθησαν από τους επίμυες τις ημέρες 1, 7, 14 και 28. Στα δείγματα των ούρων, μετά τη φυγοκέντρηση και τη μονιμοποίηση, έγινε χρώση κατά Παπανικολάου. Την ημέρα 14 (d14) τα μισά πειραματόζωα θυσιάστηκαν και οι νεφροί, τα επινεφρίδια και οι ουροδόχοι κύστες αφαιρέθηκαν. Σε ιστολογικές τομές των οργάνων αυτών έγινε χρώση αιματοξυλίνης-ηωσίνης και εξετάστηκαν για παρουσία μεταστάσεων. Τα όργανα των υπόλοιπων πειραματόζωων επίσης εξετάστηκαν για μεταστάσεις μετά τη θυσία τους την ημέρα 28 (d28). Η μικροσκόπηση της κυτταρολογικής και της παθολογοανατομικής μελέτης έγινε σε μεγέθυνση x10, x20 και x40. Η πειραματική μελέτη φαίνεται και στη σχηματική παράσταση 2.6.1.



Εικόνα 2.6.1: Σχηματική παράσταση πειραματικής μελέτης

## 2.7 Στατιστική ανάλυση

Το Pearson chi-square test ( $\chi^2$ ) χρησιμοποιήθηκε για τη στατιστική ανάλυση και τη διερεύνηση πιθανών συσχετίσεων μεταξύ της θετικότητας της κυτταρολογικής ούρων και διάφορων κλινικο-παθολογικών παραμέτρων. Το p logrank test χρησιμοποιήθηκε και για τη διερεύνηση της συσχέτισης του φαινομένου με την επιβίωση και την ανταπόκριση στη θεραπεία. Ως ολική επιβίωση ορίστηκε το χρονικό διάστημα μεταξύ της έναρξης της θεραπείας και το θάνατο από κάθε αίτιο ή την ημερομηνία της τελευταίας εξέτασης (last follow up). Η πιθανή συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των χημειοκινών CXCR4 και CCL21 και της θετικότητας της κυτταρολογικής μελετήθηκε με το Fisher's exact test. Τιμές  $p < 0.05$  θεωρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές.

## Αποτελέσματα

### 3. Συχνότητα εμφάνισης του φαινομένου

#### 3.1 Συχνότητα εμφάνισης στους ασθενείς με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα

Μεταξύ των 122 ασθενών με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, θετική κυτταρολογική ούρων ανιχνεύθηκε σε 13 δηλαδή σε ποσοστό 11% των ασθενών που εξετάστηκαν. Εκ των 13 αυτών ασθενών, οι δέκα ήταν άνδρες και οι τρεις ήταν γυναίκες, δηλαδή το φαινόμενο εμφανίστηκε στο 12% των ανδρών (10/82) και στο 7.5% των γυναικών (3/40). Το 11% των ασθενών (12/106) είχε καλή κατάσταση ικανότητας (PS 0-1) ενώ το 6% των ασθενών (1/106) είχε μέτρια ή κακή κατάσταση ικανότητας (PS 2-4). Θετική κυτταρολογική ούρων εμφανίστηκε στο 10% των ασθενών με αδenoκαρκίνωμα (5/50), στο 12% των ασθενών με πλακώδες καρκίνωμα (5/41), στο 22% των ασθενών με αδιαφοροποίητο (2/9) και στο 4.5% των ασθενών αγνώστου ιστολογίας (1/22).

Όσον αφορά την κατανομή με βάση το στάδιο της νόσου, το σύνολο των ασθενών με θετική κυτταρολογική ούρων εμφάνιζε προχωρημένη/μεταστατική νόσο (13/84, 15%). Ουδείς εκ των ασθενών με πρώιμη νόσο δεν εμφάνισε το φαινόμενο (0/38, 0%). Οι ασθενείς με μονήρη μεταστατική εστία και οι ασθενείς με πολλαπλές μεταστατικές εστίες εμφάνισαν το φαινόμενο στην ίδια συχνότητα. Το 15.5% των ασθενών με μονήρη εστία (7/45) και το 15.3% των ασθενών με πολλαπλές μεταστατικές (6/39) είχαν θετική κυτταρολογική. Η παρουσία επινεφριδικών ή νεφρικών μεταστάσεων δεν επηρέασε την εμφάνιση του φαινομένου αφού κανείς εκ των ασθενών με τέτοιες μεταστάσεις δεν εμφάνισε το φαινόμενο (0/9). Μόνο το 8% των ασθενών με επηρεασμένη νεφρική λειτουργία (2/24) εμφάνισε θετική κυτταρολογική ούρων ενώ οι υπόλοιποι είχαν φυσιολογική νεφρική λειτουργία. Ουδείς εκ των ασθενών που παρουσίασε το φαινόμενο είχε παθολογική γενική ούρων, αντίθετα όλοι είχαν φυσιολογική γενική εξέταση ούρων.

Το 22% των ασθενών που υποβάλλονταν τη στιγμή της διάγνωσης σε τρίτης γραμμής χημειοθεραπεία (2/9), το 17% εκείνων που υποβάλλονταν σε δεύτερης γραμμής (6/34) και το 7.5% εκείνων που υποβάλλονταν σε πρώτης γραμμής (5/66) εμφάνισαν το φαινόμενο. Κανένας από τους ασθενείς που δεν είχε λάβει θεραπεία ή που βρίσκονταν σε υποστηρικτική αγωγή (BSC) δεν εμφάνισε θετική κυτταρολογική. Το 20% (8/40) των ασθενών που είχαν λάβει πλατινούχο σκεύασμα παλαιότερα και το 9% (5/56) εκείνων που ελάμβαναν τέτοιο σκεύασμα τη στιγμή λήψης των δειγμάτων εμφάνισε το φαινόμενο.

Συνοπτικά τα αποτελέσματα για το μη-μικροκυτταρικό καρκίνο φαίνονται στον πίνακα 3.1.

<b>Ασθενείς με NSCLC</b>	<b>Θετική Κυτταρολογική Ούρων</b>
N	13/122 (11%)
<u>Φύλο</u> Άρρεν Θήλυ	10/82 (12%) 3/40 (7.5%)
<u>Κατάσταση Ικανότητας</u> 0-1 2-4	12/106 (11%) 1/16 (6%)
<u>Ιστολογικός Τύπος</u> Αδενοκαρκίνωμα Πλακώδες Αδιαφοροποίητο Άγνωστο	5/50 (10%) 5/41 (12%) 2/9 (22%) 1/22 (4.5%)
<u>Στάδιο</u> Πρώμο Προχωρημένο/Μεταστατικό	0/38 13/84 (15%)
<u>Αριθμός Μεταστατικών Εστιών</u> Μονήρης Πολλαπλές	7/45 (15.5%) 6/39 (15.3%)
<u>Παρουσία μεταστάσεων</u> Επινεφρικών Νεφρικών	0/8 0/1
<u>Χημειοθεραπεία</u> Καμία 1 <sup>η</sup> Γραμμή 2 <sup>η</sup> Γραμμή 3 <sup>η</sup> Γραμμή Υποστήριξη	0/11 5/66 (7.5%) 6/34 (17%) 2/9 (22%) 0/2
<u>Πλατινούχα Θεραπεία</u> Στο παρελθόν Κατά τη περίοδο λήψης των ούρων	8/40 (20%) 5/56 (9%)
<u>Νεφρική Λειτουργία</u> Φυσιολογική Επηρεασμένη  Φυσιολογική Γεν. Ούρων Παθολογική Γεν. Ούρων	11/98 (11%) 2/24 (8%)  13/104 (12.5%) 0/18

**Πίνακας 3.1:** Κλινικο-παθολογικά χαρακτηριστικά ασθενών με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο και θετική κυτταρολογική ούρων

### **3.2 Συχνότητα εμφάνισης στους ασθενείς με μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα**

Μεταξύ των 28 ασθενών με μικροκυτταρικό καρκίνωμα που συμμετείχαν στη μελέτη, οι δύο εμφάνισαν θετική κυτταρολογική ούρων (2/28, 7%). Αμφότεροι οι ασθενείς ήταν άνδρες (2/20, 10%) και είχαν καλή κατάσταση ικανότητας (PS 0-1). Το στάδιο νόσου ήταν εκτεταμένο και στους δύο ασθενείς δηλαδή το 12.5% (2/16) των ασθενών με εκτεταμένη νόσο εμφάνισε το φαινόμενο. Ο ένας ασθενής είχε μονήρη μεταστατική εστία στο ήπαρ και ο δεύτερος πολλαπλές οστικές και ηπατικές και επινεφριδική. Όσον αφορά τις θεραπείες, αμφότεροι ελάμβαναν πρώτης γραμμής χημειοθεραπεία με καρμποπλατίνα και ετοποσίδη την περίοδο λήψης των δειγμάτων. Η νεφρική λειτουργία ήταν επηρεασμένη στον έναν ασθενή (προνεφρική αζωθαιμία) αλλά η γενική ούρων ήταν φυσιολογική και στους δύο ασθενείς. Τα κλινικο-παθολογικά χαρακτηριστικά των ασθενών με μικροκυτταρικό καρκίνωμα που εμφάνισαν θετική κυτταρολογική ούρων φαίνονται στον πίνακα 3.2.

<b>Ασθενείς με SCLC</b>	<b>Θετική Κυτταρολογική Ούρων</b>
N	2/28 (7%)
Φύλο Άρρεν Θήλυ	2/20 (10%) 0/8
<u>Κατάσταση Ικανότητας</u> 0-1 2-4	2/27 (7%) 0/1
<u>Στάδιο</u> Περιορισμένο Εκτεταμένο	0/12 2/16 (12.5%)
<u>Αριθμός Μεταστατικών Εστιών</u> Μονήρης Πολλαπλές	1/6 (16.6%) 1/10(10%)
<u>Παρουσία μεταστάσεων</u> Επινεφρικών Νεφρικών	1/4 (25%)
<u>Χημειοθεραπεία</u> Καμία 1 <sup>η</sup> Γραμμή 2 <sup>η</sup> Γραμμή 3 <sup>η</sup> Γραμμή Υποστήριξη	0/3 2/17 (12%) 0/8
<u>Πλατινούχα Θεραπεία</u> Στο παρελθόν Κατά τη περίοδο λήψης των ούρων	0/8 2/17 (12%)
<u>Νεφρική Λειτουργία</u> Φυσιολογική Επηρεασμένη  Φυσιολογική Γεν. Ούρων Παθολογική Γεν. Ούρων	1/24 (4%) 1/4 (25%)  2/19 (10.5%) 0/9

**Πίνακας 3.2.1:** Κλινικο-παθολογικά χαρακτηριστικά ασθενών με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο και θετική κυτταρολογική ούρων



### 3.3 Συχνότητα εμφάνισης του φαινομένου στους ασθενείς της ομάδας ελέγχου

Το φαινόμενο δεν παρατηρήθηκε σε κανέναν από τους ασθενείς της ομάδας ελέγχου με μεταστατικό καρκίνο του μαστού ή παχέος εντέρου. Τα ίδια αρνητικά αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στην ομάδα ελέγχου με σταδίου IV μη-Hodgkin's λέμφωμα που μελετήσαμε (πίνακας 3.3).

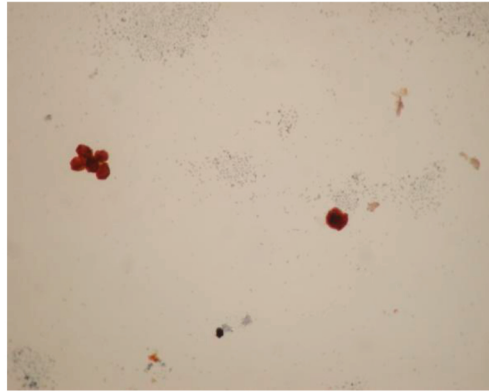
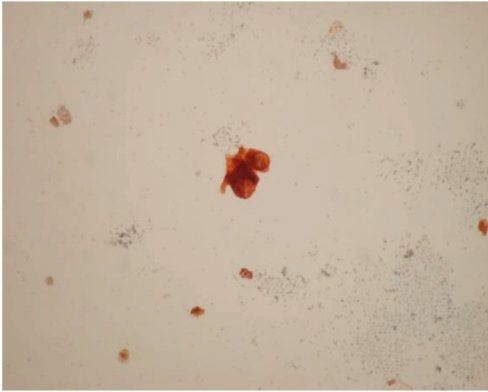
Ομάδα Ελέγχου	Ασθενείς με Ca μαστού	Ασθενείς με Ca παχέος	Ασθενείς με μη-Hodgkin's λέμφωμα
Θετική Κυτταρολογική Ούρων	0/15	0/15	0/15

**Πίνακας 3.3:** Αποτελέσματα κυτταρολογικής εξέτασης ούρων στους ασθενείς της ομάδας ελέγχου

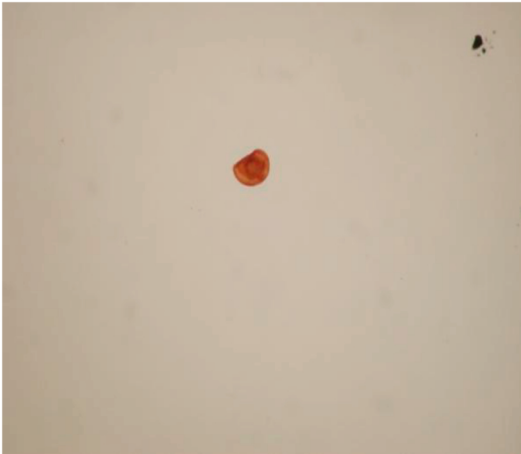
## 4. Ανοσοϊστοχημεία

### 4.1 Ανοσοκυτταροχημική χρώση κυττάρων στα ούρα

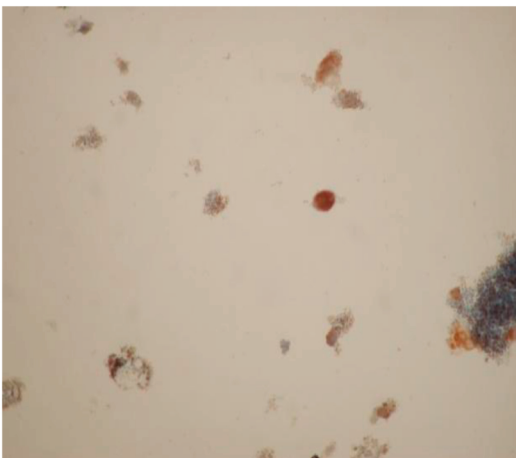
Μια πρώτη σημαντική παρατήρηση της μελέτης ήταν ότι τα κύτταρα που ανευρέθηκαν στα ούρα ήταν πανομοιότυπα μορφολογικά με εκείνα του πρωτοπαθούς όγκου. Στις θετικές κυτταρολογικές, περίπου 10-20 κακοήθη κύτταρα βρέθηκαν στα 20ml ούρων που εξετάστηκαν ανά ασθενή. Για να επιβεβαιωθεί η προέλευση των κυττάρων από τον πρωτοπαθή όγκο, διενεργήθηκε ανοσοκυτταροχημική χρώση σε πέντε ασθενείς με αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα και θετική κυτταρολογική ούρων. Επιλέχθηκε η χρώση για κυτοκερατίνη 7 (CK7), κυτοκερατίνη 20 (CK20) και για το θυρεοειδικό μεταγραφικό παράγοντα 1 (Thyroid transcription factor 1, TTF-1). Οι χρώσεις ήταν θετικές και στα πέντε περιστατικά που εξετάστηκαν και επιβεβαίωσαν την ιστογενετική προέλευση των κυττάρων αυτών από το πρωτοπαθές καρκίνωμα του πνεύμονα. Η θετική ανοσοϊστοχημική χρώση για την CK7 και την CK20 φαίνεται στις εικόνες 4.1.1, 4.1.2 και 4.1.3



**Εικόνα 4.1.1:** Θετική CK7 χρώση σε κύτταρα από τα ούρα ασθενούς με αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα.



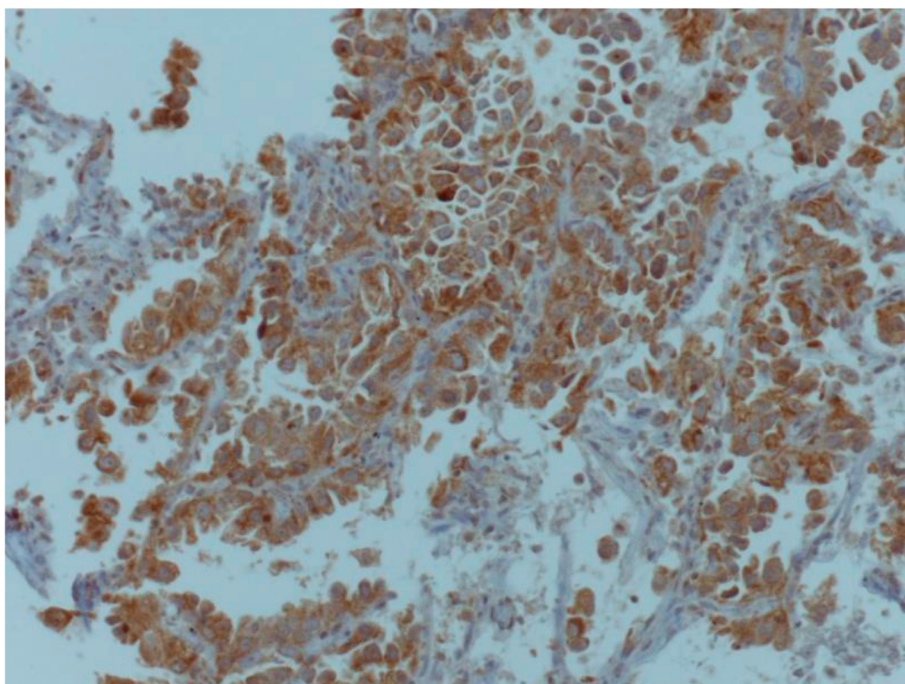
**Εικόνα 4.1.2:** Θετική CK20 χρώση σε κύτταρα από τα ούρα ασθενούς με αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα.



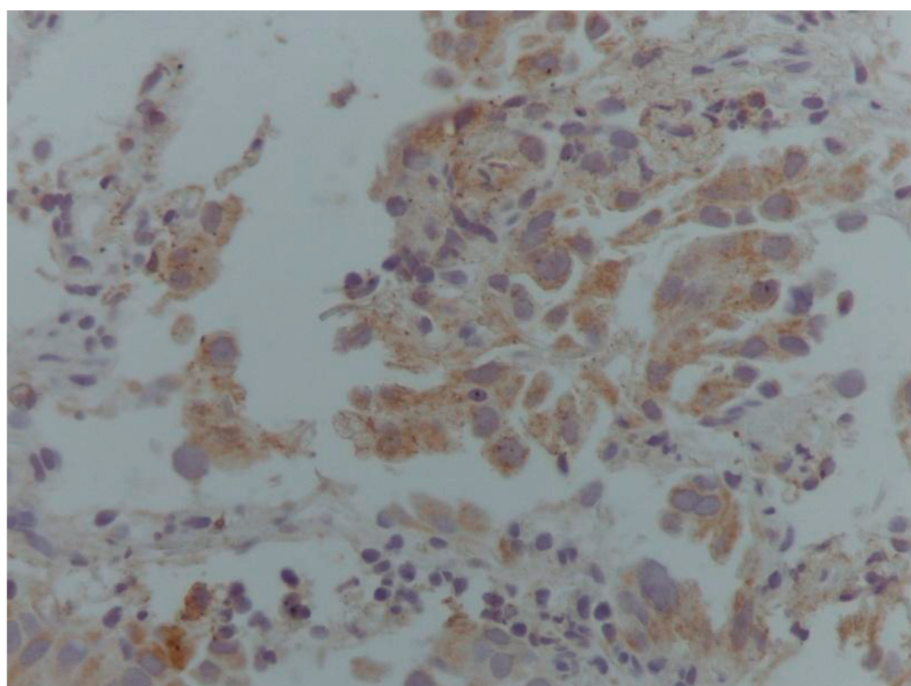
**Εικόνα 4.1.3:** Θετική TTF-1 χρώση σε κύτταρα από τα ούρα ασθενούς με αδενοκαρκίνωμα πνεύμονα.

#### 4.2 Ανοσοϊστοχημική μελέτη χημειοκινών στους πρωτοπαθείς όγκους

Η ανοσοϊστοχημική χρώση του πρωτοπαθούς όγκου για έκφραση των χημειοκινών CXCR4 και CCL21 ήταν εφικτή μόνο για έξι ασθενείς με θετική κυτταρολογική ούρων. Πέντε ασθενείς έπασχαν από μη-μικροκυτταρικό και ένας από μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα. Ως ομάδα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν οι κύβοι παραφίνης των πρωτοπαθών όγκων επτά ασθενών (πέντε με μη-μικροκυτταρικό και δύο με μικροκυτταρικό) αντίστοιχου σταδίου και ιστολογίας αλλά με αρνητική κυτταρολογική ούρων. Η ανοσοϊστοχημεία για CXCR4 ήταν θετική και για τους έξι ασθενείς που εξετάστηκαν και είχαν θετική κυτταρολογική ούρων (100%) ενώ ήταν αρνητική για τους ασθενείς της ομάδας ελέγχου ( $\chi^2$   $p=0.0068$ ). Πέντε εκ των ασθενών αυτών είχαν μέτρια ένταση χρώσης (+2) στον πρωτοπαθή τους όγκο και ένας ισχυρή ένταση χρώσης (+3). Η χρώση για CXCR4 φαίνεται στην εικόνα 4.2.1 Η ανοσοϊστοχημεία του πρωτοπαθούς όγκου για CCL21 κατέδειξε επίσης θετικότητα για το σύνολο των ασθενών που είχαν θετική κυτταρολογική ούρων (100%) ενώ ήταν αρνητική για την ομάδα ελέγχου ( $\chi^2$   $p=0.33$ ). Η ένταση χρώσης για το CCL21 ήταν ισχυρή για τους όγκους δύο ασθενών, μέτρια για τρεις και ασθενής για έναν. Η χρώση για CCL21 φαίνεται στις εικόνες 4.2.1 και 4.2.2. Τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημικής μελέτης των χημειοκινών φαίνονται συγκεντρωτικά στον πίνακα 4.2.3.



**Εικόνα 4.2.1:** Ανοσοϊστοχημική έκφραση του CCL21 σε καρκινικά κύτταρα βιοψίας πνεύμονα (x200)



**Εικόνα 4.2.2:** Ανοσοϊστοχημική έκφραση του CCL21 σε καρκινικά κύτταρα βιοψίας πνεύμονα (x400)

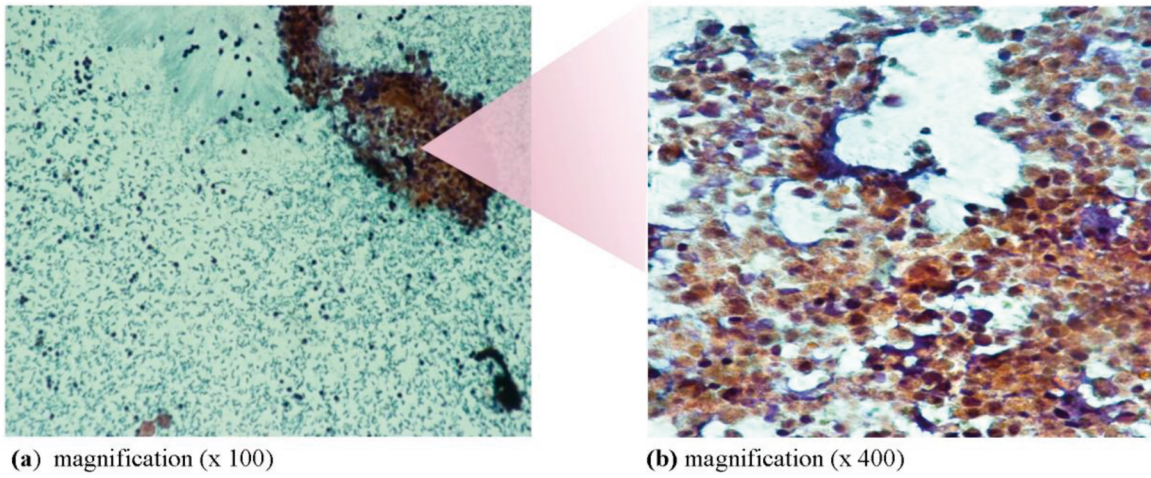
	NSCLC	SCLC
<b>Έκφραση CXCR4 στον πρωτοπαθή όγκο</b>	5/5 (100%)	1/1 (100%)
Ασθενείς με θετική κυτταρολογική ούρων	4/5	1/1
• Ασθενής ένταση χρώσης (+1)	1/5	
• Μέτρια ένταση χρώσης (+2)	0/5 (p=0.008)	0/2 (p=0.33)
• Ισχυρή ένταση χρώσης (+3)		
Ομάδα ελέγχου		
<b>Έκφραση CCL21 στον πρωτοπαθή όγκο</b>	5/5 (100%)	1/1 (100%)
Ασθενείς με θετική κυτταρολογική ούρων	1/5	1/1
• Ασθενής ένταση χρώσης (+1)	2/5	
• Μέτρια ένταση χρώσης (+2)	2/5	
• Ισχυρή ένταση χρώσης (+3)	0/5	0/2 (p=0.33)
Ομάδα ελέγχου		

**Πίνακας 4.2.3:** Ανοσοϊστοχημική έκφραση των CXCR4 και CCL21 στους πρωτοπαθείς όγκους των ασθενών με θετική κυτταρολογική ούρων και στην ομάδα ελέγχου

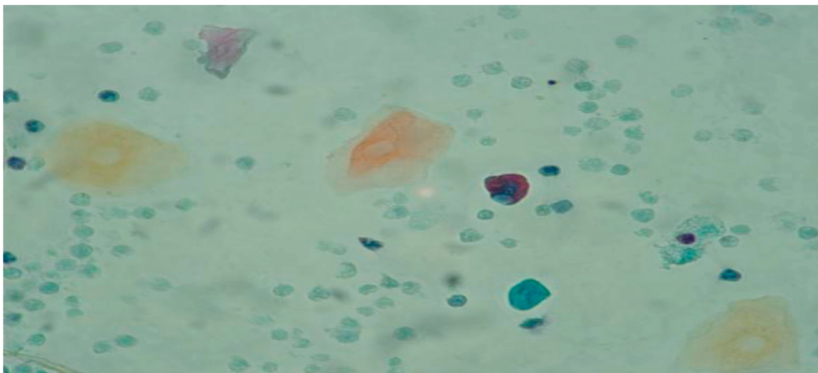
## 5. Πειραματική μελέτη

### 5.1 Κυτταρολογική ούρων

Η μελέτη της κυτταρολογικής εξέτασης ούρων στην ομάδα των πειραματόζωων στα οποία έγινε ενοφθαλμισμός των καρκινικών κυττάρων του πνεύμονα (Lewis lung cancer cells) ήταν θετική. Μεσαίου μεγέθους κακοήθη κύτταρα με άτυπους, υπερχρωματικούς πυρήνες και ανομοιογενή πυρηνική χρωματίνη ανιχνεύθηκαν στο επίχρισμα των ούρων που μελετήθηκε (Εικόνα 5.1.1). Αντίθετα η κυτταρολογική ούρων ήταν αρνητική (Εικόνα 5.1.2) στην ομάδα των πειραματόζωων στα οποία έγινε ενοφθαλμισμός με καρκινικά κύτταρα μαστού (4T1). Τα αποτελέσματα της μελέτης, ανά ημέρα λήψης δείγματος, φαίνονται στον πίνακα 5.1.3.



**Εικόνα 5.1.1:** Κυτταρολογική σύρων σε πειραματόζωα ενοφθαλμισμένα με κύτταρα LLC ( Lewis Lung Cancer) και σε μεγέθυνση x100 και x400.



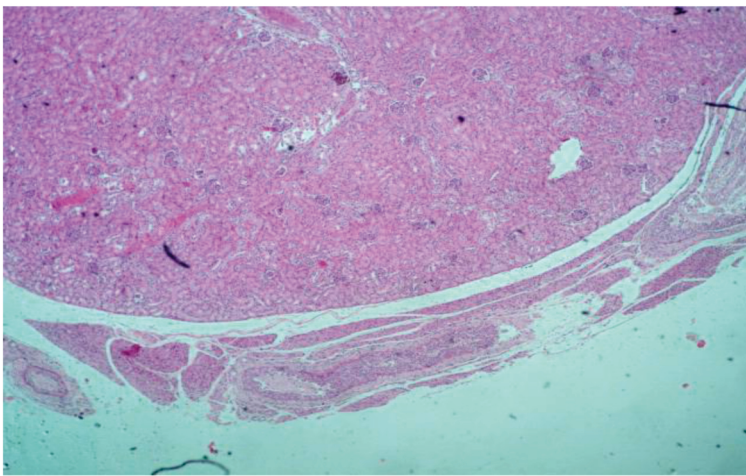
**Εικόνα 5.1.2:** Αρνητική κυτταρολογική σύρων σε 4T1 πειραματόζωα

	<b>Ημέρα 1</b>	<b>Ημέρα 7</b>	<b>Ημέρα 14</b>	<b>Ημέρα 28</b>
<b>Πειραματόζωα Lewis Lung Carcinoma</b>	Αρνητικό (-)	Αρνητικό (-)	Αρνητικό (-)	<b>Θετικό (+)</b>
<b>Πειραματόζωα 4T1</b>	Αρνητικό (-)	Αρνητικό (-)	Αρνητικό (-)	Αρνητικό (-)

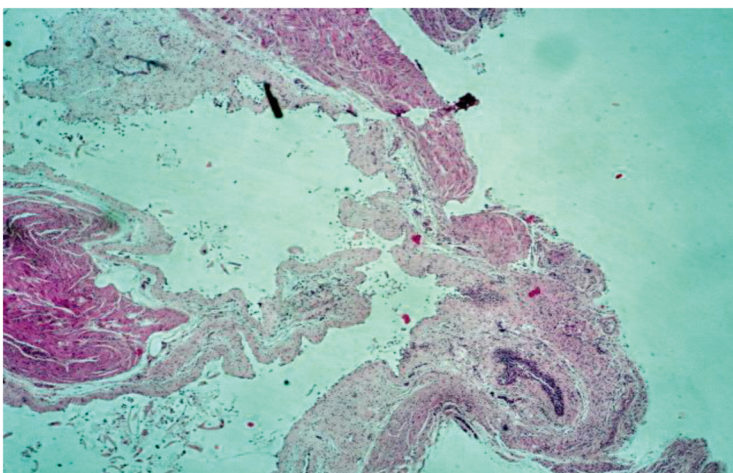
**Πίνακας 5.1.3:** Αποτελέσματα κυτταρολογικής μελέτης των ούρων σε LLC και 4T1 πειραματόζωα

## 5.2 Παθολογοανατομική μελέτη

Η παθολογοανατομική εξέταση των επινεφριδίων, των νεφρών και των ουροδόχων κύστεων δεν κατέδειξε παρουσία μεταστάσεων σε όλα τα πειραματόζωα. Μεταστάσεις δεν ανιχνεύθηκαν ούτε στα LLC πειραματόζωα ούτε στα 4T1 πειραματόζωα (Εικόνες 5.2.1 και 5.2.2). Συμπερασματικά τα καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα (LLC) ανιχνεύθηκαν στην κυτταρολογική εξέταση των ούρων χωρίς να έχουν δώσει μεταστάσεις σε κανένα από τα όργανα που μελετήθηκαν.



**Εικόνα 5.2.1:** Νεφρός και επινεφρίδιο σε LLC πειραματόζωο χωρίς μεταστάσεις (x100)



**Εικόνα 5.2.2:** Ουροδόχος κύστη χωρίς μεταστάσεις σε LLC πειραματόζωο (x100)



## 6. Συσχετίσεις με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους

Στους ασθενείς με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα, η στατιστική ανάλυση των δεδομένων κατέδειξε την συσχέτιση του φαινομένου με μία βασική κλινική παράμετρο: *το στάδιο της νόσου*. Συγκεκριμένα, στατιστικώς σημαντική διαφορά βρέθηκε μεταξύ των ασθενών που είχαν μεταστατική νόσο και εκείνων που δεν είχαν ( $p= 0.01$ ) καθώς το φαινόμενο εμφανίστηκε μόνο στην πρώτη ομάδα ασθενών.

Στους ασθενείς με μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, η στατιστική ανάλυση κατέδειξε συσχέτιση του φαινομένου μόνο με το φορτίο της νόσου, όπως αυτό εκφράζεται από τον αριθμό των μεταστατικών εστιών. Συγκεκριμένα, το φαινόμενο εμφανίστηκε κυρίως στην ομάδα των ασθενών που είχαν περισσότερες της μίας μεταστατικές εστίες ( $p= 0.02$ ).

Δε βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ του φαινομένου και μιας πλειάδας κλινικο-παθολογικών παραμέτρων που μελετήθηκαν. Συγκεκριμένα, δε βρέθηκε συσχέτιση με την ηλικία, το φύλο, την κατάσταση ικανότητας, τον ιστολογικό τύπο, την παρουσία ή όχι επινεφριδικών και νεφρικών μεταστάσεων. Το φαινόμενο επίσης δε φαίνεται να σχετίζεται με την επηρεασμένη νεφρική λειτουργία ή την ύπαρξη παθολογικής γενικής ούρων. Όσον αφορά τη θεραπεία, δε φαίνεται από τη μελέτη μας συσχέτιση με το είδος ή τη γραμμή της θεραπείας.

Οι συσχετίσεις του φαινομένου απεικονίζονται συγκεντρωτικά στον πίνακα 6.1.

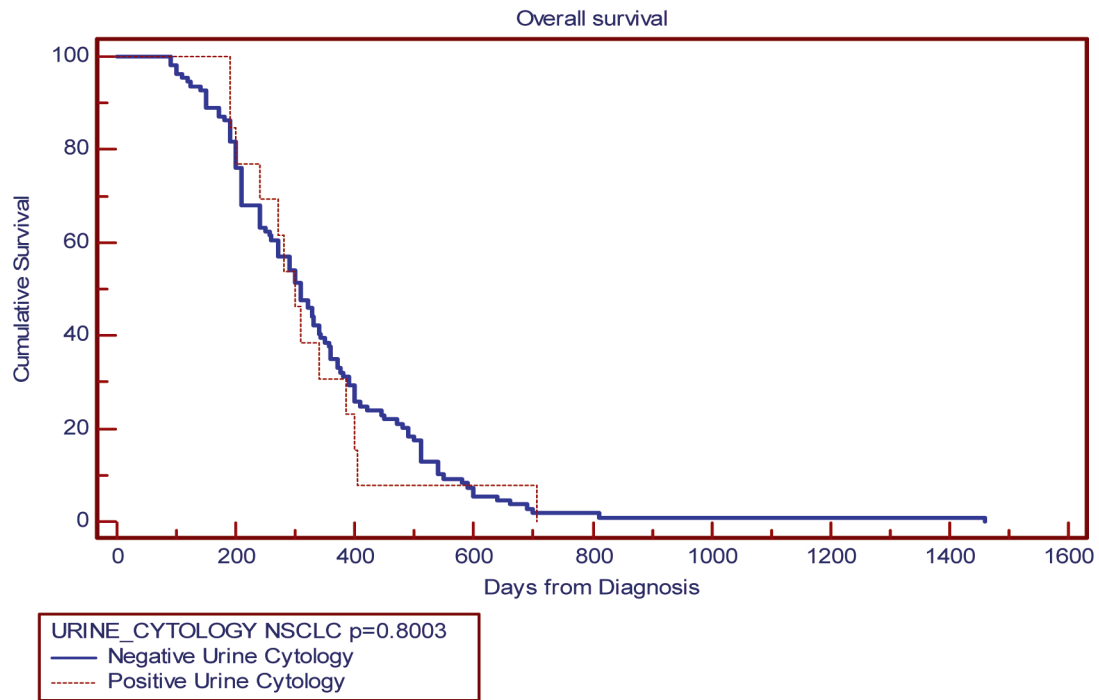
Κλινικές και Παθολογικές Παράμετροι	<u>Θετική Κυτταρολογική Ούρων</u>	
	NSCLC	SCLC
<u>Φύλο</u> Αρρεν Θήλυ	10/82 (12%) 3/40 (7.5%) ( <b>p=0.5</b> )	2/20 (10%) 0/8 ( <b>p=0.35</b> )
<u>Κατάσταση Ικανότητας</u> 0-1 2-4	12/106 (11%) 1/16 (6%) ( <b>p=0.86</b> )	2/27 (7%) 0/1 ( <b>p=0.77</b> )
<u>Ιστολογικός Τύπος</u> Αδενοκαρκίνωμα Πλακώδες Αδιαφοροποίητο Άγνωστο	5/50 (10%) 5/41 (12%) 2/9 (22%) 1/22 (4.5%) ( <b>p=0.53</b> )	
<u>Στάδιο</u> Πρώιμο Προχωρημένο/Μεταστατικό	0/38 13/84 (15%) ( <b>p=0.01</b> )	0/12 2/16 (12.5%) ( <b>p=0.2</b> )
<u>Αριθμός Μεταστατικών Εστιών</u> Μονήρης Πολλαπλές	7/45 (15.5%) 6/39 (15.3%) ( <b>p=0.98</b> )	1/6 (16.6%) 1/10(10%) ( <b>p=0.02</b> )
<u>Παρουσία μεταστάσεων</u> Επινεφριδικών Νεφρικών	0/8 ( <b>p=0.9</b> ) 0/1 ( <b>p=0.9</b> )	1/4 (25%) ( <b>p=0.44</b> )
<u>Χημειοθεραπεία</u> Καμία 1 <sup>η</sup> Γραμμή 2 <sup>η</sup> Γραμμή 3 <sup>η</sup> Γραμμή Υποστήριξη	0/11 5/66 (7.5%) 6/34 (17%) 2/9 (22%) 0/2 ( <b>p=0.09</b> )	0/3 2/17 (12%) ( <b>p=0.5</b> ) 0/8
<u>Πλατινούχα Θεραπεία</u> Στο παρελθόν Κατά τη περίοδο λήψης των ούρων	8/40 (20%) 5/56 (9%) ( <b>p=0.29</b> )	0/8 2/17 (12%) ( <b>p=0.5</b> )
<u>Νεφρική Λειτουργία</u> Φυσιολογική Επηρεασμένη  Φυσιολογική Γεν. Ούρων Παθολογική Γεν. Ούρων	11/98 (11%) 2/24 (8%) ( <b>p=0.96</b> )  13/104 (12.5%) 0/18 ( <b>p=0.112</b> )	1/24 (4%) 1/4 (25%) ( <b>p=0.27</b> )  2/19 (10.5%) 0/9 ( <b>p=0.312</b> )

**Πίνακας 6.1:** Συσχέτιση της θετικής κυτταρολογικής εξέτασης ούρων με διάφορες κλινικο-παθολογικές παραμέτρους

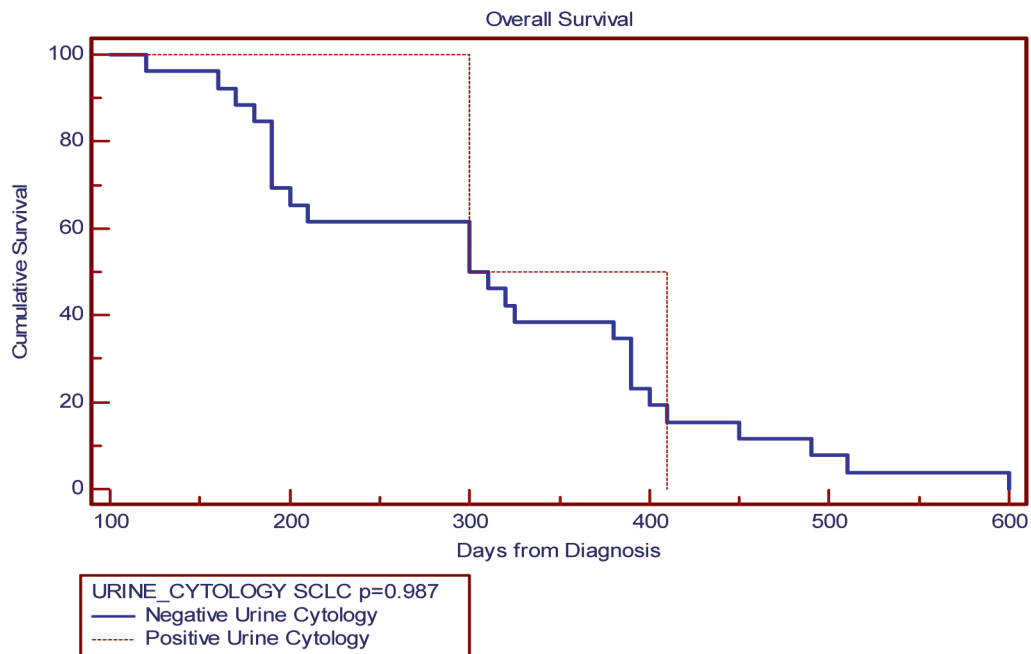
## 7. Προγνωστική και Προβλεπτική σημαντικότητα φαινομένου

Στη μελέτη μας, η θετικότητα της κυτταρολογικής ούρων δε σχετίστηκε με ανταπόκριση στη θεραπεία στους ασθενείς με μη-μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονα (Pearson Chi-Square  $\chi^2$   $p=0.43$ ). Με μέσο χρόνο παρακολούθησης (follow up) των ασθενών τους 15 μήνες, οι ασθενείς με θετική κυτταρολογική ούρων είχαν διάμεση ολική επιβίωση 10.1 μήνες και οι ασθενείς με αρνητική κυτταρολογική 10.3 μήνες ( $\chi^2$   $p=0.8$ ). Οι καμπύλες επιβίωσης στο μη-μικροκυτταρικό καρκίνωμα φαίνονται στην εικόνα 7.1.

Στους ασθενείς με μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονα η θετική κυτταρολογική ούρων επίσης δεν είχε προβλεπτική αξία όσον αφορά την ανταπόκριση στη θεραπεία. Παρά το γεγονός ότι κλινικό όφελος παρατηρήθηκε σε έναν μόνο ασθενή με θετική κυτταρολογική έναντι 12 ασθενών με αρνητική, η διαφορά δεν ήταν στατιστικά σημαντική ( $p=0.98$ ). Με μέσο χρόνο παρακολούθησης τους 13.5 μήνες, οι ασθενείς με θετική κυτταρολογική είχαν διάμεση επιβίωση 11.8 μήνες και οι ασθενείς με αρνητική 10.6 μήνες (Logrank  $p=0.987$ ). Οι καμπύλες επιβίωσης στο μικροκυτταρικό καρκίνωμα φαίνονται στην εικόνα 7.2.



**Εικόνα 7.1 :** Καμπύλες επιβίωσης ασθενών με **μη-μικροκυτταρικό** καρκίνο και θετική ή αρνητική κυτταρολογική ούρων.



**Εικόνα 7.2 :** Καμπύλες επιβίωσης ασθενών με **μικροκυτταρικό** καρκίνο και θετική ή αρνητική κυτταρολογική ούρων.

## ΚΡΙΤΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το φαινόμενο της παρουσίας θετικής κυτταρολογικής ούρων σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα που δεν έχουν εμφανείς μεταστάσεις στο ουροποιητικό δεν είχε περιγραφεί ξανά στη διεθνή βιβλιογραφία και πρωτοπαρουσιάστηκε ως αναφορά πέντε περιστατικών (single center series) από το Τμήμα μας το 2008 [212]. Τα περιστατικά αυτά έδωσαν και το έναυσμα για τη διεξαγωγή της παρούσας μελέτης στην οποία το 11% των ασθενών με μη-μικροκυτταρικό και το 7% εκείνων με μικροκυτταρικό εμφάνισαν θετική κυτταρολογική ούρων. Το φαινόμενο συσχετίστηκε ισχυρά με την ύπαρξη εκτεταμένης/μεταστατικής νόσου όπως και με το μεγάλο φορτίο νόσου. Καμία συσχέτιση με άλλη κλινικο-παθολογική παράμετρο δε βρέθηκε ούτε φάνηκε το φαινόμενο να έχει κάποια προβλεπτική ή προγνωστική σημασία. Η μη παρατήρηση του φαινομένου σε κάποια από τις ομάδες ελέγχου (με καρκίνο παχέος, μαστού ή λεμφώματος) ενισχύει την υπόθεση ότι τα συγκεκριμένα καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα παρουσιάζουν κάποιου είδους «τροπισμό» προς το ουροθήλιο.

Πληθώρα πρωτοπαθών όγκων με μεταστάσεις σε όλες τις πιθανές θέσεις του ουροποιητικού έχουν περιγραφεί ως μεμονωμένα περιστατικά (case reports) ή σε μικρές μελέτες αλλά η πραγματική συχνότητα εμφάνισης του φαινομένου δε μπορεί να υπολογιστεί με ακρίβεια [213-224]. Μια πιθανή εξήγηση για την έλλειψη επαρκών δεδομένων είναι ότι, καθώς οι μεταστάσεις στο ουροθήλιο συνήθως δε δίνουν συμπτώματα, σπάνια γίνεται (στην καθημερινή ιατρική πρακτική) διερεύνηση των ασθενών με καρκίνο για ύπαρξη μεταστάσεων στο ουροποιητικό [225]. Μερικές από τις πιο πλήρεις σειρές ασθενών με μεταστάσεις στο ουροθήλιο περιγράφηκαν τη δεκαετία του 1950 και στηρίχθηκαν σε νεκροτομικά ευρήματα. Για τον καρκίνο του πνεύμονα, οι νεφροί φαίνεται ότι είναι η πιο συχνή θέση μετάστασης μετά το ήπαρ, τα επινεφρίδια, τον εγκέφαλο και τα οστά [226]. Σε νεκροτομικές μελέτες μεμονωμένων κέντρων, ο αριθμός των ασθενών με νεφρικές μεταστάσεις κυμαίνεται από 12 ως 25% [227, 228]. Οι μεταστάσεις συνήθως αναπτύσσονται στο παρέγχυμα και σπάνια στη νεφρική πύελο αλλά το μοντέλο μεταστατικής διασποράς δεν είναι ξεκάθαρο [222]. Παρά την μεγάλη αιματική ροή διαμέσου των νεφρών, η συχνότητα των επινεφριδικών μεταστάσεων είναι μεγαλύτερη γεγονός που μπορεί να υποδηλώνει λεμφική διασπορά της νόσου στα όργανα αυτά [227]. Οι Oniúgbo και συν. περιγράφουν τη φλοιώδη μοίρα των νεφρών ως μία «αφιλόξενη» περιοχή για ανάπτυξη μεταστάσεων ως αποτέλεσμα του όξινου pH, της

υψηλής ωσμωτικής πίεσης, της μεγάλης αιματικής ροής ή της έλλειψης ειδικών μορίων προσκόλλησης [215]. Παρά το γεγονός ότι ο λεπτομερής ακτινολογικός/απεικονιστικός έλεγχος των ασθενών της μελέτης μας δεν ανέδειξε εμφανείς μεταστάσεις στο ουροθήλιο, η ύπαρξη μικροσκοπικών μεταστάσεων σε οποιοδήποτε σημείο του ουροποιητικού δεν μπορεί να αποκλειστεί. Ένας από τους κύριους στόχους της πειραματικής μελέτης μας στο εργαστήριο ήταν να μελετήσουμε την υπόθεση της μικρομεταστατικής νόσου στο ουροθήλιο. Όπως προαναφέρθηκε, δεν ανακαλύφθηκαν μεταστάσεις σε οποιοδήποτε σημείο του ουροποιητικού των πειραματόζων που είχαν θετική κυτταρολογική ούρων. Το εύρημα αυτό πιθανώς υποδηλώνει την ύπαρξη ενός διαφορετικού μηχανισμού εμφάνισης του φαινομένου της θετικής κυτταρολογικής ούρων επί απουσίας εμφανών μεταστάσεων στο ουροθήλιο.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι η ύπαρξη μεταστάσεων εντός του σπειράματος έχει ήδη περιγραφεί στη βιβλιογραφία σε νεκροτομικές μελέτες, η θεωρία της άμεσης προσβολής του νεφρικού σπειράματος από τα νεοπλασματικά κύτταρα δεν μπορεί να αποκλειστεί [229-231]. Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, τα νεοπλασματικά κύτταρα προσβάλλουν άμεσα τα νεφρικά σωληνάκια και το διάμεσο ιστό του νεφρού προκαλώντας δομική βλάβη του σπειράματος και επιτρέποντας τη «διαπίδυση» των κυττάρων στο διήθημα και τελικά στα ούρα. Ένας παρόμοιος μηχανισμός έχει περιγραφεί σε αιματολογικές κακοήθειες όπως τη λευχαιμία, το λέμφωμα και το μυέλωμα [232, 233]. Στις περιπτώσεις αυτές, η παρουσία νεοπλασματικών κυττάρων στα ούρα πιθανώς εξηγείται από τη «διείσδυση» τους, μέσω των νεφρικών σωληναρίων, στο διήθημα και τελικά στα ούρα. Ο βασικός περιορισμός στη θεωρία αυτή είναι ότι δεν έχει αποδειχθεί στην πράξη η ικανότητα «διαπίδυσης» των κυττάρων αυτών. Η διαταραχή της ακεραιότητας του αγγειακού σπειράματος μπορεί επίσης να συμβάλλει στη «διαρροή» των νεοπλασματικών κυττάρων προς το διήθημα. Παρά το γεγονός ότι στη μελέτη μας η γενική εξέταση ούρων ήταν φυσιολογική σε όλους τους ασθενείς με θετική κυτταρολογική, κάποιου βαθμού νεφρική δυσλειτουργία (του τύπου της προνεφρικής αζωθαιμίας) ήταν παρούσα σε δύο ασθενείς. Η θεωρία αυτή στηρίζεται στο γεγονός ότι όλοι αυτοί οι ασθενείς ελάμβαναν ή είχαν λάβει στο παρελθόν θεραπεία με πλατινούχα σκευάσματα που μπορεί να είχαν προκαλέσει υποκλινική νεφρική βλάβη. Παρόλα αυτά, κανένα από τα ευρήματα της γενικής ούρων ή του βιοχημικού-αιματολογικού ελέγχου δεν ήταν προβλεπτικά για την εμφάνιση θετικής κυτταρολογικής

ούρων. Με βάση τα ευρήματά μας, η ήπια νεφρική δυσλειτουργία των ασθενών μας είναι ελάχιστα πιθανό να ευθύνεται για την εμφάνιση των κακοήθων κυττάρων στα ούρα τους.

Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση της πρώτης αναφοράς στην οποία στηρίχθηκε η παρούσα διατριβή [212] ήταν ότι στα τέσσερα από τα πέντε περιστατικά, που είχαν θετική κυτταρολογική ούρων, υπήρχαν επινεφριδικές μεταστάσεις. Στα τρία περιστατικά υπήρχαν αμφοτερόπλευρες μεταστάσεις και σε ένα περιστατικό μόνο αριστερά. Είναι γνωστό από την ανατομία ότι οι νεφροί και επινεφρίδια μοιράζονται μερικώς κοινή αιμάτωση (η κάτω επινεφριδική προέρχεται από τη σύστοιχη νεφρική), γεγονός που θα μπορούσε να δικαιολογεί την εμφάνιση των κυττάρων στα ούρα. Η θεωρία αυτή, αν και ενδιαφέρουσα, δεν μπόρεσε να επιβεβαιωθεί από την παρούσα μελέτη αφού δε βρέθηκε κλινική συσχέτιση μεταξύ της ύπαρξης επινεφριδικών μεταστάσεων και θετικότητας της κυτταρολογικής ούρων.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, το μοντέλο μεταστατικής διασποράς διαφόρων κακοηθειών στους νεφρούς δεν είναι απολύτως ξεκάθαρο. Οι Reinke και συν. προσπαθώντας να εξηγήσουν τη μεταστατική διασπορά του νεφροκυτταρικού καρκινώματος στους πυλαίους λεμφαδένες, διατύπωσαν πριν από 35 χρόνια μια πολύ ενδιαφέρουσα θεωρία στηριζόμενοι σε ανατομικά δεδομένα [234]. Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, νεοπλασματικά έμβολα μπορεί να περάσουν στους παρατραχειακούς και τους βρογχοπνευμονικούς λεμφαδένες μέσω του μείζονος θωρακικού πόρου (ανάποδα δηλαδή από τη φυσιολογική ροή) λόγω ανεπάρκειας των βαλβίδων των λεμφαγγείων. Είναι γνωστό επίσης ότι τα νεφρικά λεμφαγγεία φτάνουν συχνά στο μείζονα θωρακικό πόρο χωρίς πρώτα να περνάνε από τους ενδοκοιλιακούς λεμφαδένες και ότι υπάρχουν λεμφαγγεία που η λέμφος μπορεί κινείται προς οποιαδήποτε κατεύθυνση [235, 236]. Με βάση τα παραπάνω, για τους τέσσερεις ασθενείς με θετική κυτταρολογική και διογκωμένους πυλαίους λεμφαδένες, μπορεί να υποστηριχθεί η υπόθεση της παλινδρόμησης των νεοπλασματικών κυττάρων (μέσω των ανεπαρκών βαλβίδων των λεμφαγγείων) από το μείζονα θωρακικό πόρο και τα νεφρικά λεμφαγγεία στη φλοιώδη μοίρα του νεφρού. Βασικός περιορισμός βέβαια αυτής της θεωρίας είναι και πάλι ότι η διαπίδυση των νεοπλασματικών κυττάρων δεν έχει αποδειχθεί.

Παρά το μικρό αριθμό των ασθενών στους πρωτοπαθείς όγκους των οποίων μελετήθηκε η έκφραση των χημειοκινών CXCR4 και CCL21, τα αποτελέσματα ήταν ιδιαίτερα ενδιαφέροντα. Η έκφραση CXCR4 και CCL21 περιορίστηκε αποκλειστικά σε

εκείνους τους ασθενείς που είχαν θετική κυτταρολογική ούρων και όχι στην ομάδα ελέγχου. Η θεωρία «σπόρου - εδάφους», όπως διατυπώθηκε από τον Stephen Paget στα 1889, περιγράφει τη διαδικασία της μετάστασης όχι ως τυχαίο γεγονός αλλά ως αποτέλεσμα μιας ειδικής συνάφειας μεταξύ συγκεκριμένων καρκινικών κυττάρων («σπόρος») και συγκεκριμένων οργάνων («έδαφος»). Η θεωρία του Paget, που επικρίθηκε ιδιαίτερα στην εποχή της, επιβεβαιώθηκε έναν αιώνα αργότερα μετά από εκτεταμένες έρευνες στο χώρο των χημειοκινών [237, 238]. Οι χημειοκίνες αποτελούν μια μεγάλη οικογένεια κυτταροκινών με χαρακτηριστική κοινή ιδιότητα την ικανότητα να προκαλούν χημειοταξία των κυττάρων που φέρουν τους υποδοχείς τους [239, 240]. Ανάλογα με τη δομή του μορίου τους κατατάσσονται σε 4 οικογένειες:

- C χημειοκίνες (ένας δισουλφιδικός δεσμός μεταξύ κυστεϊνών)
- CC χημειοκίνες (δύο δισουλφιδικοί δεσμοί μεταξύ κυστεϊνών)
- CXC χημειοκίνες (δύο δισουλφιδικοί δεσμοί μεταξύ κυστεϊνών, μεταξύ των γειτονικών καταλοίπων παρεμβάλλεται κατάλοιπο διαφορετικού αμινοξέος)
- CX3C χημειοκίνες (δύο δισουλφιδικοί δεσμοί μεταξύ κυστεϊνών, μεταξύ των γειτονικών καταλοίπων παρεμβάλλονται 3 κατάλοιπα διαφορετικού αμινοξέος)

Πολύ σημαντικό ρόλο παίζουν οι χημειοκίνες στη φλεγμονή και στον καρκίνο. Η εισβολή των νεοπλασματικών κυττάρων τόσο μέσα στο μικροπεριβάλλον του όγκου όσο και στις μεταστατικές θέσεις γίνεται με τη μεσολάβηση των χημειοκινών, με μηχανισμούς ανάλογους της χημειοταξίας των λευκοκυττάρων στη φλεγμονή [241]. Ο CXCR4 είναι ο σημαντικότερος υποδοχέας χημειοκινών που εκφράζεται στα καρκινικά κύτταρα [238, 241-246]. Υπερέκφραση του συγκεκριμένου υποδοχέα σχετίζεται με αυξημένο μεταστατικό δυναμικό του μη-μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα στους επιχώριους λεμφαδένες και σε απομακρυσμένα όργανα [247, 248]. Ο CXCR4 παίζει επίσης πολύ σημαντικό ρόλο στη μετανάστευση, στην εισβολή και στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε πληθώρα νεοπλασιών (πνεύμονα, μαστού, προστάτη, γαστρικού, παχέος, μελανώματος) τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* και σχετίζεται με επιθετικότητα της νόσου [238, 249, 250]. Τα κακοήθη κύτταρα που εκφράζουν το συγκεκριμένο υποδοχέα παρουσιάζουν τροπισμό για μεταστάσεις σε ιστούς που εκφράζουν τις λιγάνδες /συνδέτες τους. Οι λιγάνδες του CXCR4 εκφράζονται σε διάφορους ιστούς, μεταξύ των οποίων και



στο ουροθήλιο [209]. Στη μελέτη μας, CXCR4 εξέφραζαν μόνο οι πρωτοπαθείς όγκοι ασθενών με θετική κυτταρολογική ούρων και όχι οι ομάδες ελέγχου (ασθενείς με αρνητική κυτταρολογική). Η έκφραση του υποδοχέα αυτού καταδεικνύει το αυξημένο μεταστατικό δυναμικό των όγκων στην ομάδα των ασθενών με θετική κυτταρολογική ούρων.

Η λιγάνδη CCL21, που αναφέρεται και ως SLC (secondary lymphoid tissue chemokine) ή 6CKine ή exodus, συνδέεται στον υποδοχέα CCR7 και η κύρια δράση της είναι να επιστρατεύει τα CCR7(+) T λεμφοκύτταρα, τα NK (natural killers) κύτταρα, τα δενδριτικά κύτταρα και τα T μνημονικά λεμφοκύτταρα [246, 251-255]. Η CCL21/SCL εκφράζεται συστηματικά στα μετατριχοειδή φλεβίδια με υψηλό ενδοθήλιο (HEVs, high endothelial venules) των λεμφαδένων, στις πλάκες του Peyer's, στο θύμο και στο σπλήνα [254, 256]. Η συγκεκριμένη λιγάνδη παρουσιάζει πολύ μεγάλη συγγένεια/συνάφεια με τον υποδοχέα CCR7 που συναντάται σε πολλούς υπότυπους T λεμφοκυττάρων και δενδριτικών κυττάρων [251, 257-261]. Στον άνθρωπο, η CCR7 εκφράζεται επίσης στα μεσαγγειακά κύτταρα του νεφρού όπως επίσης και στο φυσιολογικό επιθήλιο της ουροδόχου κύστης [209, 262]. Στη μελέτη μας, η έκφραση της CCL21 στους πρωτοπαθείς όγκους συνδυάστηκε με θετική κυτταρολογική ούρων. Με βάση τα προαναφερθέντα, ο τροπισμός των νεοπλασματικών αυτών κυττάρων προς το ουροθήλιο, που εκφράζεται και ως θετική κυτταρολογική ούρων, μπορεί να δικαιολογηθεί με βάση τον άξονα CCL21 όγκου /CCR7 ουροθηλίου.

Σημαντικά δεδομένα υπάρχουν και έχουν περιγραφεί στη διεθνή βιβλιογραφία τα τελευταία χρόνια σχετικά με τη CCL21/CCR7 χημειοταξία σε άλλους όγκους. Κοινό εύρημα των μελετών αυτών, που στηρίζονται κυρίως σε μικρές *in vitro* και *in vivo* μελέτες, είναι η αυξημένη συχνότητα λεμφαδενικών μεταστάσεων και η πτωχή πρόγνωση σε όγκους που εκφράζουν τον CCR7. Η συγκεκριμένη κλινική παρατήρηση είναι αναμενόμενη αφού είναι γνωστό ότι ο άξονας CCR7/CCL21 χρησιμοποιείται για την κινητοποίηση και τη μετανάστευση των λεμφοκυττάρων και των δενδριτικών κυττάρων στους λεμφαδένες. Στον καρκίνο του μαστού, η έκφραση του CCR7 σχετίζεται με χειρότερη πρόγνωση και αυξημένο μεταστατικό δυναμικό ενώ οι ιστοί που εκφράζουν τη λιγάνδη του (CCL21) αποτελούν και τις πρώτες θέσεις μετάστασης [238, 263]. Η έκφραση του CCR7 στα καρκινικά κύτταρα του μαστού μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως προβλεπτικός βιοδείκτης για ανάπτυξη μεταστάσεων στους επιχώριους λεμφαδένες ή το δέρμα ακόμα και σε πρώιμα στάδια της νόσου [263, 264]. Το κακόηθες μελάνωμα

υπερεκφράζει τον υποδοχέα CCR7, όπως και τον υποδοχέα CXCR4, και παρουσιάζει αυξημένο μεταστατικό δυναμικό προς το δέρμα και τους λεμφαδένες [238]. Στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας, στο γαστρικό καρκίνο και τον κολοορθικό καρκίνο αυξημένη έκφραση του CCR7 σχετίζεται με αυξημένα ποσοστά λεμφαδενικών μεταστάσεων και πτωχή πρόγνωση [265-268]. Πρόσφατη μελέτη σε 30 ασθενείς με καρκίνο του παγκρέατος έδειξε ότι άξονας CCR7/CCL21 συμμετέχει στην επιδείνωση της νόσου πιθανόν μέσω αυξημένης αγγειογένεσης και λεμφαγγειογένεσης [269]. Θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι η συμπεριφορά κάθε όγκου επηρεάζεται όχι μόνο από τα δικά του μοναδικά χαρακτηριστικά χημειοταξίας αλλά και από ποικίλα ορμονικά ερεθίσματα, όπως επίσης και από το μικροπεριβάλλον στις πιθανές μεταστατικές θέσεις («έδαφος»).

Οι χημειοκίνες αποτελούν τα τελευταία χρόνια πεδίο έρευνας για ανάπτυξη νέων φαρμάκων. Θεωρητικά, ο αποκλεισμός του άξονα CCR7/CCL21 μπορεί να μειώσει το μεταστατικό δυναμικό των όγκων που εκφράζουν αυτές τις χημειοκίνες. Στην αιματολογία, ο φαρμακευτικός χειρισμός του υποδοχέα CXCR4 χρησιμοποιείται για την κινητοποίηση αρχέγονων προγονικών κυττάρων στη θεραπεία του πολλαπλού μυελώματος και του μη-Hodgkin's λεμφώματος. Ανταγωνιστές του CXCR4 (όπως το AMD3100 και το ανάλογο του T140) για την αντιμετώπιση του μικροκυτταρικού και του μη-μικροκυτταρικού καρκίνου βρίσκονται υπό ανάπτυξη από τη φαρμακευτική βιομηχανία, αφού ο συγκεκριμένος υποδοχέας και οι λιγάνδες του αποτελούν πολύ ενδιαφέροντες στόχους και τα αποτελέσματα είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικά [270, 271]. Μεγάλη εμπειρία υπάρχει από τη χρήση ανταγωνιστών του CXCR4 στην αντιμετώπιση του HIV/AIDS με πολύ καλά αποτελέσματα.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Περιγράψαμε, για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία και σε μια μεγάλη προοπτική μελέτη, το φαινόμενο της θετικής κυτταρολογικής σύρων σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα χωρίς εμφανείς μεταστάσεις στο ουροποιητικό. Μελετήσαμε τη συσχέτιση του φαινομένου με διάφορες κλινικές και παθολογοανατομικές παραμέτρους και ανακαλύψαμε τη συσχέτισή του με τη μεταστατική/εκτεταμένη νόσο και το μεγάλο νεοπλασματικό φορτίο. Δε μπορέσαμε στη συγκεκριμένη μελέτη να συνδέσουμε το φαινόμενο με κάποια προγνωστική αξία για την επιβίωση ούτε με προβλεπτική αξία για ανταπόκριση στη θεραπεία. Ο τροπισμός των κυττάρων προς το ουροθήλιο δεν είναι απολύτως ξεκάθαρος αλλά φαίνεται ότι μπορεί να σχετίζεται με την χημειοταξία μέσω του άξονα CCR7/CCL21 ή του υποδοχέα CXCR4, με το συνδυασμό χημειοταξίας και διήθησης του σπειράματος από τα καρκινικά κύτταρα, με την αιματογενή μικρομεταστατική νόσο ή με το συνδυασμό των παραπάνω.

Περιορισμός της μελέτης μας ήταν η λιγότερο εκτενής μελέτη της υπόθεσης περί ύπαρξης μικρομεταστατικής νόσου στην ουροδόχο κύστη. Για τον καρκίνο του πνεύμονα, η ουροδόχος κύστη είναι η δεύτερη πιο συχνή θέση μετάστασης στο ουροποιητικό μετά τους νεφρούς αλλά η ακριβής συχνότητα δεν είναι γνωστή [272-274]. Όπως ήδη αναφέρθηκε, ο αριθμός των ασθενών που έδωσαν γραπτή συγκατάθεση για να υποβληθούν σε κυστεοσκόπηση με λήψη τυφλών βιοψιών ήταν πολύ μικρός και τα δεδομένα που καταφέραμε να συλλέξουμε δεν είναι πολλά. Από την άλλη πλευρά όμως, μελετήσαμε το φαινόμενο εκτενώς κατά την πειραματική μας μελέτη στους επίμυες. Τα καρκινικά κύτταρα LLC του πνεύμονα, παρά το γεγονός ότι ανιχνεύθηκαν στα ούρα των πειραματόζων, δεν είχαν αναπτύξει μεταστάσεις στην ουροδόχο κύστη ή τους νεφρούς. Αντίθετα, τα κύτταρα από τον καρκίνο του μαστού 4T1 δεν ανιχνεύθηκαν στα ούρα των πειραματόζων. Τα αποτελέσματα και τα συμπεράσματα φυσικά των πειραματικών μελετών σε επίμυες δε μπορούν αυτούσια και αυτόματα να μεταφερθούν στον άνθρωπο, δίνουν όμως πολύ ενδιαφέρουσες πληροφορίες για την παθοφυσιολογία της νόσου. Η μελέτη των χημειοκινών CXCR4 και CCL21 έδωσε κάποια σημαντικά δεδομένα για την πιθανή εξήγηση του φαινομένου και συμβαδίζει χρονικά και επιστημονικά με τη γενικότερη έρευνα που διεξάγεται παγκοσμίως στον τομέα των χημειοκινών για την ανάπτυξη νέων, στοχεύουσων θεραπειών.



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

**Υπόβαθρο:** Η εμφάνιση θετικής κυτταρολογικής εξέτασης ούρων σε ασθενείς με κακοήθειες του ουροποιητικού ή σε παρουσία μεταστάσεων στο ουροποιητικό είναι αναμενόμενη και έχει περιγραφεί εκτενώς στη διεθνή βιβλιογραφία. Αντίθετα, η θετική κυτταρολογική ούρων είναι μη αναμενόμενη επί απουσίας εμφανών μεταστάσεων στο ουροποιητικό ή άλλων κακοηθειών εκτός ουροποιητικού συστήματος. Το φαινόμενο της θετικής κυτταρολογικής ούρων σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα που δεν έχουν εμφανείς μεταστάσεις στο ουροποιητικό δεν είχε ξαναπεριγραφεί στη διεθνή βιβλιογραφία. Σκοπός της μελέτης μας ήταν να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη του φαινομένου, να εκτιμηθεί η συχνότητά του σε ασθενείς με μικροκυτταρικό και μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα όλων των σταδίων καθώς και να διερευνηθεί η πιθανή συσχέτιση με κλινικοπαθολογικές παραμέτρους. Προσπαθήσαμε επίσης να βρούμε αν το εύρημα αυτό έχει κάποια προγνωστική ή προβλεπτική αξία για τους ασθενείς μας όπως επίσης και τους πιθανούς παθογενετικούς μηχανισμούς. Στα πλαίσια διερεύνησης των μηχανισμών αυτών διενεργήθηκε μελέτη του φαινομένου και σε πειραματόζωα.

**Ασθενείς και Μέθοδοι:** Μεταξύ Νοεμβρίου 2007 και Μαρτίου 2009, μελετήθηκαν 150 ασθενείς με πρώιμο και προχωρημένο-μεταστατικό καρκίνο του πνεύμονα. Η μελέτη ήταν προοπτική και οι ασθενείς έπασχαν από μικροκυτταρικό ή μη-μικροκυτταρικό καρκίνωμα πνεύμονα όλων των ιστολογικών τύπων. Εκτός από τους ασθενείς αυτούς, το φαινόμενο μελετήθηκε και σε τρεις ομάδες ασθενών που χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδες ελέγχου. Καθεμία από τις ομάδες αποτελούνταν από 15 ασθενείς. Η πρώτη ομάδα ασθενών έπασχε από μεταστατικό καρκίνο του πνεύμονα, η δεύτερη από μεταστατικό καρκίνο παχέος εντέρου και η τρίτη από σταδίου IV μη-Hodgkin's λέμφωμα. Η κυτταρολογική εξέταση ούρων έγινε σε δείγματα ούρων προερχόμενα από αυτόματη ούρηση των ασθενών. Τρία δείγματα ούρων ελήφθησαν από κάθε ασθενή, ένα ανά ημέρα για τρεις συνεχόμενες ημέρες. Τα δείγματα μελετήθηκαν από τους κυτταρολόγους και, για όσα ανιχνεύτηκαν καρκινικά κύτταρα, ακολούθησε ανοσοϊστοχημική χρώση για κυτοκερατίνες 7 και 20 (CK7 και CK20) καθώς και για τον θυρεοειδικό μεταγραφικό παράγοντα 1 (TTF-1, thyroid transcription factor-1) ώστε να επιβεβαιωθεί η ιστογενετική προέλευση των κυττάρων. Όλοι οι ασθενείς της μελέτης υπεβλήθησαν σε πλήρη αιματολογικό και βιοχημικό έλεγχο καθώς και γενική εξέταση ούρων. Στη συνέχεια μελετήθηκε το προφίλ

των χημειοκινών CXCR4 (chemokine receptor 4) και SLC/CCL21 (secondary lymphoid tissue chemokine) στους πρωτοπαθείς όγκους των ασθενών με θετική κυτταρολογική ούρων. Ως ομάδα ελέγχου χρησιμοποιήθηκαν οι πρωτοπαθείς όγκοι ασθενών του ίδιου σταδίου και του ίδιου ιστολογικού τύπου που είχαν όμως αρνητική κυτταρολογική ούρων. Για την πειραματική μελέτη του φαινομένου χρησιμοποιήθηκαν θηλυκοί και αρσενικοί επίμυες C57Bl/6 καθώς και θηλυκοί BALB/c. Το πείραμα έλαβε χώρα στο Εργαστήριο Πειραματικής Χημειοθεραπείας του νοσοκομείου «Θεαγένειο» στη Θεσσαλονίκη. Στο πρώτο πειραματικό μοντέλο, χρησιμοποιήθηκαν καρκινικά κύτταρα πνεύμονα Lewis Lung Carcinoma (LLC) ενώ στο δεύτερο πειραματικό μοντέλο καρκινικά κύτταρα μαστού 4T1. Τα κύτταρα ενοφθαλμίστηκαν υποδορίως και δείγματα ούρων ελήφθησαν από τους επίμυες τις ημέρες 1, 7, 14 και 28 για να εξεταστούν. Την ημέρα 14 τα μισά πειραματόζωα θυσιάστηκαν και οι νεφροί, τα επινεφρίδια και οι ουροδόχοι κύστες αφαιρέθηκαν και εξετάστηκαν για παρουσία μεταστάσεων. Τα όργανα των υπόλοιπων πειραματόζωων επίσης εξετάστηκαν για μεταστάσεις μετά τη θυσία τους την ημέρα 28.

**Αποτελέσματα:** Μεταξύ των 122 ασθενών με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, θετική κυτταρολογική ούρων ανιχνεύθηκε σε 13 δηλαδή σε ποσοστό 11% των ασθενών που εξετάστηκαν. Μεταξύ των 28 ασθενών με μικροκυτταρικό καρκίνωμα που συμμετείχαν στη μελέτη, οι δύο εμφάνισαν θετική κυτταρολογική ούρων (2/28, 7%). Το φαινόμενο δεν παρατηρήθηκε σε κανέναν από τους ασθενείς της ομάδας ελέγχου με μεταστατικό καρκίνο του μαστού ή παχέος εντέρου. Τα ίδια αρνητικά αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στην ομάδα ελέγχου με σταδίου IV μη-Hodgkin's λέμφωμα. Τα κύτταρα που ανευρέθηκαν στα ούρα ήταν πανομοιότυπα μορφολογικά με εκείνα του πρωτοπαθούς όγκου. Η χρώση για CK7, CK20, TTF-1 ήταν θετικές και στα πέντε περιστατικά που εξετάστηκαν επιβεβαιώνοντας την ιστογενετική προέλευση των κυττάρων. Η ανοσοϊστοχημική χρώση του πρωτοπαθούς όγκου για έκφραση των χημειοκινών CXCR4 και CCL21 ήταν εφικτή μόνο για έξι ασθενείς με θετική κυτταρολογική ούρων και σε μια ομάδα ελέγχου. Η ανοσοϊστοχημεία για CXCR4 ήταν θετική και για τους έξι ασθενείς που εξετάστηκαν και είχαν θετική κυτταρολογική ούρων ενώ ήταν αρνητική για τους ασθενείς της ομάδας ελέγχου ( $\chi^2$  p=0.0068). Η ανοσοϊστοχημεία του πρωτοπαθούς όγκου για CCL21 κατέδειξε επίσης θετικότητα για το σύνολο των ασθενών που είχαν θετική κυτταρολογική ούρων (100%) ενώ ήταν αρνητική

για την ομάδα ελέγχου ( $\chi^2$   $p=0.33$ ). Στους ασθενείς με μη-μικροκυτταρικό καρκίνο πνεύμονα, η στατιστική ανάλυση των δεδομένων κατέδειξε την συσχέτιση του φαινομένου με μία βασική κλινική παράμετρο: *το στάδιο της νόσου*. Συγκεκριμένα, στατιστικώς σημαντική διαφορά βρέθηκε μεταξύ των ασθενών που είχαν μεταστατική νόσο και εκείνων που δεν είχαν ( $p= 0.01$ ) καθώς το φαινόμενο εμφανίστηκε μόνο στην πρώτη ομάδα ασθενών. Στους ασθενείς με μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, η στατιστική ανάλυση κατέδειξε συσχέτιση του φαινομένου μόνο με το φορτίο της νόσου, όπως αυτό εκφράζεται από τον αριθμό των μεταστατικών εστιών. Συγκεκριμένα, το φαινόμενο εμφανίστηκε κυρίως στην ομάδα των ασθενών που είχαν περισσότερες της μίας μεταστατικές εστίες ( $p= 0.02$ ). Δε βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ του φαινομένου και μιας πλειάδας κλινικο-παθολογικών παραμέτρων που μελετήθηκαν. Συγκεκριμένα, δε βρέθηκε συσχέτιση με την ηλικία, το φύλο, την κατάσταση ικανότητας, τον ιστολογικό τύπο, την παρουσία ή όχι επινεφριδικών και νεφρικών μεταστάσεων. Το φαινόμενο επίσης δε φαίνεται να σχετίζεται με την επηρεασμένη νεφρική λειτουργία ή την ύπαρξη παθολογικής γενικής ούρων. Όσον αφορά τη θεραπεία, δε φαίνεται από τη μελέτη μας συσχέτιση με το είδος ή τη γραμμή της θεραπείας. Η μελέτη της κυτταρολογικής εξέτασης ούρων στην ομάδα των πειραματόζων στα οποία έγινε ενοφθαλμισμός των καρκινικών κυττάρων του πνεύμονα (Lewis lung cancer cells) ήταν θετική. Αντίθετα η κυτταρολογική ούρων ήταν αρνητική στην ομάδα των πειραματόζων στα οποία έγινε ενοφθαλμισμός με καρκινικά κύτταρα μαστού (4T1). Η παθολογοανατομική εξέταση των επινεφριδίων, των νεφρών και των ουροδόχων κύστεων δεν κατέδειξε της παρουσία μεταστάσεων σε όλα τα πειραματόζωα. Μεταστάσεις δεν ανιχνεύθηκαν ούτε στα LLC πειραματόζωα ούτε στα 4T1 πειραματόζωα.

**Συμπεράσματα:** Περιγράψαμε, για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία και σε μια μεγάλη προοπτική μελέτη, το φαινόμενο της θετικής κυτταρολογικής ούρων σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα χωρίς εμφανείς μεταστάσεις στο ουροποιητικό. Μελετήσαμε τη συσχέτιση του φαινομένου με διάφορες κλινικές και παθολογοανατομικές παραμέτρους και ανακαλύψαμε τη συσχέτισή του με τη μεταστατική/εκτεταμένη νόσο και το μεγάλο νεοπλασματικό φορτίο. Το φαινόμενο δε φαίνεται να έχει προγνωστική αξία για την επιβίωση, ούτε προβλεπτική αξία για ανταπόκριση στη θεραπεία. Καταφέραμε επίσης να αναπαράγουμε το φαινόμενο στο εργαστήριο και να μελετήσουμε την παθοφυσιολογία του

σε μικρό αριθμό πειραματόζων. Ο τροπισμός των κυττάρων προς το ουροθήλιο δεν είναι απολύτως ξεκάθαρος αλλά από τη μελέτη μας φαίνεται ότι μπορεί να σχετίζεται: 1) με την χημειοταξία μέσω του άξονα CCR7/CCL21 ή του υποδοχέα CXCR4, 2) με το συνδυασμό χημειοταξίας και διήθησης του σπειράματος, των σωληναρίων ή του διάμεσου ιστού από τα καρκινικά κύτταρα, 3) με την αιματογενή μικρομεταστατική νόσο ή και 4) με το συνδυασμό των παραπάνω.



## SUMMARY IN ENGLISH

**Purpose:** Positive urinary cytology in patients with lung cancer, in the absence of obvious urine tract metastases, is an unanticipated phenomenon. To date only few cases have been reported in the medical literature, among which a cohort of five patients from our center recently described. In view of the lack of clinical/pathologic data and absence of research in the pathophysiology of this phenomenon, we decided to study a larger cohort of patients with early and metastatic lung cancer for the presence of occult urothelial seeding. We investigated this rare occurrence using both clinical/translational and experimental approaches. Specifically, we sought to estimate the incidence of this phenomenon in patients with Small (SCLC) and Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC), its correlation with clinicopathologic tumor characteristics, identify its potential predictive and prognostic significance and to elucidate possible pathogenetic mechanisms. We also tried to further enlighten the pathophysiology of occult urothelial metastases by conducting an experimental study in animals injected with cancer cell lines in the laboratory.

**Patients and Methods:** The urinary cytology of 150 patients with early and metastatic non small cell lung cancer (NSCLC) and small cell lung cancer (SCLC), as well as of 3 control groups, was prospectively studied. All patients underwent detailed imaging studies. In positive samples, immunocytochemical (ICC) staining for cytokeratins 7 and 20 (CK7, CK20) and thyroid transcription factor 1 (TTF1) of malignant cells found, was used to confirm histogenetic origin by use of monoclonal antibodies CK7, CK20, TTF1. The chemokine profile of the primary tumor in patients with positive urinary cytology as well as in a histology-matched, stage-matched control group of patients with non-small cell lung cancer and no urinary seeding was assessed by immunostaining for CXC Chemokine Receptor 4 (CXCR4) and for Secondary Lymphoid Tissue Chemokine (SLC/CCL21). The experimental study of the phenomenon was conducted in mice with injection of Lewis Lung Carcinoma (LLC) cells, using a standardized protocol for the detection of cancer cells in urine as well as for the detection of renal, adrenal and bladder metastases. The urine cytology - studies of BALB/c mice with metastatic breast cancer (4T1) was used as control group.

**Results:** Positive urinary cytology was detected in 11% of patients with NSCLC and 7% of patients with SCLC and was not observed in any of the control group patients. The histogenetic origin of the disseminated cells in urine was confirmed with ICC staining. Positive correlation with the advanced stage of disease ( $p=0.01$ ) and high tumor burden ( $p=0.03$ ) was found in patients with NSCLC. In patients with SCLC, positive urinary cytology also correlated with extensive disease ( $p=0.04$ ) and multiple metastatic sites ( $p=0.02$ ). No correlation was found, in either groups, between positive urine cytology and age, gender, histology, performance status (PS), line of chemotherapy, previous platinum-based chemotherapy, adrenal metastases, renal function and presence of abnormal urinary sediment. The phenomenon was not correlated with response to chemotherapy at the time of sampling ( $p=0.6$ ) or overall survival ( $p=0.9$ ). The primary tumors of patients with positive urine cytology showed distinctive chemokine expression, not observed in negative patients. In the experimental study, the lung cancer cells injected in mice did not metastasize to the kidneys, adrenal glands or bladder but were detected their urine cytology and this phenomenon was not observed in the case of mouse mammary cancer model.

**Conclusion:** Although urine cytology has long been a useful tool for the diagnosis of urinary tract cancer as well as for detection of metastases in the urinary tract, the presence of positive urine cytology in patients with lung cancer without obvious urine tract metastases was unexpected and was first described by our study. The possible mechanism of the phenomenon is not clear but could probably be explained by increased tropism of lung cancer cells to the urothelium. Whether the presence of the phenomenon could be explained by chemotaxis through the CCR7/CCL21 or the CXCR4 axes, by a combination of chemotaxis and penetration of the cancer interstitial infiltrate through the renal tubules, by hematogenous micrometastatic disease in any site of the urothelium or a combination of the above, is not clear. The main clinical finding of our study, apart from presenting the phenomenon, is that it seems to characterize only patients with metastatic/extensive disease with high tumor burden. It does not seem to correlate with other clinicopathologic tumor characteristics; neither did it have any predictive or prognostic value for treatment benefit or patient outcome.

## ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ-ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Προφορική Ανακοίνωση: Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας, Αθήνα 2009

Poster: ESMO (European Society of Medical Oncology Congress), 20-24 Σεπ 2009, Βερολίνο, Γερμανία

Δημοσίευση ως Original Research Article σε έγκυρο ιατρικό περιοδικό του Index Medicus με Impact Factor 3.36: *Lung Cancer, Volume 73, Issue 1, July 2011, Pages 51-58*

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2009 Jul-Aug;59(4):225-49.
- [2] Jemal A, Thun MJ, Ries LA, Howe HL, Weir HK, Center MM, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2005, featuring trends in lung cancer, tobacco use, and tobacco control. *Journal of the National Cancer Institute*. 2008 Dec 3;100(23):1672-94.
- [3] Didkowska J, Manczuk M, McNeill A, Powles J, Zatonski W. Lung cancer mortality at ages 35-54 in the European Union: ecological study of evolving tobacco epidemics. *BMJ (Clinical research ed)*. 2005 Jul 23;331(7510):189-91.
- [4] Adler L. Primary malignant growth of the lungs and bronchi. New York, Longmans-Green. 1912.
- [5] Pearl R. Tobacco smoking and longevity. *Science*. 1938;87:216-7.
- [6] R Doll AH. Smoking and carcinoma of the lung; preliminary report. *Br Med J*. 1950;2:739.
- [7] R Doll AH. The mortality of doctors in relation to their smoking habits; a preliminary report. *Br Med J*. 1950;1:1451.
- [8] Doll R, Hill AB. The mortality of doctors in relation to their smoking habits: a preliminary report. 1954. *BMJ (Clinical research ed)*. 2004 Jun 26;328(7455):1529-33; discussion 33.
- [9] Doll R, Peto R, Boreham J, Sutherland I. Mortality in relation to smoking: 50 years' observations on male British doctors. *BMJ (Clinical research ed)*. 2004 Jun 26;328(7455):1519.
- [10] Johnson KC, Repace J. Lung cancer and passive smoking. Turning over the wrong stone. *BMJ (Clinical research ed)*. 2000 Nov 11;321(7270):1221; author reply 2-3.
- [11] Colby TV, Wistuba, II, Gazdar A. Precursors to pulmonary neoplasia. *Advances in anatomic pathology*. 1998 Jul;5(4):205-15.
- [12] Devereux TR, Taylor JA, Barrett JC. Molecular mechanisms of lung cancer. Interaction of environmental and genetic factors. Giles F. Filley Lecture. *Chest*. 1996 Mar;109(3 Suppl):14S-9S.

- [13] Hibi K, Takahashi T, Yamakawa K, Ueda R, Sekido Y, Ariyoshi Y, et al. Three distinct regions involved in 3p deletion in human lung cancer. *Oncogene*. 1992 Mar;7(3):445-9.
- [14] Otterson G, Lin A, Kay F. Genetic etiology of lung cancer. *Oncology (Williston Park, NY)*. 1992 Sep;6(9):97-104, 7; discussion 8, 11-2.
- [15] Hirao T, Nelson HH, Ashok TD, Wain JC, Mark EJ, Christiani DC, et al. Tobacco smoke-induced DNA damage and an early age of smoking initiation induce chromosome loss at 3p21 in lung cancer. *Cancer research*. 2001 Jan 15;61(2):612-5.
- [16] Ohata H, Emi M, Fujiwara Y, Higashino K, Nakagawa K, Futagami R, et al. Deletion mapping of the short arm of chromosome 8 in non-small cell lung carcinoma. *Genes, chromosomes & cancer*. 1993 Jun;7(2):85-8.
- [17] Porter AC, Vaillancourt RR. Tyrosine kinase receptor-activated signal transduction pathways which lead to oncogenesis. *Oncogene*. 1998 Sep 17;17(11 Reviews):1343-52.
- [18] Slebos RJ, Kibbelaar RE, Dalesio O, Kooistra A, Stam J, Meijer CJ, et al. K-ras oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung. *The New England journal of medicine*. 1990 Aug 30;323(9):561-5.
- [19] Kersting M, Friedl C, Kraus A, Behn M, Pankow W, Schuermann M. Differential frequencies of p16(INK4a) promoter hypermethylation, p53 mutation, and K-ras mutation in exfoliative material mark the development of lung cancer in symptomatic chronic smokers. *J Clin Oncol*. 2000 Sep 15;18(18):3221-9.
- [20] Ahrendt SA, Decker PA, Alawi EA, Zhu Yr YR, Sanchez-Cespedes M, Yang SC, et al. Cigarette smoking is strongly associated with mutation of the K-ras gene in patients with primary adenocarcinoma of the lung. *Cancer*. 2001 Sep 15;92(6):1525-30.
- [21] Harada M, Dosaka-Akita H, Miyamoto H, Kuzumaki N, Kawakami Y. Prognostic significance of the expression of ras oncogene product in non-small cell lung cancer. *Cancer*. 1992 Jan 1;69(1):72-7.
- [22] Rosell R, Li S, Skacel Z, Mate JL, Maestre J, Canela M, et al. Prognostic impact of mutated K-ras gene in surgically resected non-small cell lung cancer patients. *Oncogene*. 1993 Sep;8(9):2407-12.
- [23] Huncharek M, Muscat J, Geschwind JF. K-ras oncogene mutation as a prognostic marker in non-small cell lung cancer: a combined analysis of 881 cases. *Carcinogenesis*. 1999 Aug;20(8):1507-10.
- [24] Mitsudomi T, Steinberg SM, Oie HK, Mulshine JL, Phelps R, Viallet J, et al. ras gene mutations in non-small cell lung cancers are associated with shortened survival irrespective of treatment intent. *Cancer research*. 1991 Sep 15;51(18):4999-5002.
- [25] Nelson HH, Christiani DC, Mark EJ, Wiencke JK, Wain JC, Kelsey KT. Implications and prognostic value of K-ras mutation for early-stage lung cancer in women. *Journal of the National Cancer Institute*. 1999 Dec 1;91(23):2032-8.
- [26] Mascaux C, Iannino N, Martin B, Paesmans M, Berghmans T, Dusart M, et al. The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *British journal of cancer*. 2005 Jan 17;92(1):131-9.
- [27] Hirsch FR, Varella-Garcia M, Bunn PA, Jr., Di Maria MV, Veve R, Bremmes RM, et al. Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *J Clin Oncol*. 2003 Oct 15;21(20):3798-807.
- [28] Rusch V, Klimstra D, Venkatraman E, Pisters PW, Langenfeld J, Dmitrovsky E. Overexpression of the epidermal growth factor receptor and its ligand transforming growth

factor alpha is frequent in resectable non-small cell lung cancer but does not predict tumor progression. *Clin Cancer Res.* 1997 Apr;3(4):515-22.

[29] Reissmann PT, Koga H, Figlin RA, Holmes EC, Slamon DJ. Amplification and overexpression of the cyclin D1 and epidermal growth factor receptor genes in non-small-cell lung cancer. Lung Cancer Study Group. *Journal of cancer research and clinical oncology.* 1999;125(2):61-70.

[30] Shi D, He G, Cao S, Pan W, Zhang HZ, Yu D, et al. Overexpression of the c-erbB-2/neu-encoded p185 protein in primary lung cancer. *Molecular carcinogenesis.* 1992;5(3):213-8.

[31] Hsieh CC, Chow KC, Fahn HJ, Tsai CM, Li WY, Huang MH, et al. Prognostic significance of HER-2/neu overexpression in stage I adenocarcinoma of lung. *The Annals of thoracic surgery.* 1998 Oct;66(4):1159-63; discussion 63-4.

[32] To CT, Tsao MS. The roles of hepatocyte growth factor/scatter factor and met receptor in human cancers (Review). *Oncology reports.* 1998 Sep-Oct;5(5):1013-24.

[33] Anton RC, Brown RW, Younes M, Gondo MM, Stephenson MA, Cagle PT. Absence of prognostic significance of bcl-2 immunopositivity in non-small cell lung cancer: analysis of 427 cases. *Human pathology.* 1997 Sep;28(9):1079-82.

[34] Ohmura Y, Aoe M, Andou A, Shimizu N. Telomerase activity and Bcl-2 expression in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2000 Aug;6(8):2980-7.

[35] Pezzella F, Turley H, Kuzu I, Tungekar MF, Dunnill MS, Pierce CB, et al. bcl-2 protein in non-small-cell lung carcinoma. *The New England journal of medicine.* 1993 Sep 2;329(10):690-4.

[36] Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature.* 1992 Jul 2;358(6381):15-6.

[37] Ahrendt SA, Hu Y, Buta M, McDermott MP, Benoit N, Yang SC, et al. p53 mutations and survival in stage I non-small-cell lung cancer: results of a prospective study. *Journal of the National Cancer Institute.* 2003 Jul 2;95(13):961-70.

[38] Mao L, Lee JS, Kurie JM, Fan YH, Lippman SM, Lee JJ, et al. Clonal genetic alterations in the lungs of current and former smokers. *Journal of the National Cancer Institute.* 1997 Jun 18;89(12):857-62.

[39] Steels E, Paesmans M, Berghmans T, Branle F, Lemaitre F, Mascaux C, et al. Role of p53 as a prognostic factor for survival in lung cancer: a systematic review of the literature with a meta-analysis. *Eur Respir J.* 2001 Oct;18(4):705-19.

[40] Mitsudomi T, Hamajima N, Ogawa M, Takahashi T. Prognostic significance of p53 alterations in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Clin Cancer Res.* 2000 Oct;6(10):4055-63.

[41] Xu HJ, Quinlan DC, Davidson AG, Hu SX, Summers CL, Li J, et al. Altered retinoblastoma protein expression and prognosis in early-stage non-small-cell lung carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute.* 1994 May 4;86(9):695-9.

[42] Xu HJ, Cagle PT, Hu SX, Li J, Benedict WF. Altered retinoblastoma and p53 protein status in non-small cell carcinoma of the lung: potential synergistic effects on prognosis. *Clin Cancer Res.* 1996 Jul;2(7):1169-76.

[43] Kleinerman RA, Tarone RE, Abramson DH, Seddon JM, Li FP, Tucker MA. Hereditary retinoblastoma and risk of lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute.* 2000 Dec 20;92(24):2037-9.

[44] Kratzke RA, Greatens TM, Rubins JB, Maddaus MA, Niewoehner DE, Niehans GA, et al. Rb and p16INK4a expression in resected non-small cell lung tumors. *Cancer research.* 1996 Aug 1;56(15):3415-20.

- [45] Taga S, Osaki T, Ohgami A, Imoto H, Yoshimatsu T, Yoshino I, et al. Prognostic value of the immunohistochemical detection of p16INK4 expression in nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer*. 1997 Aug 1;80(3):389-95.
- [46] Salgia R, Skarin AT. Molecular abnormalities in lung cancer. *J Clin Oncol*. 1998 Mar;16(3):1207-17.
- [47] Kaye FJ. Molecular biology of lung cancer. *Lung cancer* (Amsterdam, Netherlands). 2001 Dec;34 Suppl 2:S35-41.
- [48] Volm M, Rittgen W, Drings P. Prognostic value of ERBB-1, VEGF, cyclin A, FOS, JUN and MYC in patients with squamous cell lung carcinomas. *British journal of cancer*. 1998 Feb;77(4):663-9.
- [49] Brabender J, Danenberg KD, Metzger R, Schneider PM, Park J, Salonga D, et al. Epidermal growth factor receptor and HER2-neu mRNA expression in non-small cell lung cancer Is correlated with survival. *Clin Cancer Res*. 2001 Jul;7(7):1850-5.
- [50] Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *The New England journal of medicine*. 2004 May 20;350(21):2129-39.
- [51] Tokumo M, Toyooka S, Kiura K, Shigematsu H, Tomii K, Aoe M, et al. The relationship between epidermal growth factor receptor mutations and clinicopathologic features in non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res*. 2005 Feb 1;11(3):1167-73.
- [52] Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, Bartolini S, Ceresoli GL, Bemis L, et al. Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2005 May 4;97(9):643-55.
- [53] Riely GJ, Kris MG, Rosenbaum D, Marks J, Li A, Chitale DA, et al. Frequency and distinctive spectrum of KRAS mutations in never smokers with lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2008 Sep 15;14(18):5731-4.
- [54] Kelley MJ, McCrory DC. Prevention of lung cancer: summary of published evidence. *Chest*. 2003 Jan;123(1 Suppl):50S-9S.
- [55] Carney DN. Lung cancer--time to move on from chemotherapy. *The New England journal of medicine*. 2002 Jan 10;346(2):126-8.
- [56] Chute JP, Chen T, Feigal E, Simon R, Johnson BE. Twenty years of phase III trials for patients with extensive-stage small-cell lung cancer: perceptible progress. *J Clin Oncol*. 1999 Jun;17(6):1794-801.
- [57] Henschke CI, McCauley DI, Yankelevitz DF, Naidich DP, McGuinness G, Miettinen OS, et al. Early Lung Cancer Action Project: overall design and findings from baseline screening. *Lancet*. 1999 Jul 10;354(9173):99-105.
- [58] Henschke CI, Naidich DP, Yankelevitz DF, McGuinness G, McCauley DI, Smith JP, et al. Early lung cancer action project: initial findings on repeat screenings. *Cancer*. 2001 Jul 1;92(1):153-9.
- [59] Kaneko M, Kusumoto M, Kobayashi T, Moriyama N, Naruke T, Ohmatsu H, et al. Computed tomography screening for lung carcinoma in Japan. *Cancer*. 2000 Dec 1;89(11 Suppl):2485-8.
- [60] Travis WD, Muller-Hermelink HK, ed. *Pathology and Genetics: Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*. 2004.
- [61] Harris TJ, McCormick F. The molecular pathology of cancer. *Nature reviews*. May;7(5):251-65.

- [62] Roggli VL, Vollmer RT, Greenberg SD, McGavran MH, Spjut HJ, Yesner R. Lung cancer heterogeneity: a blinded and randomized study of 100 consecutive cases. *Human pathology*. 1985 Jun;16(6):569-79.
- [63] Barsky SH, Grossman DA, Ho J, Holmes EC. The multifocality of bronchioloalveolar lung carcinoma: evidence and implications of a multiclonal origin. *Mod Pathol*. 1994 Aug;7(6):633-40.
- [64] Inamura K, Ishikawa Y. Lung cancer progression and metastasis from the prognostic point of view. *Clinical & experimental metastasis*. Aug;27(6):389-97.
- [65] Delmonte VC, Alberti O, Saldiva PH. Large cell carcinoma of the lung. Ultrastructural and immunohistochemical features. *Chest*. 1986 Oct;90(4):524-7.
- [66] Albain KS, True LD, Golomb HM, Hoffman PC, Little AG. Large cell carcinoma of the lung. Ultrastructural differentiation and clinicopathologic correlations. *Cancer*. 1985 Oct 1;56(7):1618-23.
- [67] Travis WD CT, Corrin B. *Histological typing of lung and pleural tumors*. 3rd ed, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. 1999.
- [68] Radice PA, Matthews MJ, Ihde DC, Gazdar AF, Carney DN, Bunn PA, et al. The clinical behavior of "mixed" small cell/large cell bronchogenic carcinoma compared to "pure" small cell subtypes. *Cancer*. 1982 Dec 15;50(12):2894-902.
- [69] Fushimi H, Kukui M, Morino H, Hosono Y, Fukuoka M, Kusunoki Y, et al. Detection of large cell component in small cell lung carcinoma by combined cytologic and histologic examinations and its clinical implication. *Cancer*. 1992 Aug 1;70(3):599-605.
- [70] Adelstein DJ, Tomaszefski JF, Jr., Snow NJ, Horrigan TP, Hines JD. Mixed small cell and non-small cell lung cancer. *Chest*. 1986 May;89(5):699-704.
- [71] Fraire AE, Johnson EH, Yesner R, Zhang XB, Spjut HJ, Greenberg SD. Prognostic significance of histopathologic subtype and stage in small cell lung cancer. *Human pathology*. 1992 May;23(5):520-8.
- [72] Mangum MD, Greco FA, Hainsworth JD, Hande KR, Johnson DH. Combined small-cell and non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 1989 May;7(5):607-12.
- [73] Baker RR, Ettinger DS, Ruckdeschel JD, Eggleston JC, McKneally MF, Abeloff MD, et al. The role of surgery in the management of selected patients with small-cell carcinoma of the lung. *J Clin Oncol*. 1987 May;5(5):697-702.
- [74] Aisner SC, Finkelstein DM, Ettinger DS, Abeloff MD, Ruckdeschel JC, Eggleston JC. The clinical significance of variant-morphology small-cell carcinoma of the lung. *J Clin Oncol*. 1990 Mar;8(3):402-8.
- [75] Bepler G, Neumann K, Holle R, Havemann K, Kalbfleisch H. Clinical relevance of histologic subtyping in small cell lung cancer. *Cancer*. 1989 Jul 1;64(1):74-9.
- [76] Ross PJ, Ashley S, Norton A, Priest K, Waters JS, Eisen T, et al. Do patients with weight loss have a worse outcome when undergoing chemotherapy for lung cancers? *British journal of cancer*. 2004 May 17;90(10):1905-11.
- [77] Colinet B, Jacot W, Bertrand D, Lacombe S, Bozonnat MC, Daures JP, et al. A new simplified comorbidity score as a prognostic factor in non-small-cell lung cancer patients: description and comparison with the Charlson's index. *British journal of cancer*. 2005 Nov 14;93(10):1098-105.
- [78] Paone G, Nicastrì E, Lucantoni G, Dello Iacono R, Battistoni P, D'Angeli AL, et al. Endobronchial ultrasound-driven biopsy in the diagnosis of peripheral lung lesions. *Chest*. 2005 Nov;128(5):3551-7.

- [79] De Giacomo T, Rendina EA, Venuta F, Della Rocca G, Ricci C. Thoracoscopic staging of IIIB non-small cell lung cancer before neoadjuvant therapy. *The Annals of thoracic surgery*. 1997 Nov;64(5):1409-11.
- [80] Pretreatment evaluation of non-small-cell lung cancer. The American Thoracic Society and The European Respiratory Society. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1997 Jul;156(1):320-32.
- [81] Light RW, Erozan YS, Ball WC, Jr. Cells in pleural fluid. Their value in differential diagnosis. *Archives of internal medicine*. 1973 Dec;132(6):854-60.
- [82] BTS Guidelines for the Management of Community Acquired Pneumonia in Adults. *Thorax*. 2001 Dec;56 Suppl 4:IV1-64.
- [83] Rivera MP, Mehta AC. Initial diagnosis of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest*. 2007 Sep;132(3 Suppl):131S-48S.
- [84] BTS guidelines: guidelines on the selection of patients with lung cancer for surgery. *Thorax*. 2001 Feb;56(2):89-108.
- [85] Hoang T, Xu R, Schiller JH, Bonomi P, Johnson DH. Clinical model to predict survival in chemo-naïve patients with advanced non-small-cell lung cancer treated with third-generation chemotherapy regimens based on eastern cooperative oncology group data. *J Clin Oncol*. 2005 Jan 1;23(1):175-83.
- [86] Blackstock AW, Herndon JE, 2nd, Paskett ED, Perry MC, Graziano SL, Muscato JJ, et al. Outcomes among African-American/non-African-American patients with advanced non-small-cell lung carcinoma: report from the Cancer and Leukemia Group B. *Journal of the National Cancer Institute*. 2002 Feb 20;94(4):284-90.
- [87] Stanley KE. Prognostic factors for survival in patients with inoperable lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 1980 Jul;65(1):25-32.
- [88] Kawaguchi T, Takada M, Kubo A, Matsumura A, Fukai S, Tamura A, et al. Performance status and smoking status are independent favorable prognostic factors for survival in non-small cell lung cancer: a comprehensive analysis of 26,957 patients with NSCLC. *J Thorac Oncol*. May;5(5):620-30.
- [89] Sculier JP, Chansky K, Crowley JJ, Van Meerbeeck J, Goldstraw P. The impact of additional prognostic factors on survival and their relationship with the anatomical extent of disease expressed by the 6th Edition of the TNM Classification of Malignant Tumors and the proposals for the 7th Edition. *J Thorac Oncol*. 2008 May;3(5):457-66.
- [90] Takise A, Kodama T, Shimosato Y, Watanabe S, Suemasu K. Histopathologic prognostic factors in adenocarcinomas of the peripheral lung less than 2 cm in diameter. *Cancer*. 1988 May 15;61(10):2083-8.
- [91] Lipford EH, 3rd, Eggleston JC, Lillemoe KD, Sears DL, Moore GW, Baker RR. Prognostic factors in surgically resected limited-stage, nonsmall cell carcinoma of the lung. *The American journal of surgical pathology*. 1984 May;8(5):357-65.
- [92] Cagini L, Monacelli M, Giustozzi G, Moggi L, Bellezza G, Sidoni A, et al. Biological prognostic factors for early stage completely resected non-small cell lung cancer. *Journal of surgical oncology*. 2000 May;74(1):53-60.
- [93] Kwiatkowski DJ, Harpole DH, Jr., Godleski J, Herndon JE, 2nd, Shieh DB, Richards W, et al. Molecular pathologic substaging in 244 stage I non-small-cell lung cancer patients: clinical implications. *J Clin Oncol*. 1998 Jul;16(7):2468-77.
- [94] Shields TW. Prognostic significance of parenchymal lymphatic vessel and blood vessel invasion in carcinoma of the lung. *Surgery, gynecology & obstetrics*. 1983 Aug;157(2):185-90.



- [95] Macchiarini P, Fontanini G, Hardin MJ, Chuanchieh H, Bigini D, Vignati S, et al. Blood vessel invasion by tumor cells predicts recurrence in completely resected T1 N0 M0 non-small-cell lung cancer. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 1993 Jul;106(1):80-9.
- [96] Paesmans M, Berghmans T, Dusart M, Garcia C, Hossein-Foucher C, Lafitte JJ, et al. Primary tumor standardized uptake value measured on fluorodeoxyglucose positron emission tomography is of prognostic value for survival in non-small cell lung cancer: update of a systematic review and meta-analysis by the European Lung Cancer Working Party for the International Association for the Study of Lung Cancer Staging Project. *J Thorac Oncol*. May;5(5):612-9.
- [97] Nair VS, Krupitskaya Y, Gould MK. Positron emission tomography 18F-fluorodeoxyglucose uptake and prognosis in patients with surgically treated, stage I non-small cell lung cancer: a systematic review. *J Thorac Oncol*. 2009 Dec;4(12):1473-9.
- [98] Miller VA, Riely GJ, Zakowski MF, Li AR, Patel JD, Heelan RT, et al. Molecular characteristics of bronchioloalveolar carcinoma and adenocarcinoma, bronchioloalveolar carcinoma subtype, predict response to erlotinib. *J Clin Oncol*. 2008 Mar 20;26(9):1472-8.
- [99] Sequist LV, Martins RG, Spigel D, Grunberg SM, Spira A, Janne PA, et al. First-line gefitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring somatic EGFR mutations. *J Clin Oncol*. 2008 May 20;26(15):2442-9.
- [100] Simon GR, Sharma S, Cantor A, Smith P, Bepler G. ERCC1 expression is a predictor of survival in resected patients with non-small cell lung cancer. *Chest*. 2005 Mar;127(3):978-83.
- [101] Olausson KA, Dunant A, Fouret P, Brambilla E, Andre F, Haddad V, et al. DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *The New England journal of medicine*. 2006 Sep 7;355(10):983-91.
- [102] Bepler G, Kusmartseva I, Sharma S, Gautam A, Cantor A, Sharma A, et al. RRM1 modulated in vitro and in vivo efficacy of gemcitabine and platinum in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2006 Oct 10;24(29):4731-7.
- [103] Tsao MS, Aviell-Ronen S, Ding K, Lau D, Liu N, Sakurada A, et al. Prognostic and predictive importance of p53 and RAS for adjuvant chemotherapy in non small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2007 Nov 20;25(33):5240-7.
- [104] Bepler G, Sharma S, Cantor A, Gautam A, Haura E, Simon G, et al. RRM1 and PTEN as prognostic parameters for overall and disease-free survival in patients with non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2004 May 15;22(10):1878-85.
- [105] Zheng Z, Chen T, Li X, Haura E, Sharma A, Bepler G. DNA synthesis and repair genes RRM1 and ERCC1 in lung cancer. *The New England journal of medicine*. 2007 Feb 22;356(8):800-8.
- [106] Reynolds C, Obasaju C, Schell MJ, Li X, Zheng Z, Boulware D, et al. Randomized phase III trial of gemcitabine-based chemotherapy with in situ RRM1 and ERCC1 protein levels for response prediction in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2009 Dec 1;27(34):5808-15.
- [107] Siel W, Dango S, Kirschbaum A, Cucuruz B, Horth W, Stremmel C, et al. Sublobar resections in stage IA non-small cell lung cancer: segmentectomies result in significantly better cancer-related survival than wedge resections. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2008 Apr;33(4):728-34.
- [108] Siel W, Stremmel C, Kirschbaum A, Hinterberger L, Stoelben E, Hasse J, et al. Frequency of local recurrence following segmentectomy of stage IA non-small cell lung cancer is influenced by segment localisation and width of resection margins--implications

- for patient selection for segmentectomy. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2007 Mar;31(3):522-7; discussion 7-8.
- [109] Thomas P, Doddoli C, Yena S, Thirion X, Sebag F, Fuentes P, et al. VATS is an adequate oncological operation for stage I non-small cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2002 Jun;21(6):1094-9.
- [110] Roviario G, Varoli F, Vergani C, Nucca O, Maciocco M, Grignani F. Long-term survival after videothoracoscopic lobectomy for stage I lung cancer. *Chest.* 2004 Sep;126(3):725-32.
- [111] Solaini L, Prusciano F, Bagioni P, Poddie DB. Long-term results of video-assisted thoracic surgery lobectomy for stage I non-small cell lung cancer: a single-centre study of 104 cases. *Interactive cardiovascular and thoracic surgery.* 2004 Mar;3(1):57-62.
- [112] Gonzalez-Stawinski GV, Lemaire A, Merchant F, O'Halloran E, Coleman RE, Harpole DH, et al. A comparative analysis of positron emission tomography and mediastinoscopy in staging non-small cell lung cancer. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery.* 2003 Dec;126(6):1900-5.
- [113] Tournoy KG, Maddens S, Gosselin R, Van Maele G, van Meerbeeck JP, Kelles A. Integrated FDG-PET/CT does not make invasive staging of the intrathoracic lymph nodes in non-small cell lung cancer redundant: a prospective study. *Thorax.* 2007 Aug;62(8):696-701.
- [114] Dillemans B, Deneffe G, Verschakelen J, Decramer M. Value of computed tomography and mediastinoscopy in preoperative evaluation of mediastinal nodes in non-small cell lung cancer. A study of 569 patients. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1994;8(1):37-42.
- [115] Arita T, Kuramitsu T, Kawamura M, Matsumoto T, Matsunaga N, Sugi K, et al. Bronchogenic carcinoma: incidence of metastases to normal sized lymph nodes. *Thorax.* 1995 Dec;50(12):1267-9.
- [116] Meyers BF, Haddad F, Siegel BA, Zoole JB, Battafarano RJ, Veeramachaneni N, et al. Cost-effectiveness of routine mediastinoscopy in computed tomography- and positron emission tomography-screened patients with stage I lung cancer. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery.* 2006 Apr;131(4):822-9; discussion -9.
- [117] Effects of postoperative mediastinal radiation on completely resected stage II and stage III epidermoid cancer of the lung. The Lung Cancer Study Group. *The New England journal of medicine.* 1986 Nov 27;315(22):1377-81.
- [118] Keller SM, Adak S, Wagner H, Herskovic A, Komaki R, Brooks BJ, et al. A randomized trial of postoperative adjuvant therapy in patients with completely resected stage II or IIIA non-small-cell lung cancer. Eastern Cooperative Oncology Group. *The New England journal of medicine.* 2000 Oct 26;343(17):1217-22.
- [119] Douillard JY, Rosell R, De Lena M, Riggi M, Hurteloup P, Mahe MA. Impact of postoperative radiation therapy on survival in patients with complete resection and stage I, II, or IIIA non-small-cell lung cancer treated with adjuvant chemotherapy: the adjuvant Navelbine International Trialist Association (ANITA) Randomized Trial. *International journal of radiation oncology, biology, physics.* 2008 Nov 1;72(3):695-701.
- [120] Bradley JD, Paulus R, Graham MV, Ettinger DS, Johnstone DW, Pilepich MV, et al. Phase II trial of postoperative adjuvant paclitaxel/carboplatin and thoracic radiotherapy in resected stage II and IIIA non-small-cell lung cancer: promising long-term results of the Radiation Therapy Oncology Group--RTOG 9705. *J Clin Oncol.* 2005 May 20;23(15):3480-7.
- [121] Feigenberg SJ, Hanlon AL, Langer C, Goldberg M, Nicolaou N, Millenson M, et al. A phase II study of concurrent carboplatin and paclitaxel and thoracic radiotherapy for

completely resected stage II and IIIA non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2007 Apr;2(4):287-92.

[122] Jaklitsch MT, Herndon JE, 2nd, DeCamp MM, Jr., Richards WG, Kumar P, Krasna MJ, et al. Nodal downstaging predicts survival following induction chemotherapy for stage IIIA (N2) non-small cell lung cancer in CALGB protocol #8935. *Journal of surgical oncology*. 2006 Dec 1;94(7):599-606.

[123] Wisnivesky JP, Bonomi M, Henschke C, Iannuzzi M, McGinn T. Radiation therapy for the treatment of unresected stage I-II non-small cell lung cancer. *Chest*. 2005 Sep;128(3):1461-7.

[124] Albain KS, Rusch VW, Crowley JJ, Rice TW, Turrisi AT, 3rd, Weick JK, et al. Concurrent cisplatin/etoposide plus chest radiotherapy followed by surgery for stages IIIA (N2) and IIIB non-small-cell lung cancer: mature results of Southwest Oncology Group phase II study 8805. *J Clin Oncol*. 1995 Aug;13(8):1880-92.

[125] Arriagada R, Bergman B, Dunant A, Le Chevalier T, Pignon JP, Vansteenkiste J. Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine*. 2004 Jan 22;350(4):351-60.

[126] Winton T, Livingston R, Johnson D, Rigas J, Johnston M, Butts C, et al. Vinorelbine plus cisplatin vs. observation in resected non-small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine*. 2005 Jun 23;352(25):2589-97.

[127] Douillard JY, Rosell R, De Lena M, Carpagnano F, Ramlau R, Gonzales-Larriba JL, et al. Adjuvant vinorelbine plus cisplatin versus observation in patients with completely resected stage IB-IIIa non-small-cell lung cancer (Adjuvant Navelbine International Trialist Association [ANITA]): a randomised controlled trial. *The lancet oncology*. 2006 Sep;7(9):719-27.

[128] Pignon JP, Tribodet H, Scagliotti GV, Douillard JY, Shepherd FA, Stephens RJ, et al. Lung adjuvant cisplatin evaluation: a pooled analysis by the LACE Collaborative Group. *J Clin Oncol*. 2008 Jul 20;26(21):3552-9.

[129] Strauss GM, Herndon JE, 2nd, Maddaus MA, Johnstone DW, Johnson EA, Harpole DH, 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 Nov 1;26(31):5043-51.

[130] Socinski MA, Rosenman JG, Halle J, Schell MJ, Lin Y, Russo S, et al. Dose-escalating conformal thoracic radiation therapy with induction and concurrent carboplatin/paclitaxel in unresectable stage IIIA/B nonsmall cell lung carcinoma: a modified phase I/II trial. *Cancer*. 2001 Sep 1;92(5):1213-23.

[131] Furuse K, Fukuoka M, Kawahara M, Nishikawa H, Takada Y, Kudoh S, et al. Phase III study of concurrent versus sequential thoracic radiotherapy in combination with mitomycin, vindesine, and cisplatin in unresectable stage III non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 1999 Sep;17(9):2692-9.

[132] Dillman RO, Seagren SL, Propert KJ, Guerra J, Eaton WL, Perry MC, et al. A randomized trial of induction chemotherapy plus high-dose radiation versus radiation alone in stage III non-small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine*. 1990 Oct 4;323(14):940-5.

[133] Le Chevalier T, Arriagada R, Quoix E, Ruffie P, Martin M, Tarayre M, et al. Radiotherapy alone versus combined chemotherapy and radiotherapy in nonresectable non-small-cell lung cancer: first analysis of a randomized trial in 353 patients. *Journal of the National Cancer Institute*. 1991 Mar 20;83(6):417-23.

- [134] Dillman RO, Herndon J, Seagren SL, Eaton WL, Jr., Green MR. Improved survival in stage III non-small-cell lung cancer: seven-year follow-up of cancer and leukemia group B (CALGB) 8433 trial. *Journal of the National Cancer Institute*. 1996 Sep 4;88(17):1210-5.
- [135] Albain KS, Crowley JJ, Turrisi AT, 3rd, Gandara DR, Farrar WB, Clark JI, et al. Concurrent cisplatin, etoposide, and chest radiotherapy in pathologic stage IIIB non-small-cell lung cancer: a Southwest Oncology Group phase II study, SWOG 9019. *J Clin Oncol*. 2002 Aug 15;20(16):3454-60.
- [136] Belani CP, Choy H, Bonomi P, Scott C, Travis P, Haluschak J, et al. Combined chemoradiotherapy regimens of paclitaxel and carboplatin for locally advanced non-small-cell lung cancer: a randomized phase II locally advanced multi-modality protocol. *J Clin Oncol*. 2005 Sep 1;23(25):5883-91.
- [137] Gandara DR, Chansky K, Albain KS, Leigh BR, Gaspar LE, Lara PN, Jr., et al. Consolidation docetaxel after concurrent chemoradiotherapy in stage IIIB non-small-cell lung cancer: phase II Southwest Oncology Group Study S9504. *J Clin Oncol*. 2003 May 15;21(10):2004-10.
- [138] Magilligan DJ, Jr., Duvernoy C, Malik G, Lewis JW, Jr., Knighton R, Ausman JI. Surgical approach to lung cancer with solitary cerebral metastasis: twenty-five years' experience. *The Annals of thoracic surgery*. 1986 Oct;42(4):360-4.
- [139] Azzoli CG, Baker S, Jr., Temin S, Pao W, Aliff T, Brahmer J, et al. American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline update on chemotherapy for stage IV non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2009 Dec 20;27(36):6251-66.
- [140] Chemotherapy in addition to supportive care improves survival in advanced non-small-cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 16 randomized controlled trials. *J Clin Oncol*. 2008 Oct 1;26(28):4617-25.
- [141] Souquet PJ, Chauvin F, Boissel JP, Cellerino R, Cormier Y, Ganz PA, et al. Polychemotherapy in advanced non small cell lung cancer: a meta-analysis. *Lancet*. 1993 Jul 3;342(8862):19-21.
- [142] Kelly K, Crowley J, Bunn PA, Jr., Presant CA, Grevstad PK, Moinpour CM, et al. Randomized phase III trial of paclitaxel plus carboplatin versus vinorelbine plus cisplatin in the treatment of patients with advanced non--small-cell lung cancer: a Southwest Oncology Group trial. *J Clin Oncol*. 2001 Jul 1;19(13):3210-8.
- [143] Schiller JH, Harrington D, Belani CP, Langer C, Sandler A, Krook J, et al. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine*. 2002 Jan 10;346(2):92-8.
- [144] Booton R, Lorigan P, Anderson H, Baka S, Ashcroft L, Nicolson M, et al. A phase III trial of docetaxel/carboplatin versus mitomycin C/ifosfamide/cisplatin (MIC) or mitomycin C/vinblastine/cisplatin (MVP) in patients with advanced non-small-cell lung cancer: a randomised multicentre trial of the British Thoracic Oncology Group (BTOG1). *Ann Oncol*. 2006 Jul;17(7):1111-9.
- [145] Barlesi F, Pujol JL. Combination of chemotherapy without platinum compounds in the treatment of advanced non-small cell lung cancer: a systematic review of phase III trials. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*. 2005 Sep;49(3):289-98.
- [146] Pujol JL, Breton JL, Gervais R, Rebattu P, Depierre A, Morere JF, et al. Gemcitabine-docetaxel versus cisplatin-vinorelbine in advanced or metastatic non-small-cell lung cancer: a phase III study addressing the case for cisplatin. *Ann Oncol*. 2005 Apr;16(4):602-10.

- [147] Sandler AB, Johnson DH, Herbst RS. Anti-vascular endothelial growth factor monoclonals in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2004 Jun 15;10(12 Pt 2):4258s-62s.
- [148] Giaccone G. Epidermal growth factor receptor inhibitors in the treatment of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2005 May 10;23(14):3235-42.
- [149] Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine.* 2006 Dec 14;355(24):2542-50.
- [150] Sequist LV, Joshi VA, Janne PA, Muzikansky A, Fidias P, Meyerson M, et al. Response to treatment and survival of patients with non-small cell lung cancer undergoing somatic EGFR mutation testing. *The oncologist.* 2007 Jan;12(1):90-8.
- [151] Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *The New England journal of medicine.* 2009 Sep 3;361(10):947-57.
- [152] Inoue A, Kobayashi K, Usui K, Maemondo M, Okinaga S, Mikami I, et al. First-line gefitinib for patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring epidermal growth factor receptor mutations without indication for chemotherapy. *J Clin Oncol.* 2009 Mar 20;27(9):1394-400.
- [153] Pirker R, Pereira JR, Szczesna A, von Pawel J, Krzakowski M, Ramlau R, et al. Cetuximab plus chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer (FLEX): an open-label randomised phase III trial. *Lancet.* 2009 May 2;373(9674):1525-31.
- [154] Patel JD, Hensing TA, Rademaker A, Hart EM, Blum MG, Milton DT, et al. Phase II study of pemetrexed and carboplatin plus bevacizumab with maintenance pemetrexed and bevacizumab as first-line therapy for nonsquamous non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2009 Jul 10;27(20):3284-9.
- [155] Ciuleanu T, Brodowicz T, Zielinski C, Kim JH, Krzakowski M, Laack E, et al. Maintenance pemetrexed plus best supportive care versus placebo plus best supportive care for non-small-cell lung cancer: a randomised, double-blind, phase 3 study. *Lancet.* 2009 Oct 24;374(9699):1432-40.
- [156] Pignon JP, Arriagada R, Ihde DC, Johnson DH, Perry MC, Souhami RL, et al. A meta-analysis of thoracic radiotherapy for small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine.* 1992 Dec 3;327(23):1618-24.
- [157] Pignon JP, Arriagada R. Role of thoracic radiotherapy in limited-stage small-cell lung cancer: quantitative review based on the literature versus meta-analysis based on individual data. *J Clin Oncol.* 1992 Nov;10(11):1819-20.
- [158] Warde P, Payne D. Does thoracic irradiation improve survival and local control in limited-stage small-cell carcinoma of the lung? A meta-analysis. *J Clin Oncol.* 1992 Jun;10(6):890-5.
- [159] Spira A, Ettinger DS. Multidisciplinary management of lung cancer. *The New England journal of medicine.* 2004 Jan 22;350(4):379-92.
- [160] Johnson BE. Management of small cell lung cancer. *Clinics in chest medicine.* 2002 Mar;23(1):225-39.
- [161] Evans WK, Shepherd FA, Feld R, Osoba D, Dang P, Deboer G. VP-16 and cisplatin as first-line therapy for small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 1985 Nov;3(11):1471-7.
- [162] Jackman DM, Johnson BE. Small-cell lung cancer. *Lancet.* 2005 Oct 15-21;366(9494):1385-96.

- [163] Sundstrom S, Bremnes RM, Kaasa S, Aasebo U, Hatlevoll R, Dahle R, et al. Cisplatin and etoposide regimen is superior to cyclophosphamide, epirubicin, and vincristine regimen in small-cell lung cancer: results from a randomized phase III trial with 5 years' follow-up. *J Clin Oncol*. 2002 Dec 15;20(24):4665-72.
- [164] Saito H, Takada Y, Ichinose Y, Eguchi K, Kudoh S, Matsui K, et al. Phase II study of etoposide and cisplatin with concurrent twice-daily thoracic radiotherapy followed by irinotecan and cisplatin in patients with limited-disease small-cell lung cancer: West Japan Thoracic Oncology Group 9902. *J Clin Oncol*. 2006 Nov 20;24(33):5247-52.
- [165] Okamoto H, Watanabe K, Nishiwaki Y, Mori K, Kurita Y, Hayashi I, et al. Phase II study of area under the plasma-concentration-versus-time curve-based carboplatin plus standard-dose intravenous etoposide in elderly patients with small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 1999 Nov;17(11):3540-5.
- [166] Okamoto H, Watanabe K, Kunikane H, Yokoyama A, Kudoh S, Asakawa T, et al. Randomised phase III trial of carboplatin plus etoposide vs split doses of cisplatin plus etoposide in elderly or poor-risk patients with extensive disease small-cell lung cancer: JCOG 9702. *British journal of cancer*. 2007 Jul 16;97(2):162-9.
- [167] Hillers TK, Sauve MD, Guyatt GH. Analysis of published studies on the detection of extrathoracic metastases in patients presumed to have operable non-small cell lung cancer. *Thorax*. 1994 Jan;49(1):14-9.
- [168] van Tinteren H, Hoekstra OS, Smit EF, van den Bergh JH, Schreurs AJ, Stallaert RA, et al. Effectiveness of positron emission tomography in the preoperative assessment of patients with suspected non-small-cell lung cancer: the PLUS multicentre randomised trial. *Lancet*. 2002 Apr 20;359(9315):1388-93.
- [169] De Wever W, Vankan Y, Stroobants S, Verschakelen J. Detection of extrapulmonary lesions with integrated PET/CT in the staging of lung cancer. *Eur Respir J*. 2007 May;29(5):995-1002.
- [170] Stenbygaard LE, Sorensen JB, Olsen JE. Metastatic pattern at autopsy in non-resectable adenocarcinoma of the lung--a study from a cohort of 259 consecutive patients treated with chemotherapy. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)*. 1997;36(3):301-6.
- [171] Jerezek B, Jassem J, Karnicka-Mlodkowska H, Badzio A, Mos-Antkowiak R, Szczepek B, et al. Autopsy findings in small cell lung cancer. *Neoplasma*. 1996;43(2):133-7.
- [172] Toloza EM, Harpole L, McCrory DC. Noninvasive staging of non-small cell lung cancer: a review of the current evidence. *Chest*. 2003 Jan;123(1 Suppl):137S-46S.
- [173] Schumacher T, Brink I, Mix M, Reinhardt M, Herget G, Digel W, et al. FDG-PET imaging for the staging and follow-up of small cell lung cancer. *European journal of nuclear medicine*. 2001 Apr;28(4):483-8.
- [174] Cheran SK, Herndon JE, 2nd, Patz EF, Jr. Comparison of whole-body FDG-PET to bone scan for detection of bone metastases in patients with a new diagnosis of lung cancer. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*. 2004 Jun;44(3):317-25.
- [175] Oliver TW, Jr., Bernardino ME, Miller JI, Mansour K, Greene D, Davis WA. Isolated adrenal masses in nonsmall-cell bronchogenic carcinoma. *Radiology*. 1984 Oct;153(1):217-8.
- [176] Pagan JJ. Normal adrenal glands in small cell lung carcinoma: CT-guided biopsy. *Ajr*. 1983 May;140(5):949-51.
- [177] Erasmus JJ, Patz EF, Jr., McAdams HP, Murray JG, Herndon J, Coleman RE, et al. Evaluation of adrenal masses in patients with bronchogenic carcinoma using 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Ajr*. 1997 May;168(5):1357-60.

- [178] Mujoomdar A, Austin JH, Malhotra R, Powell CA, Pearson GD, Shiau MC, et al. Clinical predictors of metastatic disease to the brain from non-small cell lung carcinoma: primary tumor size, cell type, and lymph node metastases. *Radiology*. 2007 Mar;242(3):882-8.
- [179] Doyle TJ. Brain metastasis in the natural history of small-cell lung cancer: 1972-1979. *Cancer*. 1982 Aug 15;50(4):752-4.
- [180] Hu C, Chang EL, Hassenbusch SJ, 3rd, Allen PK, Woo SY, Mahajan A, et al. Nonsmall cell lung cancer presenting with synchronous solitary brain metastasis. *Cancer*. 2006 May 1;106(9):1998-2004.
- [181] Mintz A, Perry J, Spithoff K, Chambers A, Laperriere N. Management of single brain metastasis: a practice guideline. *Current oncology (Toronto, Ont)*. 2007 Aug;14(4):131-43.
- [182] Patchell RA, Tibbs PA, Walsh JW, Dempsey RJ, Maruyama Y, Kryscio RJ, et al. A randomized trial of surgery in the treatment of single metastases to the brain. *The New England journal of medicine*. 1990 Feb 22;322(8):494-500.
- [183] Auperin A, Arriagada R, Pignon JP, Le Pechoux C, Gregor A, Stephens RJ, et al. Prophylactic cranial irradiation for patients with small-cell lung cancer in complete remission. Prophylactic Cranial Irradiation Overview Collaborative Group. *The New England journal of medicine*. 1999 Aug 12;341(7):476-84.
- [184] Patel S, Macdonald OK, Suntharalingam M. Evaluation of the use of prophylactic cranial irradiation in small cell lung cancer. *Cancer*. 2009 Feb 15;115(4):842-50.
- [185] Slotman B, Faivre-Finn C, Kramer G, Rankin E, Snee M, Hatton M, et al. Prophylactic cranial irradiation in extensive small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine*. 2007 Aug 16;357(7):664-72.
- [186] Groome PA, Bolejack V, Crowley JJ, Kennedy C, Krasnik M, Sobin LH, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: validation of the proposals for revision of the T, N, and M descriptors and consequent stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification of malignant tumours. *J Thorac Oncol*. 2007 Aug;2(8):694-705.
- [187] Papanicolaou GN, Marshall VF. Urine Sediment Smears as a Diagnostic Procedure in Cancers of the Urinary Tract. *Science (New York, NY)*. 1945 May 18;101(2629):519-20.
- [188] Murphy WM. Current status of urinary cytology in the evaluation of bladder neoplasms. *Human pathology*. 1990 Sep;21(9):886-96.
- [189] Brown FM. Urine cytology. It is still the gold standard for screening? *The Urologic clinics of North America*. 2000 Feb;27(1):25-37.
- [190] Grossfeld GD, Litwin MS, Wolf JS, Jr., Hricak H, Shuler CL, Agerter DC, et al. Evaluation of asymptomatic microscopic hematuria in adults: the American Urological Association best practice policy--part II: patient evaluation, cytology, voided markers, imaging, cystoscopy, nephrology evaluation, and follow-up. *Urology*. 2001 Apr;57(4):604-10.
- [191] Grossfeld GD, Litwin MS, Wolf JS, Hricak H, Shuler CL, Agerter DC, et al. Evaluation of asymptomatic microscopic hematuria in adults: the American Urological Association best practice policy--part I: definition, detection, prevalence, and etiology. *Urology*. 2001 Apr;57(4):599-603.
- [192] Hofland CA, Mariani AJ. Is cytology required for a hematuria evaluation? *The Journal of urology*. 2004 Jan;171(1):324-6.
- [193] Britton JP, Dowell AC, Whelan P, Harris CM. A community study of bladder cancer screening by the detection of occult urinary bleeding. *The Journal of urology*. 1992 Sep;148(3):788-90.

- [194] Messing EM, Madeb R, Young T, Gilchrist KW, Bram L, Greenberg EB, et al. Long-term outcome of hematuria home screening for bladder cancer in men. *Cancer*. 2006 Nov 1;107(9):2173-9.
- [195] Mohr DN, Offord KP, Owen RA, Melton LJ, 3rd. Asymptomatic microhematuria and urologic disease. A population-based study. *Jama*. 1986 Jul 11;256(2):224-9.
- [196] Gamarra MC, Zein T. Cytologic spectrum of bladder cancer. *Urology*. 1984 Mar;23(3 Suppl):23-6.
- [197] Ellwein LB, Farrow GM, Friedell GH, Greenfield RE. An assessment of the impact of urine cytology screening using a computer-based model of bladder cancer. *The Urologic clinics of North America*. 1984 Nov;11(4):585-98.
- [198] Holmquist ND. Detection of urinary tract cancer in urinalysis specimens in an outpatient population. *American journal of clinical pathology*. 1988 Apr;89(4):499-504.
- [199] De Ridder D, van Poppel H, Demonty L, D'Hooghe B, Gonsette R, Carton H, et al. Bladder cancer in patients with multiple sclerosis treated with cyclophosphamide. *The Journal of urology*. 1998 Jun;159(6):1881-4.
- [200] Crabbe JG, Cresdee WC, Scott TS, Williams MH. The cytological diagnosis of bladder tumours amongst dyestuff workers. *British journal of industrial medicine*. 1956 Oct;13(4):270-6.
- [201] Crosby JH, Allsbrook WC, Jr., Koss LG, Bales CE, Witherington R, Schulte PA, et al. Cytologic detection of urothelial cancer and other abnormalities in a cohort of workers exposed to aromatic amines. *Acta cytologica*. 1991 May-Jun;35(3):263-8.
- [202] Badalament RA, Hermansen DK, Kimmel M, Gay H, Herr HW, Fair WR, et al. The sensitivity of bladder wash flow cytometry, bladder wash cytology, and voided cytology in the detection of bladder carcinoma. *Cancer*. 1987 Oct 1;60(7):1423-7.
- [203] Crabtree WN, Murphy WM. The value of ethanol as a fixative in urinary cytology. *Acta cytologica*. 1980 Sep-Oct;24(5):452-5.
- [204] Holmquist ND. Diagnostic cytology of the urinary tract. *Monographs in clinical cytology*. 1977;6:1-88.
- [205] Kannan V, Bose S. Low grade transitional cell carcinoma and instrument artifact. A challenge in urinary cytology. *Acta cytologica*. 1993 Nov-Dec;37(6):899-902.
- [206] [www.eurocytology.eu](http://www.eurocytology.eu).
- [207] Wilson TG, Pritchett TR, Lieskovsky G, Warner NE, Skinner DG. Primary adenocarcinoma of bladder. *Urology*. 1991 Sep;38(3):223-6.
- [208] Wright RG, Halford JA. Evaluation of thin-layer methods in urine cytology. *Cytopathology*. 2001 Oct;12(5):306-13.
- [209] Retz MM, Sidhu SS, Blaveri E, Kerr SC, Dolganov GM, Lehmann J, et al. CXCR4 expression reflects tumor progression and regulates motility of bladder cancer cells. *International journal of cancer*. 2005 Mar 20;114(2):182-9.
- [210] Goldin A, Venditti JM. The new NCI screen and its implications for clinical evaluation. *Recent Results Cancer Res*. 1980;70:5-20.
- [211] Yoneda T, Michigami T, Yi B, Williams PJ, Niewolna M, Hiraga T. Actions of bisphosphonate on bone metastasis in animal models of breast carcinoma. *Cancer*. 2000 Jun 15;88(12 Suppl):2979-88.
- [212] Kamposioras K, Pentheroudakis G, Malamou-Mitsi V, Pappa L, Bafa M, Pavlidis N. Can circulated lung cancer cells pass to the urine without apparent urine tract metastases? A single centre series. *Lung Cancer*. 2008 Apr;60(1):141-5.
- [213] Roy JB, Walton KN. Secondary tumors of the kidney. *J Urol*. 1970 Apr;103(4):411-3.



- [214] Olsson CA, Moyer JD, Laferte RO. Pulmonary cancer metastatic to the kidney--a common renal neoplasm. *J Urol.* 1971 Apr;105(4):492-6.
- [215] Onuigbo WI. The spread of lung cancer to the kidneys. *Cancer.* 1958 Jul-Aug;11(4):737-9.
- [216] Klinger ME. Secondary tumors of the genito-urinary tract. *J Urol.* 1951 Jan;65(1):144-53.
- [217] Bardales RH, Pitman MB, Stanley MW, Korourian S, Suhrland MJ. Urine cytology of primary and secondary urinary bladder adenocarcinoma. *Cancer.* 1998 Dec 25;84(6):335-43.
- [218] Edgerton ME, Hoda RS, Gupta PK. Cytologic diagnosis of metastatic ovarian adenocarcinoma in the urinary bladder: a case report and review of the literature. *Diagn Cytopathol.* 1999 Mar;20(3):156-9.
- [219] Manning EC, Belenko MI, Frauenhoffer EE, Ahsan N. Acute renal failure secondary to solid tumor renal metastases: case report and review of the literature. *Am J Kidney Dis.* 1996 Feb;27(2):284-91.
- [220] Haddad FS. Metastases to the ureter. Review of the world literature, and three new case reports. *J Med Liban.* 1999 Jul-Aug;47(4):265-71.
- [221] Newsam JE, Tulloch WS. Metastatic tumours in the kidney. *Br J Urol.* 1966 Feb;38(1):1-6.
- [222] Wagle DG, Moore RH, Murphy GP. Secondary carcinomas of the kidney. *J Urol.* 1975 Jul;114(1):30-2.
- [223] Payne RA. Metastatic renal tumours. *Br J Surg.* 1960 Nov;48:310-5.
- [224] Bosniak MA, Stern W, Lopez F, Tehranian N, O'Connor SJ. Metastatic neoplasm to the kidney. A report of four cases studied with angiography and nephrotomography. *Radiology.* 1969 Apr;92(5):989-93 passim.
- [225] Ben-Menachem Y, Marcos J, Wallace S, Medellin H. Angiography of renal metastases. *Br J Radiol.* 1974 Dec;47(564):869-74.
- [226] Galluzzi S, Payne PM. Bronchial carcinoma: a statistical study of 741 necropsies with special reference to the distribution of blood-borne metastases. *Br J Cancer.* 1955 Dec;9(4):511-27.
- [227] Dershaw DD, Bernstein AL. Sonography of lung carcinoma metastatic to the kidney. *Urol Radiol.* 1985;7(3):146-9.
- [228] Becker WE, Schellhammer PF. Renal metastases from carcinoma of the lung. *Br J Urol.* 1986 Oct;58(5):494-8.
- [229] Belghiti D, Hirbec G, Bernaudin JF, Pariente EA, Martin N. Intraglomerular metastases. Report of two cases. *Cancer.* 1984 Nov 15;54(10):2309-12.
- [230] Sridevi D, Jain D, Vasishta RK, Joshi K. Intraglomerular metastasis: a necropsy study. *J Clin Pathol.* 1999 Apr;52(4):307-9.
- [231] Nomura S, Takeda M, Manabe T, Tsukayama C, Tamai H, Ban N, et al. Case report: intraglomerular metastasis with neoplastic cell interposition. *Am J Med Sci.* 1995 Mar;309(3):179-82.
- [232] Cheson BD, Schumann GB, Johnston JL. Urinary cytodiagnosis of renal involvement in disseminated histiocytic lymphoma. *Acta Cytol.* 1984 Mar-Apr;28(2):148-52.
- [233] Pringle JP, Graham RC, Bernier GM. Detection of myeloma cells in the urine sediment. *Blood.* 1974 Jan;43(1):137-43.

- [234] Reinke RT, Higgins CB, Niwayama G, Harris RH, Friedman PJ. Bilateral pulmonary hilar lymphadenopathy. An unusual manifestation of metastatic renal cell carcinoma. *Radiology*. 1976 Oct;121(1):49-53.
- [235] Assouad J, Riquet M, Berna P, Danel C. Intrapulmonary lymph node metastasis and renal cell carcinoma. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2007 Jan;31(1):132-4.
- [236] Wright FW. Enlarged hilar and mediastinal nodes (and especially lower right hilar node enlargement) as a sign of metastasis of a renal tumour. *Clin Radiol*. 1977 Jul;28(4):431-6.
- [237] Dittmar T, Heyder C, Gloria-Maercker E, Hatzmann W, Zanker KS. Adhesion molecules and chemokines: the navigation system for circulating tumor (stem) cells to metastasize in an organ-specific manner. *Clin Exp Metastasis*. 2008;25(1):11-32.
- [238] Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*. 2001 Mar 1;410(6824):50-6.
- [239] Moser B, Willmann K. Chemokines: role in inflammation and immune surveillance. *Annals of the rheumatic diseases*. 2004 Nov;63 Suppl 2:ii84-ii9.
- [240] Moser B, Wolf M, Walz A, Loetscher P. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends in immunology*. 2004 Feb;25(2):75-84.
- [241] Burger JA, Kipps TJ. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood*. 2006 Mar 1;107(5):1761-7.
- [242] Phillips RJ, Burdick MD, Lutz M, Belperio JA, Keane MP, Strieter RM. The stromal derived factor-1/CXCL12-CXC chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Jun 15;167(12):1676-86.
- [243] Kucia M, Jankowski K, Reza R, Wyszczynski M, Bandura L, Allendorf DJ, et al. CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion. *J Mol Histol*. 2004 Mar;35(3):233-45.
- [244] Balkwill F. The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. *Semin Cancer Biol*. 2004 Jun;14(3):171-9.
- [245] Zlotnik A. Chemokines in neoplastic progression. *Semin Cancer Biol*. 2004 Jun;14(3):181-5.
- [246] Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*. 2000 Feb;12(2):121-7.
- [247] Su L, Zhang J, Xu H, Wang Y, Chu Y, Liu R, et al. Differential expression of CXCR4 is associated with the metastatic potential of human non-small cell lung cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2005 Dec 1;11(23):8273-80.
- [248] Reckamp KL, Figlin RA, Burdick MD, Dubinett SM, Elashoff RM, Strieter RM. CXCR4 expression on circulating pan-cytokeratin positive cells is associated with survival in patients with advanced non-small cell lung cancer. *BMC Cancer*. 2009;9:213.
- [249] Vicari AP, Caux C. Chemokines in cancer. *Cytokine & growth factor reviews*. 2002 Apr;13(2):143-54.
- [250] Strieter RM. Chemokines: not just leukocyte chemoattractants in the promotion of cancer. *Nature immunology*. 2001 Apr;2(4):285-6.
- [251] Forster R, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Muller I, Wolf E, et al. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell*. 1999 Oct 1;99(1):23-33.
- [252] Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, et al. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev*. 2000 Mar;52(1):145-76.

- [253] Dieu MC, Vanbervliet B, Vicari A, Bridon JM, Oldham E, Ait-Yahia S, et al. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med*. 1998 Jul 20;188(2):373-86.
- [254] Willimann K, Legler DF, Loetscher M, Roos RS, Delgado MB, Clark-Lewis I, et al. The chemokine SLC is expressed in T cell areas of lymph nodes and mucosal lymphoid tissues and attracts activated T cells via CCR7. *Eur J Immunol*. 1998 Jun;28(6):2025-34.
- [255] Moretta A. Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues. *Nat Rev Immunol*. 2002 Dec;2(12):957-64.
- [256] Gunn MD, Tangemann K, Tam C, Cyster JG, Rosen SD, Williams LT. A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jan 6;95(1):258-63.
- [257] Yanagihara S, Komura E, Nagafune J, Watarai H, Yamaguchi Y. EBI1/CCR7 is a new member of dendritic cell chemokine receptor that is up-regulated upon maturation. *J Immunol*. 1998 Sep 15;161(6):3096-102.
- [258] Yoshida R, Nagira M, Imai T, Baba M, Takagi S, Tabira Y, et al. EBI1-ligand chemokine (ELC) attracts a broad spectrum of lymphocytes: activated T cells strongly up-regulate CCR7 and efficiently migrate toward ELC. *Int Immunol*. 1998 Jul;10(7):901-10.
- [259] Yoshida R, Nagira M, Kitaura M, Imagawa N, Imai T, Yoshie O. Secondary lymphoid-tissue chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor CCR7. *J Biol Chem*. 1998 Mar 20;273(12):7118-22.
- [260] Geissmann F, Dieu-Nosjean MC, Dezutter C, Valladeau J, Kayal S, Leborgne M, et al. Accumulation of immature Langerhans cells in human lymph nodes draining chronically inflamed skin. *J Exp Med*. 2002 Aug 19;196(4):417-30.
- [261] Gunn MD, Kyuwa S, Tam C, Kakiuchi T, Matsuzawa A, Williams LT, et al. Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *J Exp Med*. 1999 Feb 1;189(3):451-60.
- [262] Banas B, Wornle M, Berger T, Nelson PJ, Cohen CD, Kretzler M, et al. Roles of SLC/CCL21 and CCR7 in human kidney for mesangial proliferation, migration, apoptosis, and tissue homeostasis. *J Immunol*. 2002 May 1;168(9):4301-7.
- [263] Cabioglu N, Yazici MS, Arun B, Broglio KR, Hortobagyi GN, Price JE, et al. CCR7 and CXCR4 as novel biomarkers predicting axillary lymph node metastasis in T1 breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2005 Aug 15;11(16):5686-93.
- [264] Andre F, Cabioglu N, Assi H, Sabourin JC, Delaloge S, Sahin A, et al. Expression of chemokine receptors predicts the site of metastatic relapse in patients with axillary node positive primary breast cancer. *Ann Oncol*. 2006 Jun;17(6):945-51.
- [265] Kodama J, Hasengaowa, Kusumoto T, Seki N, Matsuo T, Ojima Y, et al. Association of CXCR4 and CCR7 chemokine receptor expression and lymph node metastasis in human cervical cancer. *Ann Oncol*. 2007 Jan;18(1):70-6.
- [266] Mashino K, Sadanaga N, Yamaguchi H, Tanaka F, Ohta M, Shibuta K, et al. Expression of chemokine receptor CCR7 is associated with lymph node metastasis of gastric carcinoma. *Cancer research*. 2002 May 15;62(10):2937-41.
- [267] Gunther K, Leier J, Henning G, Dimmler A, Weissbach R, Hohenberger W, et al. Prediction of lymph node metastasis in colorectal carcinoma by expression of chemokine receptor CCR7. *International journal of cancer*. 2005 Sep 20;116(5):726-33.
- [268] Li J, Sun R, Tao K, Wang G. The CCL21/CCR7 pathway plays a key role in human colon cancer metastasis through regulation of matrix metalloproteinase-9. *Dig Liver Dis*. Jan;43(1):40-7.

- [269] Zhao B, Cui K, Wang CL, Wang AL, Zhang B, Zhou WY, et al. The chemotactic interaction between CCL21 and its receptor, CCR7, facilitates the progression of pancreatic cancer via induction of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Journal of hepatobiliary-pancreatic sciences*. May 19.
- [270] Burger JA, Stewart DJ, Wald O, Peled A. Potential of CXCR4 antagonists for the treatment of metastatic lung cancer. *Expert review of anticancer therapy*. Apr;11(4):621-30.
- [271] Otsuka S, Bebb G. The CXCR4/SDF-1 chemokine receptor axis: a new target therapeutic for non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2008 Dec;3(12):1379-83.
- [272] Bates AW, Baithun SI. The significance of secondary neoplasms of the urinary and male genital tract. *Virchows Arch*. 2002 Jun;440(6):640-7.
- [273] Bivalacqua TJ, Alphas H, Aksentijevich I, Schaeffer EM, Schoenberg MP. Paraneoplastic polyarthritides from non-small-cell lung cancer metastatic to the bladder. *J Clin Oncol*. 2007 Jun 20;25(18):2621-3.
- [274] Bates AW, Baithun SI. Secondary neoplasms of the bladder are histological mimics of nontransitional cell primary tumours: clinicopathological and histological features of 282 cases. *Histopathology*. 2000 Jan;36(1):32-40.



