



## Disertační práce

**Detekce mikrometastáz v hilových a mediastinálních  
lymfatických uzlinách u primárních a sekundárních  
plicních nádorů metodami OSNA a imunohistochemie**

**MUDr. Šárka Vejvodová**  
Plzeň 2020

**Univerzita Karlova**  
**Lékařská fakulta v Plzni**

Doktorský studijní program

Studijní obor: Chirurgie

Doktorská disertační práce

**Detekce mikrometastáz v hilových a mediastinálních  
lymfatických uzlinách u primárních a sekundárních  
plicních nádorů metodami OSNA a imunohistochemie**

**MUDr. Šárka Vejvodová**

Školitel: doc. MUDr. Josef Vodička, Ph.D.

Chirurgická klinika  
Plzeň 2020

## **Prohlášení**

Disertační práci jsem vypracovala samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů. Tato práce nebyla použita k získání stejného ani jiného akademického titulu.

MUDr. Šárka Vejvodová

## Poděkování

Úvodem bych chtěla poděkovat panu prof. MUDr. V. Třeškovi, DrSc. za kontrolu mé disertační práce a za velkou příležitost pracovat pod jeho vedením na Chirurgické klinice v Plzni. Mé velké poděkování patří zejména mému školiteli doc. MUDr. J. Vodičkovi, Ph.D. Děkuji mu za precizní vedení mého doktorandského studia, za pomoc při psaní této práce, jeho cenné rady a připomínky, kterých si velmi vážím a bez nichž by tato práce nikdy nevznikla. Mé poděkování patří též prim. MUDr. V. Špidlenovi, který mně, společně s mým školitelem, zasvětili do oboru hrudní chirurgie a zároveň předali a předávají své bohaté dlouholeté zkušenosti v tomto výjimečném oboru. Mé další poděkování patří doc. RNDr. M. Peštovi, Ph.D. a prim. MUDr. P. Mukenšablovi, Ph.D. za spolupráci při zpracování vzorků u jednotlivých pacientů. Velké díky patří i sestřám z operačních sálů, které mně s trpělivostí pomáhaly při zpracování lymfatických uzlin na sále. Dále děkuji sestřám z oddělení C Chirurgické kliniky, jmenovitě staniční sestře J. Cingrošové. V neposlední řadě děkuji mé rodině za jejich podporu.

## Seznam zkratek

cDNA	Complementary DNA, komplementární DNA
CK19	Cytokeratin 19
ET	Extensive disease, extenzivní stádium malobuněčného karcinomu plic
IASLC	The International Association for the study of Lung Cancer, Mezinárodní asociace pro studium rakoviny plic
LAMP	Loop mediated izothermal amplification, izotermální amplifikace zprostředkovaná smyčkou
LD	Limited disease, limitované onemocnění malobuněčného karcinomu plic
LU	Lymfatická uzlina
M-D mapa	Mapa lymfatických uzlin dle Mountain-Dresler
mRNA CK 19	Messenger RNA CK 19, mediátorová ribonukleová kyselina pro cytokeratin 19
NOR	Národní onkologický registr
NSCLC	Non-small cell lung cancer, nemalobuněčný karcinom plic
SABR	Stereotactic ablative radioterapy, stereotaktická radioablace
SCLC	Small cell lung cancer, malobuněčný karcinom plic
UICC	International Union Against Cancer, Mezinárodní unie proti rakovině
WHO	World Health Organization, Světová zdravotnická organizace

## Obsah

Prohlášení .....	3
Poděkování .....	4
Seznam zkratek .....	5
1 Abstrakt .....	8
2 Summary .....	10
3 Teoretická část.....	12
3.1 Epidemiologie primárních plicních nádorů .....	12
3.1.1 Incidence .....	12
3.1.2 Letalita.....	14
3.2 Epidemiologie sekundárních plicních nádorů .....	15
3.2.1 Incidence .....	15
3.2.2 Doba přežití pacientů s plicními metastázami.....	17
3.3 Histologická klasifikace maligních primárních plicních nádorů .....	20
3.4 Klasifikační systémy karcinomu plic .....	22
3.5 Doporučené léčebné postupy pro karcinom plic .....	26
3.5.1 Léčba časného stádia nemoci (klinické stádium I a II) .....	26
3.5.2 Léčba pokročilého stádia nemoci (stádium III).....	27
3.5.3 Léčba metastatického stádia (stádium IV) .....	28
3.6 Doporučené léčebné postupy pro plicní metastázy .....	28
3.7 Chirurgická léčba plicního karcinomu .....	29
3.8 Chirurgická léčba plicních metastáz.....	31
3.9 Odběr uzlin .....	32
3.10 Vyšetření lymfatických uzlin .....	35
3.10.1 Histologické vyšetření.....	35
3.10.2 Imunohistochemie .....	36
3.10.3 OSNA metoda .....	37

4	Studie.....	41
4.1	Cíl práce.....	41
4.2	Hypotéza.....	42
4.3	Materiál a metodika.....	44
4.3.1	Soubor nemocných.....	44
4.3.2	Operační postup.....	44
4.3.3	Zpracování lymfatických uzlin.....	44
4.3.4	Histopatologické a imunohistochemické vyšetření.....	47
4.3.5	Metoda OSNA.....	47
4.4	Hodnocení výsledků.....	47
4.5	Výsledky.....	49
4.5.1	Soubor nemocných.....	49
4.5.2	Odběr lymfatických uzlin.....	51
4.5.3	Postižení lymfatických uzlin metastatickým procesem.....	51
4.5.4	Míra shody metod OSNA, IHC CK 19 a H-E.....	51
4.5.5	Senzitivita, specifita a prediktivní hodnoty metody OSNA a IHC-CK 19.....	55
4.5.6	Změna klinického stadia na podkladě získaných výsledků.....	57
4.5.7	Délka přežití a recidiva onemocnění.....	59
5	Diskuze.....	70
6	Závěr.....	76
7	Seznam obrázků.....	77
8	Seznam tabulek.....	78
9	Literatura.....	80
10	Příloha.....	91
	Informovaný souhlas pacienta.....	91
11	Seznam vlastních publikací.....	94

# 1 Abstrakt

*Úvod:* Doporučené postupy pro léčbu karcinomu plic, ale i plicních metastáz, se odvíjí od morfologické diagnózy nádoru a klinického stadia nemoci. Správné určení stadia nemoci umožní zvolit optimální léčebnou strategii, proto je důležité co nejpřesnější stanovení TNM klasifikace. Stav lymfatických uzlin pak determinuje, spolu s velikostí primárního tumoru či počtem metastáz, podání adjuvantní onkologické léčby. Dle doporučených postupů standardní chirurgická léčba nádorového onemocnění plic spočívá v radikálním odstranění nádoru a v systematické nodální disekci lymfatických uzlin (LU), resp. v indikovaných případech lobárně specifické lymfadenektomií. Odebrané lymfatické uzliny jsou podrobeny standardnímu histopatologickému vyšetření, které je schopné spolehlivě detektovat makrometastázy, avšak mikrometastázy nemusí být tímto postupem vždy odhaleny. Může tak nastat situace, kdy jsou sice lymfatické uzliny shledány při běžném histologickém vyšetření nepostižené nádorovou diseminací, přesto ale mohou obsahovat mikrometastázy. Jelikož karcinomy jsou nádory epiteliálního původu, jejich základními proteiny intermediárního cytoskeletu jsou cytokeratiny (CK). Tohoto poznatku lze využít i při detekci mikrometastáz v regionálních lymfatických uzlinách. Poněvadž nepostižené lymfatické uzliny jsou tvořené pojivovou tkání a imunitními buňkami, které cytokeratiny neobsahují, průkaz cytokeratinů v odebraných lymfatických uzlinách je ukazatelem postižení uzlin metastatickým procesem. Cytokeratinů je celá škála, ale nejspecifičtějším pro diagnostiku u primárních plicních karcinomů nebo plicních metastáz karcinomů je cytokeratin 19 (CK19). Možnosti detekce CK19 nabízí imunohistochemické vyšetření stanovením cytokeratinu 19 a molekulárně genetická metoda OSNA (One-Step Nucleic Acid Amplification) na podkladě stanovení mRNA CK19 metodou RT-LAMP (RT-LAMP; Reverse Transcription – Loop Mediated Isothermal Amplification).

*Cíl:* Cílem naší studie bylo ověření možnosti senzitivnější detekce výskytu mikrometastáz v regionálních lymfatických uzlinách u pacientů s primárním plicním karcinomem nebo plicními metastázami kolorektálního karcinomu prostřednictvím IHC CK19 a metody OSNA ve srovnání s vyšetřením H&E a zhodnocení přítomnosti mikrometastáz v lymfatických uzlinách k follow-up těchto nemocných.

*Materiál a metodika:* Do prospektivní studie probíhající na Chirurgické klinice FN Plzeň v období od února 2013 do listopadu 2017 bylo zařazeno 100 pacientů operovaných pro primární nemalobuněčný plicní karcinom či plicní metastázu kolorektálního karcinomu. Celý soubor pacientů byl operován klasickou operační technikou, přístupem byla zvolena posterolaterální torakotomie. U primárních plicních nádorů byla nejmenším výkonem



lobektomie. U sekundárních plicních nádorů byl rozsah výkonu určován dle počtu, velikosti a lokalizace metastáz. Současně u všech nemocných byla provedena systematická nodální disekce. Všechny uzliny byly vyšetřeny třemi různými metodami: barvením hematoxylin-eosin, imunohistochemicky s protilátkou CK19 a metodou OSNA. Všechny získané výsledky byly porovnány a statisticky zpracovány.

*Výsledky:* Z dosažených výsledků vyšetření 1429 lymfatických uzlin u 100 nemocných vyplývá, že nejpreciznější diagnostickou metodou vyšetření lymfatických uzlin je molekulární metoda OSNA, kde míra up-stagingu ve srovnání s histologickou metodou byla 16 %. Oproti našemu očekávání imunohistochemická metoda ve srovnání se standardně doporučovanou histologickou metodou vyšetřování uzlin se jeví jako nepřínosná. Celková doba přežití se na rozdíl od našeho očekávání statisticky významně nezměnila, avšak časový interval sledování od data operace je dosud velmi krátký.

*Závěr:* Z dosažených výsledků vyplývá, že ve srovnání se standardně doporučovanou histologickou metodou vyšetřování uzlin se imunohistochemická metoda jeví jako nepřínosná, poněvadž výsledky získané tímto vyšetřením byly srovnatelné s výsledky histologických metod. Nejpreciznější diagnostickou metodou vyšetření lymfatických uzlin na přítomnost metastatického postižení epiteliálních plicních nádorů nebo plicních metastáz epiteliálních nádorů (v naší studii plicní metastázy kolorektálního karcinomu) je metoda OSNA. Zavedením této metody do rutinní praxe by došlo k up-stagingu nemocných, u kterých klinické stadium nemoci bylo při vyšetření standardní histologickou metodou podhodnoceno, a tito pacienti by mohli dostat adekvátní adjuvantní onkologickou léčbu, která v případě postižení lymfatických uzlin metastatickým procesem, resp. ve vyšších stadiích nemoci, je plně indikována. Celková doba přežití se na rozdíl od našeho očekávání statisticky významně nezměnila, avšak dle našeho názoru je důležité další pečlivé sledování nemocných.

## 2 Summary

*Introduction:* Current guidelines for treatment of lung cancer and lung metastases are based on morphology of the tumor and clinical stage of the disease. Correct determination of disease stage allows us to choose the optimal treatment therefore it is mandatory to determine the TNM classification as accurately as possible. State of lymphatic nodes together with the size of the primary tumor and the number of the metastases determine the adjuvant oncological therapy. According to guidelines, standard oncological treatment of pulmonary cancer, consist in radical removal of tumor tissue and in systematic nodal dissection, or more precisely in the specific lobar lymphadenectomy in indicated cases. The removed nodes are subjected to standard histopathological evaluation, which is able to reliably identify macrometastases, although micrometastases may not always be detected. There may be a situation, when lymph nodes are not found to be affected by cancer dissemination during the common histopathological evaluation, but may still contain micrometastases. Since carcinomas are tumors of epithelial origin, their essential proteins of intermediate cytoskeleton are the cytokeratins (CK). This fact can be used to detect micrometastases in regional lymph nodes. Since unaffected lymph nodes are formed by connective tissue and immune system cells where no cytokeratins are present, the verification of cytokeratins in removed lymph nodes is an indicator of the metastatic process in this tissue. There is a wide range of CK, but the most specific for diagnostic process in primary lung tumor or lung metastates of carcinoma is CK19. The possibilities of detection of CK19 offer evaluation of CK19 and also molecular-genetic method OSNA (One-Step Nucleic Acid Amplification) based on an assessment of mRNA CK19 by RT-LAMP method (Revers Transcription – Loop-Mediated Isothermal Amplification).

*Aim:* The aim of our study was to verify the possibilities of more sensitive detection of micrometastases in regional lymph nodes in patients with lung cancer or with pulmonary metastases of colorectal carcinoma due to IHC CK19 and OSNA method in comparison with HE staining and the assessment of the presence of micrometastases in nodes to follow-up these patients.

*Material and methods:* 100 surgically treated patients for primary non-small cell lung tumor or pulmonary metastases of colorectal carcinoma were enrolled to our study in the period since February 2013 to November 2017 in Surgical Department of Faculty Hospital in Pilsen. The whole cohort was surgically treated by posterolateral thoracotomy. Lobectomy was the smallest procedure in case of primary lung tumor. In lung metastases, the extent of procedure was determined by the number, size and location of the metastases. Simultaneously, systematic

nodal dissection was performed in all patients. All nodes were examined by three different methods: HE staining, immunohistochemically with CK19 antibody and by OSNA method. All obtained results were compared and statistically processed.

*Results:* From achieved results of an evaluation of 1429 of lymph nodes in 100 patients indicate that the most accurate diagnostic method of examination of lymphatic nodes is molecular OSNA method, where the rate of up-staging was 16% in comparison to the histologic method. Contrary to our expectation, the immunohistochemical method in comparison to the standard recommended histopathological methods of lymph nodes evaluation looks appears to be without contribution. Overall survival contrary to our expectation did not change significantly, although the follow-up is still short.

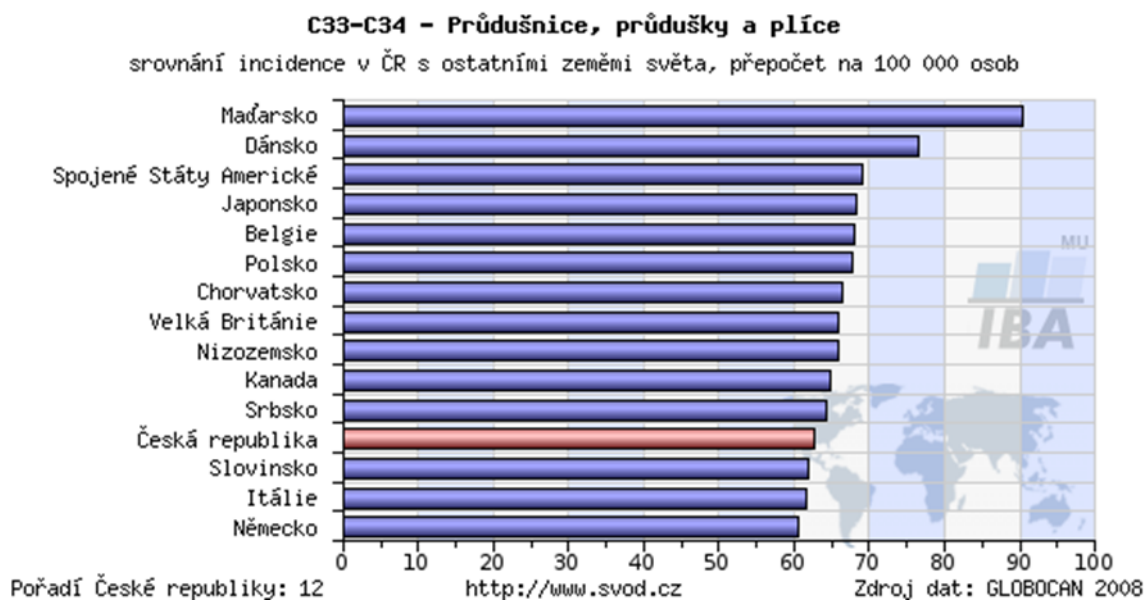
*Conclusion:* Our results show, that in comparison with standard histopathological method of examination of lymphatic nodes, the immunohistochemical method appears to be without any contribution because the results obtained due to this method were compared to the results of histopathological methods. The most accurate diagnostic method of evaluation of lymph nodes for the presence of metastatic process of epithelial lung tumors or lung metastases of the epithelial tumor (in our study the lung metastases of colorectal carcinoma) is the OSNA method. By introducing these methods into routine practice would lead to up-staging of disease in patients, whose clinical stage of disease was during the examination by standard histopathologic method underestimated, and these patients would receive adequate adjuvant oncologic therapy, which is fully indicated in case of the metastatic process in lymph nodes, or more precisely in a higher stage of the disease. The overall survival, contrary to our expectation, was not statistically changed, although according to our opinion, following closely monitoring of these patients is mandatory.

## 3 Teoretická část

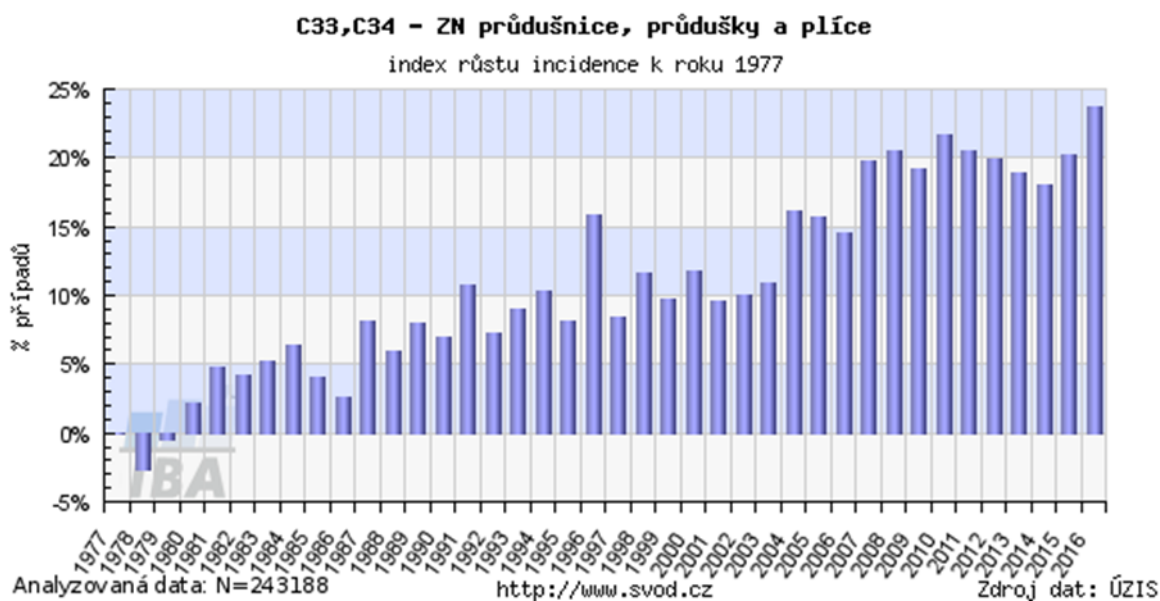
### 3.1 Epidemiologie primárních plicních nádorů

#### 3.1.1 Incidence

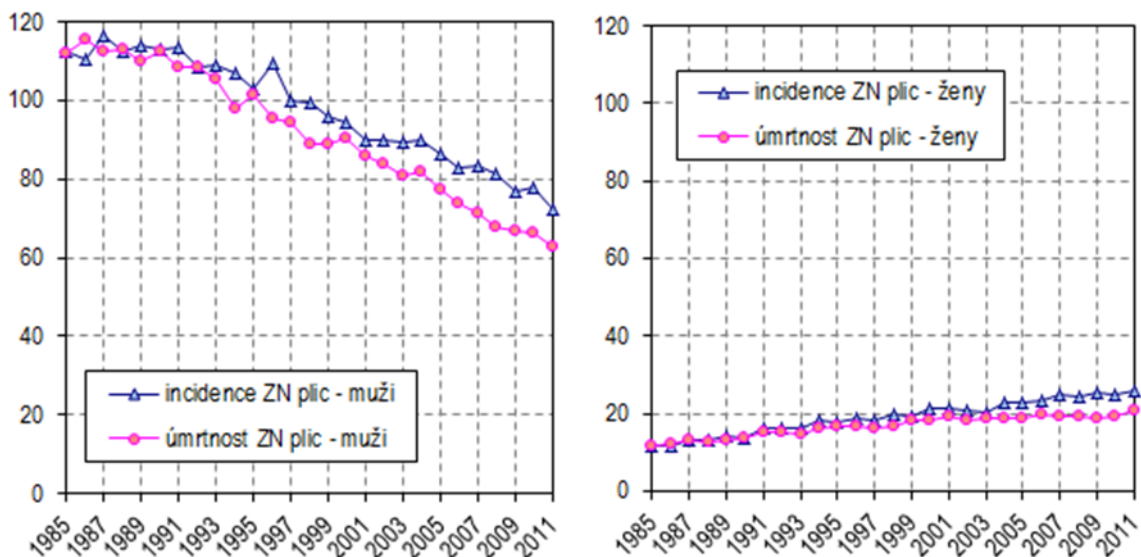
V roce 2018 bylo celosvětově diagnostikováno 18 078 957 pacientů s nádorovým onemocněním. V témže roce zemřelo na tuto diagnózu 9 555 027 lidí. Z nově diagnostikovaných případů jde v 11,6 % (tedy 2 093 876 pacientů) o nemocné s nádorovým onemocněním plic. Nejvíce osob s plicním nádorovým onemocněním bylo diagnostikováno v Asii (1 225 029 osob, resp. 58,5 % z celkového počtu nově diagnostikovaných nádorů plic), druhé místo zaujímá Evropa s počtem 470 039 (22,4 %) a na třetím místě je Severní Amerika s počtem 252 746 (12,1 %) nových případů [1–3]. Ačkoliv bylo počátkem dvacátého století nádorové onemocnění plic řazeno mezi relativně vzácná onemocnění, ze statistických údajů je signifikantní, že v průběhu 20. století došlo k výrazné progresi incidence, která v posledních letech zůstává vysoká, ale stacionární. Například v USA National Cancer Institute v programu The Surveillance epidemiology and results (SEER) prokazuje incidenci 58,7 na 100 000 lidí za rok [2]. V České republice Národní onkologický registr (NOR) zaznamenává roční incidenci 62,6/100 000 obyvatel. Ve většině převažují muži (91,7/100 000) nad ženami (34,7 žen /100 000 obyvatel) [4, 5]. Díky vysoké incidenci zaujímá Česká republika 12. místo ve srovnání s ostatními evropskými státy a USA (viz obrázek 1). V období 2011-2015 byl bronchogenní karcinom v České republice z hlediska incidence třetím nejčastějším zhoubným nádorovým onemocněním u žen i u mužů. I přes známky stabilizace celkových hodnot incidence, je však výrazný rozdíl indexu růstu incidence mezi muži a ženami (viz obrázek 2, 3) [6, 7]. Index růstu incidence vztahený k roku 2005 dosáhl u mužů záporných hodnot ( -11 % procent), zatímco u žen je hodnota stále kladná (+35 %) [7]. Avšak i přes tyto hodnoty stále mezi pacienty významně převažují muži. Stabilizace incidence je zejména důsledkem míry populačního rizika bronchogenního karcinomu, u mužů se vzestup zastavil v 80. letech 20. století. Zcela opačný vývoj je u žen. Nárůst incidence odpovídá nejen rozdílným kuřáckým návykům u obou pohlaví, ale i demografickému stárnutí populace, protože bronchogenní karcinom je onemocněním starších osob a riziko onemocnění u žen i mužů výrazně stoupá po dosažení 50 let věku. Incidence a mortalita jsou u mužů téměř dvojnásobné ve srovnání s ženami (v České republice je 4269 nově diagnostikovaných případů u mužů versus 2215 nově diagnostikovaných případů u žen [4, 7]).



**Obrázek 1** - Incidence karcinomu plic v evropských zemích [4]



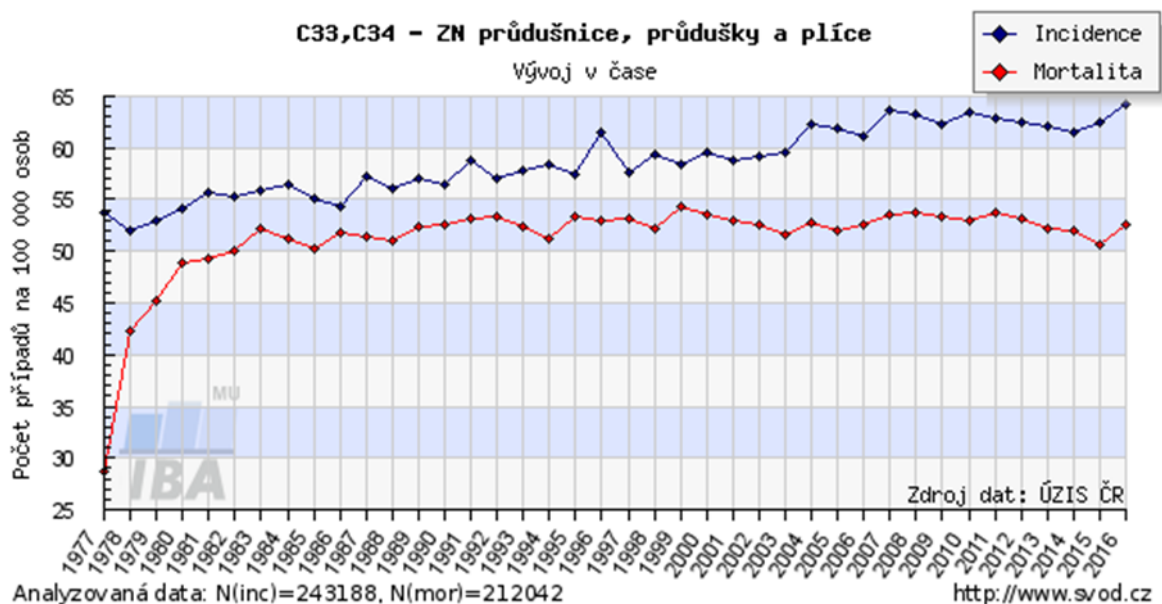
**Obrázek 2** - Index růstu incidence v České republice [4]



**Obrázek 3** – Incidence ZN plic v ČR u mužů a žen [4]

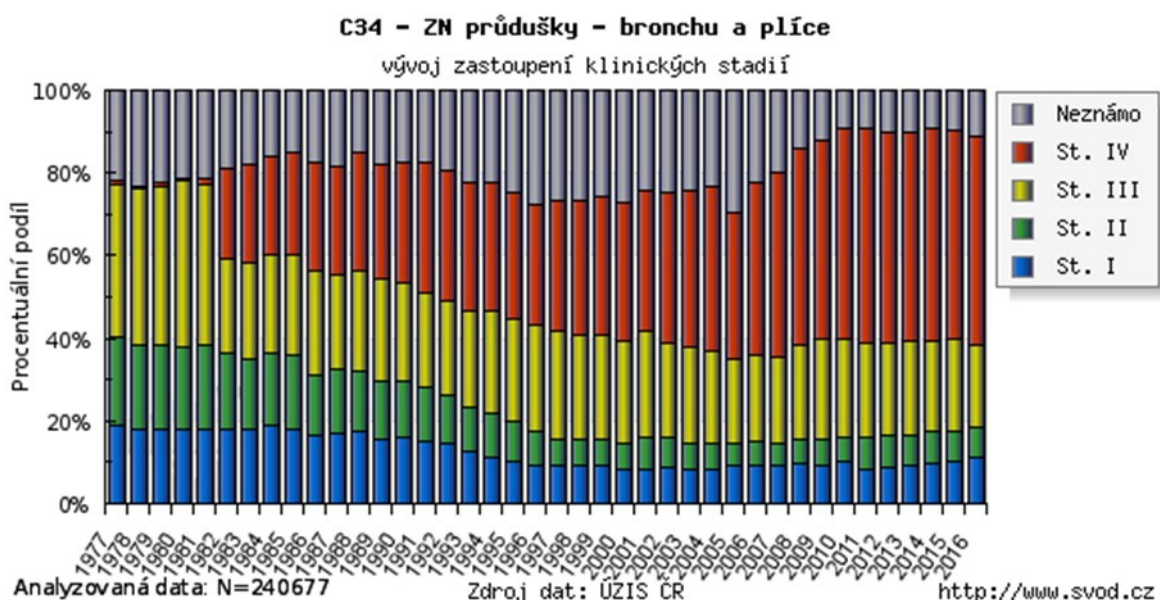
### 3.1.2 Letalita

Ačkoliv incidence bronchogenního karcinomu je v posledních letech téměř stabilní, úmrtnost na toto onemocnění je stále vysoká (viz obrázek 4). Celosvětově je letalita (čili smrtnost) na toto onemocnění udávána kolem 47,2/100 000 nemocných [1, 2]. V České republice je bronchogenní karcinom na prvním místě úmrtnosti na onkologické onemocnění u mužů. U žen na místě třetím [7].



**Obrázek 4** - Incidence a mortalita ZN průdušnice, průdušek a plic v závislosti na čase v ČR [4]

Vysoká letalita je zapříčiněna zejména pozdní diagnostikou onemocnění. Příčinou pozdní diagnostiky je absence klinických příznaků časného stádia onemocnění a dosud neexistující plošný screening, který by odhalil bronchogenní karcinom v časném stádiu nemoci. Pasivní depistáží je diagnostikováno 70 % onemocnění v pokročilých stádiích nemoci [6, 7]. Důsledkem toho je letalita stále velmi vysoká, z ročních nově diagnostikovaných cca 6500 pacientů zemře 5500 pacientů ve věku 62-75 let, až 16 % nemocných jsou pacienti pod věkovou hranicí 60 let [4–6]. K operační terapii se tedy (při vyloučení nemocných s přidruženými komorbiditami kontraindikující operační výkon) dostane pouze 12 % pacientů [6, 7]. Přehled zastoupení jednotlivých stadií při zjištění diagnózy plicního karcinomu poukazuje následující obrázek 5.



**Obrázek 5** - Zastoupení klinických stadií v čase v době stanovení diagnózy [4]

## 3.2 Epidemiologie sekundárních plicních nádorů

### 3.2.1 Incidence

Plíce jsou druhým nejčastějším orgánem postižovaným metastatickým procesem. Plicní metastázy při multiorgánovém postižení metastatickým procesem nacházíme u 55 % nemocných s nádorovým onemocněním. Incidence metastatického postižení lokalizovaného pouze v plicích je 20 %. Nejčastějšími nádory metastazujícími do plic jsou epitelální nádory a sarkomy, v menším zastoupení melanomy a nádory ze zárodečných buněk (viz tabulka 1) [7]. Mezi nejčastější epitelální nádory metastazující do plic jsou karcinomy prsu, plic, kolorektální

karcinom, karcinom ledvin a karcinom štítné žlázy [7–9]. Počet pacientů s prokázanými plicními metastázami diagnostikovaných během léčby je nižší ve srovnání s pitevními nálezy nemocných, kteří zemřeli na onkologické onemocnění. Incidenci metastáz u jednotlivých nádorů v průběhu léčby a při pitevním nálezu ve srovnání s celkovým počtem nemocných s onkologickým onemocněním zaznamenává tabulka 2. Jednou z nejčastějších malignit je kolorektální karcinom, ročně je celosvětově diagnostikováno 1,36 milionů nových pacientů s tímto onemocněním. Až u 25 % nemocných s prokázaným kolorektálním karcinomem je v době diagnózy prokázano metastatické postižení [10–12]. Nejčastěji jsou postiženy játra a plíce. Při diagnostice metastatického procesu u nemocných s kolorektálním karcinomem jsou až u 10-20 % prokázány plicní metastázy [13]. U 7 % pacientů s kolorektálním karcinomem je prokázano izolované metastatické postižení plic [7, 10–12].

**Tabulka 1** - Přehled nejčastějších nádorů metastazujících do plic [7]

<b>primární nádor</b>	<b>z celkového počtu (%)</b>
epiteliální nádory	75
Sarkomy	15
Melanomy	5
nádory ze zárodečných buněk	2 – 3

**Tabulka 2** - Přehled výskytu plicních metastáz u vybraných typů nádorů [7]

<b>primární nádor</b>	<b>výskyt metastáz během léčby (%)</b>	<b>výskyt metastáz zjištěných při pitvě (%)</b>
Choriokarcinom	60	70 - 100
bronchogenní karcinom	30	40
renální karcinom	20	50 - 75
Osteosarkom	15	75
karcinom varlat	12	70 - 80
karcinom močového měchýře	7	25 - 30
karcinom štítné žlázy	7	65
Melanom	5	66-80
karcinom prsu	4	60
kolorektální karcinom	méně jak 5	20- 40



### 3.2.2 Doba přežití pacientů s plicními metastázami

Prognóza přežití pacientů s plicními metastázami je bez operační terapie nepříznivá a závisí na mnoha faktorech. Až 44 % nemocných umírá v prvních šesti měsících, v průběhu dvou let téměř 91 %. Chirurgická léčba plicních metastáz v indikovaných případech dobu přežití významně prodlužuje [8, 9, 12–17]. Mezinárodní registr plicních metastáz (International registry of lung metastases, IRML) založený v roce 1990 zhodnotil výsledky doby přežití po plicních metastazektomiích u pacientů s plicními metastázami. Zhodnoceny byly výsledky 4572 pacientů z 18 pracovišť hrudní chirurgie z Evropy, Kanady a USA. Bez odlišení původu primárního nádoru pětileté přežití nemocných bylo 36 %, desetileté 26 % a patnáctileté 22 % [18].

Mezi nejdůležitější prognostické faktory přežití patří histologický typ primárního nádoru, disease-free interval od doby dosažení kompletní remise onemocnění, velikost a počet plicních metastáz, postižení regionálních lymfatických uzlin metastatickým procesem a kompletnost resekce [8, 14, 16–18]. Následující výčet prognostických faktorů poukazuje jejich závislost na dobu přežití.

#### 1. Typ primárního nádoru

Původ primárního nádoru a jeho citlivost k onkologické léčbě ovlivňuje délku přežití [14, 16]. Následující tabulka 3 poukazuje na dobu pěti - a desetiletého přežití v závislosti na histologickém typu primárního nádoru při komplexní onkologické léčbě onemocnění [8].

**Tabulka 3** - Délka přežití v závislosti na typu primárního nádoru

<b>primární nádor</b>	<b>5leté přežití (%)</b>	<b>10leté přežití (%)</b>
epiteliální nádory	37	21
Sarkomy	31	26
Melanomy	21	14
nádory ze zárodečných buněk	68	63

## 2. Počet metastáz

Počet metastatických ložisek má vliv na délku přežití. Z dostupných údajů mezinárodního registru pro plicní metastázy delší přežití je u pacientů se solitárními metastázami [18]. Počet metastáz v plicích ovlivňuje též možnost resekce, pravděpodobnost kompletní resekce klesá s počtem metastatických ložisek. Větší počet metastáz vyžaduje větší resekční výkony, což je spojeno s větší morbiditou a mortalitou [11, 12, 18]. Délku přežití v závislosti na počtu metastáz dokumentuje následující tabulka 4.

Tabulka 4 - Délka přežití v závislosti na počtu metastáz [8]

<b>počet metastáz</b>	<b>5letý interval přežití (%)</b>	<b>10letý interval přežití (%)</b>
1	43	31
2 až 3	34	24
4 a více	27	19

## 3. Disease-free interval

Disease-free interval (DFI) je definován jako časový interval mezi dosažením kompletní remise onemocnění a vznikem relapsu. Kratší DFI je obecně negativním prognostickým faktorem délky přežití poukazující na agresivnější typ nádoru jak dokumentuje tabulka 5 [8, 11, 14, 16, 18, 19].

Tabulka 5 - Délka přežití v závislosti na DFI [8]

<b>DFI v měsících</b>	<b>5letý interval přežití (%)</b>	<b>10letý interval přežití (%)</b>
≤ 11	33	27
12 až 35	31	22
≥ 36	45	29

#### 4. Postižení lymfatických uzlin

Procento postižení lymfatických uzlin při metastatickém procesu v plicích je hodnoceno četnými studii. Např. Welter a spol. ve své studii u 169 pacientů prokázaly metastaticky postižené lymfatické uzliny ve 28 % případů. Saito a spol. ve své studii u 138 pacientů prokázali pozitivní nález ve 20 % [8]. I když postižení lymfatických uzlin metastatickým procesem u plicních metastáz není tak časté jako u primárních plicních karcinomů, jejich postižení významně ovlivňuje délku přežití [8, 16, 20]. Srovnání délky přežití u nemocných bez a s postižením lymfatických uzlin u dvou největších studií hodnotící postižení lymfatických uzlin v závislosti na přežití nemocných poukazuje následující tabulka 6.

**Tabulka 6** - Délka přežití v závislosti na postižení lymfatických uzlin (LU) meta procesem [8]

<b>studie</b>	<b>5letý interval přežití (%) u pacientů bez postižení LU</b>	<b>5letý interval přežití (%) u pacientů s postiženými LU</b>
Welter a spol.	42	19
Ercan a spol.	48	10

#### 5. Prognostické skupiny:

Podle počtu metastáz, DFI a kompletnosti resekce lze pacienty s plicními metastázami rozdělit do 4 prognostických skupin [8]. Kritéria zařazení a medián přežití jednotlivých skupin zaznamenává následující tabulka 7.

**Tabulka 7** - Prognostické skupiny [8]

<b>skupina</b>	<b>kompletnost resekce</b>	<b>DFI a počet metastáz</b>	<b>medián přežití</b>
I	R0 resekce	> 36 měsíců, solitární metastáza	61 měsíců
II	R0 resekce	< 36 měsíců nebo mnohočetné metastázy	34 měsíců
III	R0 resekce	< 36 měsíců a mnohočetné metastázy	24 měsíců
IV	R1, R2		14 měsíců

### 3.3 Histologická klasifikace maligních primárních plicních nádorů

Z celkového počtu maligních primárních plicních nádorů je přibližně 98 % zastoupeno pacienty s karcinomem plic. Primární plicní karcinom, též označovaný jako bronchogenní karcinom, je maligní nádor vzniklý z epitelových buněk plic. Histologická klasifikace zavedená Světovou zdravotnickou organizací (World Health Organisation, WHO) klasifikuje dle histologické stavby epitelové maligní plicní nádory na osm typů s podtypy (viz tabulka 8) [7, 8]. Z hlediska biologického chování lze karcinom plic rozdělit na malobuněčný karcinom (small cell lung cancer, SCLC) a nemalobuněčný karcinom (non small cell lung cancer, NSCLC). V minulosti bylo rozdělení na tyto dvě hlavní skupiny vzhledem k dostupné následné léčbě dostačující, avšak s rozvojem specifické terapie pro různé histologické typy je v dnešní době žádoucí specifikace jednotlivých histologických typů za účelem volby adekvátní cílené léčby. Výskyt jednotlivých histologických typů je závislý na pohlaví a na anamnéze kouření. Nejčastějším histologickým typem u žen je v posledních letech adenokarcinom, u mužů pak spinocelulární karcinom [6, 7].

**Tabulka 8 - Základní histologické typy a podtypy primárního plicního karcinomu [7]**

<b>Základní typy karcinomů</b>	<b>Podtypy</b>	<b>Specifikace podtypů</b>
<b>1. Spinoceleulární karcinom</b>	Keratinizující Nekeratinizující Bazaloidní Spinoceleulární karcinom in situ	
<b>2. Adenokarcinom</b>	Lepidický Acinární Papilární Mikropapilární Solidní Invazivní mucinózní Koloidní Fetální Enterický Minimálně invazivní Adenokarcinom in situ	Mucinózní Nemucinózní Mucinózní Nemucinózní
<b>3. Velkobuněčný</b>	Neuroendokrinní Kombinovaný neuroendokrinní	
<b>4. Malobuněčný</b>	Malobuněčný Malobuněčný kombinovaný	
<b>5. Adenoskvamózní</b>		
<b>6. Pleomorfní</b>	Vřetenobuněčný Obrovskobuněčný Karcinosarkom Pulmonální blastom	
<b>7. Karcinom typu slinných žláz</b>	Mukoepidermoidní Adenoidně cystický Epiteliálně myoepiteliální	
<b>8. Ostatní neklasifikované</b>	Lymfoepiteliomu podobný karcinom NUT karcinom	

### 3.4 Klasifikační systémy karcinomu plic

Základním klasifikačním systémem pro plicní karcinom je TNM klasifikace vytvořená v letech 1943-1952 Pierrem Denoixem[21]. TNM klasifikace je opakovaně aktualizována společnostmi UICC (International Union Against Cancer) a AJCC (American Joint Committee on Cancer) . Původní TNM klasifikace pro plicní karcinomy byla vytvořena v roce 1970 v Houstonu (University of Texas MD Anderson Cancer Center). V současnosti je platné 8. vydání TNM klasifikace z roku 2017, která byla vytvořena na podkladě dat databáze IASLC (The International Association for the Study of Lung Cancer) - viz tabulky 9-11 [21–23]. TNM klasifikace nejen precizně hodnotí aktuální stav nemoci, čímž umožňuje zvolení optimálního způsobu léčby, ale při stanovení re-stagingu nemoci po léčbě vede i ke sledování léčebného efektu.

Malobuněčný karcinom, tvořící cca 15-20 % všech primárních plicních nádorů, se vyznačuje rychlým, agresivním typem růstu a chemosenzitivitou. U malobuněčného karcinomu plic se v klinické praxi využívá tzv. VALG systém klasifikace vytvořený v roce 1989 společností Veterans Administration Lung Cancer Study Group. Tato klasifikace dělí podle rozsahu postižení malobuněčný karcinom na tzv. limitované onemocnění (limited disease, LD) a extenzivní stadium (extensive disease, ED) [7, 8, 24].

**Tabulka 9** - T-charakteristika nádoru [7, 22]

<b>T</b>	<b>Charakteristika nádoru</b>
<b>Tx</b>	Přítomnost nádoru signalizují nádorové buňky ve sputu nebo bronchiálním výplachu, samotný nádor nebyl prokázán zobrazovacími vyšetřeními ani bronchoskopicky.
<b>T0</b>	Bez příznaků přítomnosti primárního nádoru.
<b>Tis</b>	Karcinom in situ.
<b>T1</b>	Nádor $\leq 3$ cm v největším rozměru, obklopený plicní tkání nebo viscerální pleurou. Bronchoskopicky je limitován po lobární bronchus, tzn. nádor se nešíří do hlavního bronchu. Zahrnuje i méně běžné povrchové šíření nádoru neprorůstajícího stěnu bronchu, který se může šířit proximálně až do hlavního bronchu
T1a(mi)	Minimálně invazivní adenokarcinom (solitární adenokarcinom $\leq 3$ cm s predominantně lepidickým růstem a $\leq 5$ mm invazí v největším rozměru).
T1a	Nádor $\leq 1$ cm v největším rozměru.
T1b	Nádor $>1$ cm a zároveň $\leq 2$ cm v největším rozměru.
T1c	Nádor $> 2$ cm a zároveň $\leq 3$ cm v největším rozměru.
<b>T2</b>	Nádor $> 3$ cm a zároveň $\leq 5$ cm nebo splňuje nejméně jedno z následujících kritérií (postihuje hlavní bronchus a nezáleží na vzdálenosti od kariny, invaze do viscerální pleury, podmiňuje atelektázu nebo obstrukční bronchopneumonii v rozsahu menším než je celá plíce)
T2a	Nádor je $> 3$ cm, ale $\leq 4$ cm v největším rozměru.
T2b	Nádor je $> 4$ cm, ale $\leq 5$ cm v největším rozměru.
<b>T3</b>	Nádor je $> 5$ cm a $< 7$ cm nebo nádor šířící se do hrudní stěny (včetně nádorů horní hrudní apertury), frenického nervu, parietálního perikardu nebo nádor vytvářející satelitní ložiska ve stejném laloku jako primární nádor.
<b>T4</b>	Nádor $> 7$ cm nebo nádor šířící se do bránice, mediastina, srdce, velkých cév, průdušnice, nervus laryngeus recurrens, jícnu, obratlových těl nebo nádor vytvářející satelitní ložiska v jiném ipsilaterálním laloku než primární nádor.

**Tabulka 10** - Charakteristika postižení LU [7, 22]

<b>N</b>	<b>Charakteristika postižení lymfatických uzlin</b>
NX	Regionální lymfatické uzliny není možné hodnotit.
N0	Bez přítomnosti metastáz v regionálních lymfatických uzlinách.
N1	Metastázy v ipsilaterálních peribronchiálních a/nebo ipsilaterálních hilových uzlinách a intrapulmonálních uzlinách včetně postižení přímým prorůstáním primárního nádoru.
N2	Metastázy v ipsilaterálních mediastinálních a/nebo subkarinních lymfatických uzlinách.
N3	Metastázy v: <ul style="list-style-type: none"> <li>- kontralaterálních mediastinálních uzlinách</li> <li>- kontralaterálních hilových uzlinách</li> <li>- ipsilaterálních nebo kontralaterálních skalenových nebo supraklavikulárních lymfatických uzlinách</li> </ul>

**Tabulka 11** - Charakteristika přítomnosti vzdálených metastáz [7, 22]

<b>M</b>	<b>Charakteristika přítomnosti vzdálených metastáz</b>
<b>M0</b>	Vzdálené metastázy nejsou přítomny.
<b>M1a</b>	Separátní nádorové noduly v kontralaterálním laloku, maligní pleurální nebo perikardiální výpotek.
<b>M1b</b>	Jediná vzdálená metastáza postihující jeden orgán mimo hrudník (zahrnuje i jednu uzlinu mimo regionálních)
<b>M1c</b>	Vícečetné metastatické postižení v jednom nebo více orgánech mimo hrudník.



TNM klasifikace na podkladě velikosti primárního plicního nádoru, postižení hilových a mediastinálních lymfatických uzlin a dle přítomnosti vzdálených metastáz rozlišuje čtyři klinická stádia, která jsou dělena ještě na podskupiny. Přehled klinických stádií bronchogenního karcinomu podle 8. vydání TNM klasifikace ukazuje následující tabulka 12 [7, 22].

**Tabulka 12 - Klinická stádia dle pTNM**

<b>Stadium</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
<b>0</b>	Tis	N0	M0
<b>IA1</b>	T1a(mi)	N0	M0
<b>IA2</b>	T1b	N0	M0
<b>IA3</b>	T1c	N0	M0
<b>IB</b>	T2a	N0	M0
<b>IIA</b>	T2b	N0	M0
<b>IIB</b>	T1a-c, T2a, b	N1	M0
	T3	N0	M0
<b>IIIA</b>	T1a-c, T2a, b	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
<b>IIIB</b>	T1a, T1b, T1c, T2a, T2b	N3	M0
	T3	N2	M0
	T4	N2	M0
<b>IIIC</b>	T3	N3	M0
	T4	N3	M0
<b>IVA</b>	T (jakékoliv)	N (jakékoliv)	M1a
			M1b
<b>IVB</b>	T (jakékoliv)	N (jakékoliv)	M1c

Každé klinické stádium zahrnuje nádory s podobnou prognózou, každé stádium nemoci má doporučený postup léčby. Rapidně v závislosti na klinickém stádiu též klesá interval pětiletého přežití. Pokud je onemocnění ve stádiu lokalizovaném onemocnění, tzn. malý nádor bez postižení lymfatických uzlin, pětiletý interval přežití se pohybuje při adekvátní terapii v průměru kolem 54,8 %. Při regionálním šíření do lymfatických uzlin se procento přežití pohybuje kolem 27,4 %, při vzdálené diseminaci klesá pod 5 % [8, 25]. Ze statistických údajů je markantní též rozdílné procento vzniku lokálních a vzdálených relapsů onemocnění v jednotlivých klinických stádiích onemocnění. Lokální relaps onemocnění je v nižších stádiích onemocnění (stadium IA, B, II) kolem 10 %, zatímco v klinickém stadiu IIIA kolem 15 %. Vzdálený relaps onemocnění se v nižších klinických stádiích nemoci po radikální chirurgické resekci pohybuje kolem 15–30 %. Ve stadiu IIIA je však procento vzdáleného relapsu dvojnásobné [8, 26, 27].

### 3.5 Doporučené léčebné postupy pro karcinom plic

S ohledem na léčbu dělí Evropská společnost pro lékařskou onkologii (ESMO) nemocné v době stanovení diagnózy podle provedeného stagingu nemoci do tří skupin. Do první skupiny, nazývané též jako časně stádium nemoci (cca 25 % nemocných s diagnostikovaným karcinomem plic), jsou zahrnuti pacienti, kteří podle TNM klasifikace spadají do klinických stádií I nebo II. Do druhé skupiny tzv. lokálně pokročilé nemoci (cca 35 % pacientů) jsou zahrnuti nemocní zařazení do klinických stádií IIIA nebo B. Poslední skupinu, tzv. pokročilé nebo metastatické stádium (cca 40 %), tvoří pacienti klinického stádia IV [7, 8, 28, 29]. Jak je již opakovaně zmiňováno výše pečlivě provedený staging onemocnění určuje strategii léčby, která je pro jednotlivá stádia specifická. Níže jsou uvedeny standardy pro postup léčby dle doporučení Evropské společnosti pro lékařskou onkologii (ESMO) a Evropské společnosti hrudní chirurgie (ESTS).

#### 3.5.1 Léčba časného stádia nemoci (klinické stádium I a II)

Chirurgická léčba je doménou pro klinické stádium I. V případě, že pacient z důvodu komorbidit není schopen operačního výkonu, je doporučována stereotaktická radioterapie (SABR, stereotactic ablative radiotherapy) [7, 29]. U klinického stádia II je též na prvním místě

lčba chirurgická, poté však je indikováno podání adjuvantní chemoterapie. U pacientů po kompletní resekci časného stadia není indikována radioterapie. Ta je indikována pouze v případě R1 resekce (pozitivní resekční okraje, hrudní stěna) [7, 29]. V případě, že pacient není schopen chirurgického zákroku, je indikováno provedení souběžné nebo sekvenční chemoradioterapie. Adjuvantní chemoterapie sestává z kombinace dvou preparátů (platinový preparát s vinorelbinem nebo paklitaxelem) a je podávána ve třech či čtyřech cyklech.

### 3.5.2 Léčba pokročilého stádia nemoci (stádium III)

Skupina III se podle velikosti primárního nádoru a postižení lymfatických uzlin dělí na IIIA, IIIB a IIIC stadium. Skupina IIIA je velmi heterogenní skupina. Někteří pacienti ve IIIA stadiu jsou též indikováni k operační terapii. Indikace k operační terapii je po pečlivém zhodnocení nálezu multidisciplinárním týmem. Protože postižení N2 uzlin určuje strategii léčby, předoperačně je kladen důraz, zda jsou či nejsou lymfatické uzliny postiženy metastatickým procesem. Pokud je předoperačně zobrazovacími metodami abnormální nález lymfatických uzlin, je indikován EBUS (endobronchiální sonografie) s provedením biopsie lymfatických uzlin nebo mediastinoskopie. V případě průkazu postižení lymfatických uzlin ve více kompartmentech, je nález kontraindikován k operační terapii a je indikována onkologická léčba. V případě zjištění postižení N2 uzlin v jednom kompartmentu, pak jsou tři možnosti postupu léčby.

1. Chirurgická léčba a následné podání adjuvantní chemoterapie.
2. Neoadjuvantní chemoterapie a následně chirurgická léčba.
3. Chemoradioterapie a následně chirurgická intervence.

V případě zjištění postižení lymfatických uzlin během operace, je nemocný indikován k podání adjuvantní chemoterapie, adjuvantní radioterapie není rutinně doporučována.

Nádory T3N1 a T4N0-1 jsou lokálně pokročilé nádory prorůstající do struktur, které jsou potencionálně resekabilní (např. hrudní stěna, bránice či perikard). U těchto nádorů je též indikována chirurgická léčba, pokud je možné provedení en bloc R0 resekce. Pooperačně je vždy indikována adjuvantní chemoterapie. Stadia IIIB a IIIC jsou již inoperabilní a první modalitou léčby je systémová chemoterapie se souběžnou nebo následnou radioterapií hrudníku [7, 8, 29].

### 3.5.3 Léčba metastatického stádia (stádium IV)

Léčba metastatického stádia čili pokročilého onemocnění je doménou pneumoonkologů. V tomto stadiu je plně indikována systémová chemoterapie. Na podkladě průkazu mutací genů je indikována též biologická léčba. Systémová léčba probíhá ve více liniích. Výčet podávaných preparátů v jednotlivých liniích přesahuje rámec této disertační práce. Ve většině případů se chirurg setkává s nemocnými v rámci paliativní chirurgické intervence např. provedení biopsie za účelem stanovení diagnózy nebo v případě provedení výkonu pro maligní pleurální výpotek. Avšak i v této skupině může být pacient indikován k chirurgické intervenci. Chirurgická léčba je indikována u pacientů s oligometastatickým postižením a resekalibilním plicním nádorem. Chirurgická resekce je indikována např. u pacientů se synchronní solitární mozkovou metastázou nebo se solitární metastázou nadledviny, bez postižení mediastinálních lymfatických uzlin. Pacienti se solitární metastázou do kontralaterální plíce mohou být též po vyloučení mimoplicní generalizace a po vyloučení postižení mediastinálních lymfatických uzlin indikováni k operační terapii s cílem kurativní resekce. Indikaci k operační terapii u pacientů s okultními metastázami do jiných orgánů je nutné řešit vždy individuálně po zhodnocení multidisciplinárním týmem [7, 8, 28].

### 3.6 Doporučené léčebné postupy pro plicní metastázy

Léčba plicních metastáz je limitována mnoha faktory. Vždy je nutné každého pacienta posuzovat individuálně v rámci multidisciplinárního týmu s cílem zhodnocení nejlepší možné léčebné modality. Kromě konzervativního postupu (radioterapie, chemoterapie a biologická léčba) se nedílnou součástí v léčbě plicních metastáz stává i lokální léčba, zejména chirurgická, která v indikovaných případech významně prodlužuje dobu přežití nemocných [14, 18, 30]. Chirurgická léčba je indikována v případě, že jsou splněna následující kritéria:

1. Primární nádor je radikálně odstraněn nebo je možno a plánováno jej kurativně odstranit.
2. Není přítomna neresekabilní extrapulmonální diseminace nádoru.
3. Počet a uložení metastatických ložisek umožňuje radikální R0 resekci při dostatečné plicní rezervě.
4. Riziko operace je únosné, pacient z výkonu profituje, pacient je schopen z hlediska komorbidit podstoupit operační výkon.
5. Absence jiných efektivních léčebných přístupů.

Mezi významné faktory ovlivňující indikaci k metastazektomii vzhledem ke špatné prognóze patří:

1. Odpověď primárního nádoru na onkologickou léčbu
2. Počet, velikost a uložení metastáz
3. Disease-free interval od doby dosažení kompletní remise
4. Stav regionálních lymfatických uzlin

Pouze 30 % nemocných s plicními metastázami splňuje kritéria operační léčby. Vždy je však nutné individuální posouzení každého nemocného [7, 8, 14]. Nicméně i při nesplnění všech kritérií jsou někteří pacienti indikováni k operační terapii, a to v případě:

1. Nálezu symptomatických metastáz, které nemohou být ošetřeny jiným způsobem než chirurgickou léčbou.
2. Z diagnostických důvodů k histologické verifikaci ke stanovení nového léčebného postupu.

Mezi další modalitty lokální léčby oligometastatického postižení plic patří vedle chirurgické léčby ablační techniky, které též vedou k prodloužení doby přežití. Mezi tyto ablační techniky patří: radiofrekvenční ablace (radiofrequency ablation, RFA), termální ablace (Microwaves ablation, MWA), kryoablace (cryoablation, CA) a ireverzibilní elektroporace (irreversible electroporation, IRE) [31, 32].

### 3.7 Chirurgická léčba plicního karcinomu

Základní léčebnou modalitou časného stadia plicního karcinomu je chirurgická léčba. Dle doporučených standardů Evropské společnosti hrudní chirurgie (ESTS) je vždy indikována anatomická resekce [33]. Standardním minimálním chirurgickým výkonem je lobektomie [29, 33]. S cílem minimalizovat rozsah operačního výkonu ve smyslu resekce, při zachování onkochirurgické radikality, byly provedeny studie, zda u časných forem karcinomu plic je postačující pouze provedení segmentektomie. V roce 1973 Jensik a spol ve své studii potvrzuje, že u časných stádií karcinomu plic může být v určitých indikacích segmentektomie alternativním výkonem lobektomie [34]. V roce 2014 The American Association for Thoracic Surgery dokazuje ve své studii probíhající v letech 1993-2011 u 347 pacientů, že segmentektomie je ekvivalentní standardně prováděné lobektomii u IA stadia nemalobuněčných karcinomů, ale pouze v indikovaných případech [29].

Dle doporučení ESMO je segmentektomie indikována při splnění následujících kritérií [29]:

1. primární nádor musí být v největším rozměru do 2 cm
2. musí být provedena histologická verifikace, že se jedná o adenokarcinom
3. hilové a mediastinální lymfatické uzliny musí být bez metastatického postižení
4. nádor musí být periferně uložen (tzn. v zevní 1/3 plíce)
5. předoperační CT nález musí být s nálezem GGO (ground – glass opacity).

Od 90. let 20. století s rozvojem torakoskopických technik je do klinické praxe zaváděna technika tzv. VATS resekce (videotorakoskopicky asistovaná resekce). Dle počtu přidružených portů k minitorakotomii (délka řezu je menší než 10 cm) lze VATS resekci dělit následovně:

1. Multiportální VATS resekce (mVATS), která spočívá v provedení minitorakotomie a několika dalších incizí pro porty.
2. Uniportální VATS resekce, která je provedena pouze z minitorakotomie [35, 36].

Provedení operačního výkonu cestou klasické torakotomie či VATS je metodou volby operátora. U klinického stadia I je v současné době VATS doporučována, pokud nejsou absolutní kontraindikace k tomuto typu operačního postupu. Mezi absolutní kontraindikace VATS patří nemožnost selektivní ventilace, obliterace pohrudniční dutiny, extenzivní růst nádoru a N2 onemocnění (čili postižení lymfatických uzlin mezihrudí metastatickým procesem). Mezi relativní kontraindikace výkonu patří: předcházející operační výkon v pohrudniční dutině, plošná pleurální adheze, předchozí chemoradioterapie či zašlé mezilalokové rýhy. Další možnou operační alternativou pro nemocné v časném klinickém stadiu je robotická VATS (rVATS). Výhodou robotické chirurgie je třírozměrný pohled a použití nástrojů s vysokou přesností a zvýšeným rozsahem pohybu, což umožňuje přesnější disekci tkání. Současně vždy společně s odstraněním primárního plicního nádoru je indikováno provedení systematické nodální disekce či lobárně specifické nodální disekce [8, 29].

V rámci paliativních výkonů, kdy není možné provedení R0 resekce, je v indikovaných případech prováděna chirurgická intervence např. za účelem provedení biopsie ke stanovení diagnózy nebo v případě provedení výkonu pro maligní pleurální výpotek.

V případě peroperačně zjištěného centrálně uloženého nádoru velikosti 2–5 cm u pacienta, který není schopný podstoupit radikální operační výkon s cílem R0 resekce, je v literatuře popisovaná technika s použitím tzv. Nanoknifu (ireverzibilní elektroporace, IRE). Na rozdíl od termoablačních technik jako je radiofrekvenční ablace či kryoablace, tato metoda využívá

vysokonapětové ultrakrátké impulzy ( $1500-3000\text{V}/\text{cm}^3$ ), které vytvářejí mikrodefekty (označované jako nanopóry) narušující buněčnou membránu vedoucí k apoptóze buňky. Protože tato metoda nenarušuje integritu vaskulárních struktur, žlučovodů a ureterů, byla hojně zkoumána v oblasti břišní chirurgie při nádorovém onemocnění slinivky, jater, ledvin a prostaty, s velmi pozitivními výsledky. V hrudní chirurgii byla tato metoda použita pouze sporadicky, prováděná miniinvazivní cestou za CT kontroly. Výsledky nebyly nijak uspokojivé. Avšak provedení IRE při operaci přineslo velmi slibné výsledky s nálezem redukce nádorové hmoty u operovaných nemocných bez průkazu lokální recidivy. Slibné výsledky při otevřené operaci plynou nejspíše z přesné aplikace elektrod do hmoty nádoru [37, 38].

### 3.8 Chirurgická léčba plicních metastáz

Typ chirurgického výkonu je u každého pacienta individuální. Podle počtu metastáz, jejich uložení a celkového stavu nemocného je vždy stanoven optimální postup. Výkony mohou být prováděny miniinvazivními přístupy nebo otevřeně. Dosud v literatuře jsou četné studie srovnávající výhody miniinvazivních přístupů či otevřených chirurgických technik. Vzhledem k limitaci palpačního vyšetření peroperačně při miniinvazivní operaci některá pracoviště upřednostňují provedení torakotomie. U jednostranných nálezů se doporučuje provedení torakotomie, v případě oboustranných nálezů záleží nejen na stavu pacienta, ale i na zvyklosti pracoviště. Pacienty lze operovat cestou torakotomie (synchronně či následně s odstupem 4-8 týdnů), z clamshell torakotomie, nebo z podélné sternotomie. Na rozdíl od primárních plicních nádorů u solitárních plicních metastáz nemusí být vždy prováděna anatomická resekce, avšak vždy musí být splněna R0 resekce. Vzhledem k přítomnosti satelitních buněk kolem metastázy je nutná resekce metastázy s bezpečnostním lemem zdravé tkáně o šíři minimálně 10 mm [8, 14].

Možnost neanatomické resekce metastatického ložiska je několika způsoby:

1. Klínovitá resekce – na sorce nebo pomocí staplerů
2. Precizní technika resekce – využitím laseru
3. Metastazektomie využitím ultrazvukového chirurgického aspirátoru cavitron (CUSA)

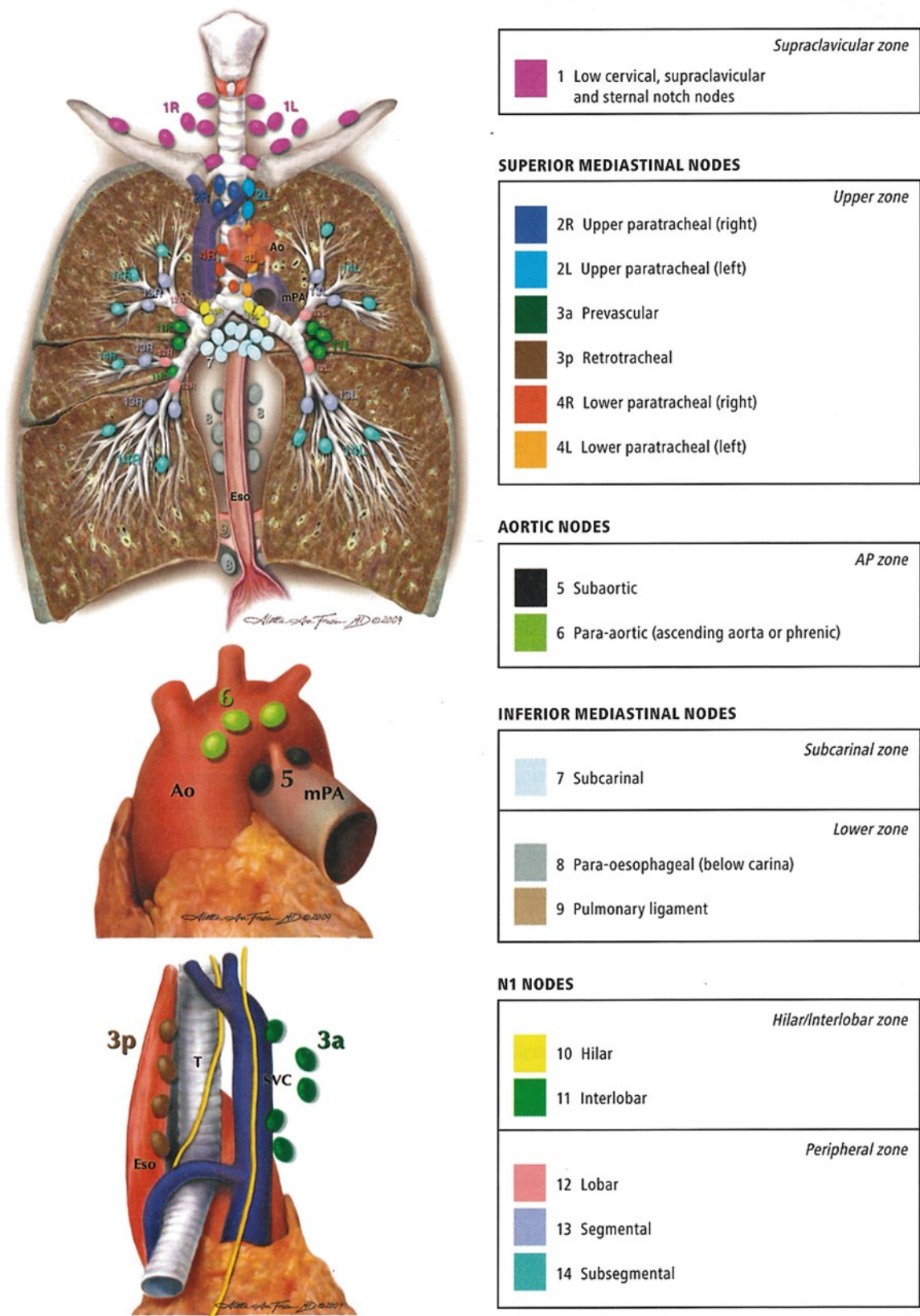
V případě většího počtu metastáz nebo metastáz centrálně uložených musí být v rámci zachování onkochirurgické radikality provedena anatomická plicní resekce.

Podle doporučených postupů se mediastinální lymfadenektomie rutinně neprovádí. Avšak metastázy v hilových a mediastinálních uzlinách bývají prokázány ve 2 až 28,6 % případů [14, 19, 20]. Proto některá pracoviště při operacích plicních metastáz mediastinální lymfadenektomii rutinně provádí. Průkaz metastatického postižení lymfatických uzlin vede ke zpřesnění stagingu onemocnění a k podání adjuvantní onkologické léčby.

### 3.9 Odběr uzlin

Součástí chirurgického výkonu je nejen radikální odstranění nádoru, ale též odběr lymfatických uzlin ke zjištění precizního stagingu. V roce 1978 Naruke vytvořil mapu lymfatických uzlin, která člení lymfatické uzliny do 14 skupin (kompartmentů). V roce 1981 byla Americkou hrudní společností (American Thoracic Surgery) Narukeho mapa upravena a přejmenována na ATS mapu. V roce 1997 manželé Mountain-Dreslerovi vytvořili mírně modifikovanou mapu lymfatických uzlin, nazývanou MD mapa (Mountain-Dresler mapa). ATS mapa a MD mapa však mají mnoho rozdílů stran řazení uzlin do skupin. Nejednotnost používání map na různých pracovištích vedla k odlišnému zařazení pacientů do klinických stadií, a proto v roce 2009 UICC a AICC (Union Internationale Contre le Cancer a American Joint Committee on Cancer) vydaly jednotnou tzv. MD-ATS mapu. MD-ATS mapa zajišťuje precizní definici anatomických hranic jednotlivých skupin lymfatických uzlin a sjednotila názvosloví a číselné označení (viz obrázek 6) [8, 39].





Obrázek 6 - MD-ATS mapa lymfatických uzlin [8]

Je celá škála způsobů odběru lymfatických uzlin. Od nejméně radikálních výkonů – jako je selektivní samplingová biopsie až po extenzivní lymfatickou disekci [8].

Způsoby odběru lymfatických uzlin:

1. Selektivní biopsie lymfatických uzlin = biopsie jedné nebo více lymfatických uzlin podezřelých z metastatického postižení. Toto je indikováno pouze v případech explorativní torakotomie, kdy není možné provést resekci;
2. Sampling lymfatických uzlin = odebrání jedné či více lymfatických uzlin před nebo peroperačně, které se jeví být reprezentativní;
3. Systematický sampling = odebrání jedné nebo několik reprezentativních uzlin ze všech kompartmentů podle stranové lokalizace nádoru;
4. Systematická nodální disekce = odebrání veškeré mediastinální tkáně obsahující uzliny ze všech kompartmentů odpovídající stranové lokalizaci nádoru;
5. Lobárně specifická nodální disekce = odebrání mediastinální tkáně z kompartmentů v závislosti na lobární lokalizaci nádoru;
6. Extenzivní disekce lymfatických uzlin = oboustranné odstranění mediastinální a krční tkáně obsahující lymfatické uzliny.

Lymfatická drenáž plic probíhá ve třech rovinách (přední, mediastinální a zadní). Variabilita lymfatické drenáže vysvětluje i nález přeskokových tzv. skip metastáz (vyskytující se až ve 25 % případů). S přihlédnutím k výše uvedenému je patrné, že s narůstajícím počtem odebraných lymfatických uzlin roste exaktnost hodnocení pN v rámci staging [14, 20, 40].

Protože způsob odběru lymfatických uzlin byl nejednotný, v roce 2004 Evropská společnost hrudních chirurgů (European Society of Thoracic Surgeons) stanovila doporučený postup odběru lymfatických uzlin [8, 39]. Dle doporučených postupů při kompletní resekci nemalobuněčného plicního karcinomu je indikováno provedení systematické nodální disekce. Výjimku tvoří periferní dlaždicový karcinom T1. V případě jeho průkazu je možné provedení pouze lobárně specifické nodální disekce. Následující tabulka 13 popisuje kompartmenty lymfatických uzlin, které musí být vyšetřeny v závislosti na lobární lokalizaci nádoru [29, 39].

**Tabulka 13** - Doporučené skupiny uzlin odebrané v závislosti na lobární lokalizaci nádoru [29]

lokalizace nádoru	skupiny uzlin
pravý horní lalok, střední lalok	2R,4R,7
pravý dolní lalok	4R,7,8,9
levý horní lalok	5,6,7
levý dolní lalok	7,8,9

### 3.10 Vyšetření lymfatických uzlin

#### 3.10.1 Histologické vyšetření

Tato metoda spočívá ve zhodnocení připraveného vzorku tkáně pod mikroskopem. Příprava vyšetřovaného vzorku probíhá v několika na sebe navazujících krocích:

1. Fixace biologického materiálu
2. Vytvoření parafinových řezů
3. Obarvení
4. Hodnocení vzorku tkáně pod mikroskopem

Pokud by lymfatické uzliny nebyly bezprostředně po jejich odběru ošetřeny, dochází v jejich tkáni k denuraci bílkovin či mikrobiálnímu rozkladu. Ochranou proti této destrukci vzorku před jeho zpracováním je zalití odebrané tkáně do roztoku formolu. Při uložení vzorku do formolu musí být splněno kritérium nadbytku fixačního preparátu, aby bylo zajištěno prostoupení celého vzorku tkáně fixačním činidlem. Vzhledem k vysokému obsahu vody ve tkáni, lymfatické uzliny nelze nakrájet na tenké plátky bez provedené přípravy. Aby mohla být tkáň nakrájena, musí být tuhé konzistence. Proto po provedení fixace v roztoku formolu je nejprve tkáň uzliny odvodněna sérií etanolových lázní a poté prosycena tekutým parafinem. Tekutý parafín po prosycení tkáně ztuhne, čímž vzniká parafinový bloček. Tuhost bločku zaručuje možnost nakrájení tkáně mikrotomem na tenké plátky o stejné tloušťce v celém rozsahu. Tloušťka plátku je 2-7 mikrometrů (0,002-0,007 mm), což odpovídá jedné až dvěma vrstvám buněk. Plátky jsou uloženy na podložní sklíčka a vystaveny dalšímu procesu přípravy

- obarvení. Barvení preparátu je prováděno barvivy rozpustnými ve vodě, proto je nutné rozpustit parafin a sestupnou alkoholovou řadou převést vzorek zpět do hydrofilní fáze. Poté je každý vzorek obarven. K vyšetření lymfatických uzlin je používáno barvení hematoxylinem–eosinem. Hematoxylin je barvivo zásadité povahy, v preparátu má barvu tmavě modrou až tmavě fialovou. Eosin je barvivo kyselé povahy, jehož barva je oranžovočervená. Takto připravené plátky jsou na podložních sklíčkách vloženy do mikroskopu a hodnoceny zkušeným patologem pod mikroskopem [41, 42].

Histologické vyšetření je založeno na přímém průkazu metastázy ve zkoumaném materiálu. Další možností diagnostiky metastatického procesu v lymfatických uzlinách je možnost využití imunohistochemických nebo molekulárních vyšetřovacích metod, které detekují přítomnost tzv. cytokeratinů.

### 3.10.2 Imunohistochemie

Cytokeratiny (CK) jsou polypeptidy intermediálních filament cytoskeletu epiteliálních buněk. Exprese cytokeratinů je tedy v normálních v epiteliálních buňkách, v epiteliálních nádorech a metastatických buňkách epiteliálních nádorů. Dnes je prokázáno dvacet humánních typů cytokeratinů o různé molekulární hmotnosti. Podle vlastností se dělí na 2 typy: typ I (kyselé) a typ II (zásadité a neutrální). Podle molekulární hmotnosti jsou očíslovány CK1-CK20. Exprese cytokeratinů je spojena s diferenciacním programem příslušného epitelu [43–45].

Nepostižená lymfatická tkáň cytokeratiny neobsahuje, poněvadž je složena z pojivové tkáně a buněk imunity. Z dostupné literatury je zřejmé, že z těchto dvaceti cytokeratinů nejspecifičtější pro detekci epiteliálních plicních karcinomů, karcinomů mléčné žlázy a kolorektální karcinom je cytokeratin 19 (CK 19). CK 19 je cytokeratin I. typu o molekulární váze 40 KDa [46, 47] . Zde se tedy nabízí další možnost vyšetření lymfatických uzlin na přítomnost metastatického postižení. Průkaz cytokeratinu CK 19 může být buď imunohistochemickou metodou přímo, nebo molekulární metodou nepřímo (průkazem přítomnosti mediátorové RNA pro tento cytokeratin).

První z možností průkazu cytokeratinu CK19 je jeho detekce imunohistochemickou metodou. Základy imunohistochemie byly položeny v roce 1941 americkým patologem Albertem Hewettem Coonsem. Tato metoda spočívá v průkazu antigenu specifickou vazbou s primární protilátkou. Antigenem může být protein, glykoprotein, polypeptid či polysacharid. Při průkazu

cytokeratinu CK19 je antigenem samotný cytokeratin CK19. Primární protilátku navázanou na antigen je možno detekovat dvěma způsoby. První možností je označení protilátky enzymem, jehož aktivita se projeví vznikem barevné sraženiny viditelné pod mikroskopem. Druhou možností detekce je využití fluorescenčního barviva (fluorochrom nebo fluorofor) [41, 48].

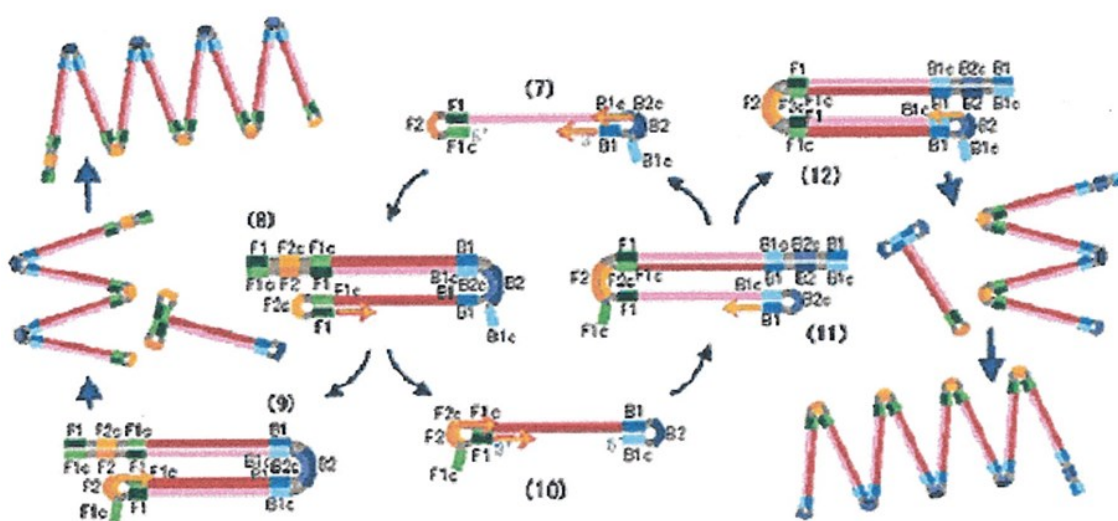
### 3.10.3 OSNA metoda

Další možnou metodou průkazu CK19 je průkaz mediátorové ribonukleové kyseliny pro tento cytokeratin molekulární metodou.

V roce 1983 Mullis Kary objevil princip polymerázové řetězové reakce (polymerase chain reaction = PCR), díky které lze cílenou sekvenci DNA z jakéhokoliv biologického materiálu detekovat a replikovat [49]. Díky tomuto objevu nastal velký přelom v diagnostice nejen v oblasti chemie, ale i v jiných oborech, zejména v lékařství.

Polymerázová řetězová reakce spočívá nejprve v denaturaci a poté v replikaci DNA. Prvním krokem je denaturace dvojšroubovice DNA. Tento děj nastává při vyšších teplotách. Původní šroubovice při teplotě 90 stupňů denaturuje, čili rozkládá se ve dvě samostatná vlákna. Po denaturaci na každé vlákno nasedají primery, což jsou krátké oligonukleotidy, které vymezují počátek a konec úseku DNA, který chceme replikovat. Po nasednutí primerů na vlákno díky termostabilní DNA polymeráze neboli TAQ polymeráze dochází k syntéze komplementární DNA. DNA polymeráza pro PCR je izolována z bakterie *Thermus aquaticus*, proto také je označována jako TAQ polymeráza. Pokud je tento cyklus zopakován 30krát, vzniká přibližně miliarda kopií DNA. Nevýhodou této metody je dlouhé trvání, až 24 hodin, a nutnost změny teploty v jednotlivých krocích [49, 50]. S cílem zrychlení a snadnějšího získání kopií DNA byla Eiken Chemical C. O. vyvinuta metoda LAMP (Loop Mediated Izothermal Amplification), která je na stejném principu jako PCR, avšak probíhá za stálé teploty a je rychlejší [51]. Celá reakce trvá cca 30 minut. LAMP metoda na rozdíl od standardní PCR využívá více primerů (LAMP metoda 6 primerů, standardní PCR pouze dva). Tyto primery jsou označovány jako přední vnitřní a přední vnější primer (forward inner and outer primer), zadní vnitřní a zadní vnější primer (backward inner and outer primer) a tzv. loop primery – přední a zadní. Princip této metody je unikátní ve vzniku tzv. LAMP produktu, který dovoluje díky loop primerům rychlou syntézu nové DNA [52]. LAMP metoda čili metoda izotermické amplifikace také probíhá ve více krocích. Nejprve dochází k denaturaci dvojšroubovice DNA při teplotě 65 stupňů Celsia. Poté dochází k hybridizaci primerů. Na 3' konec vlákna DNA nasedne tzv. zadní vnitřní primer,

který má dvě složky. Jednu komplementární (B2) a jednu nekomplementární (B1c). B2 se naváže na DNA vlákno a díky DNA polymeráze je zahájena syntéza nové komplementární DNA. Protože tento primer je dostatečně dlouhý, volná část B1c má možnost se navázat na nově syntetizovaný úsek B1, otáčí se a vytváří kličku (loop). Přidáním zadního zevního primeru dochází k opětovné syntéze komplementární DNA a uvolnění již nově vytvořené DNA, která má na konci již zmíněnou smyčku. Tento proces pokračuje až k poslednímu úseku, který je opět vymezen primerem na druhé straně a tento proces analogicky probíhá i z druhé strany. Výsledným produktem je LAMP produkt, který má na obou koncích zmíněné smyčky, viz obrázek č. 2.



**Obrázek 7 - LAMP produkt [51]**

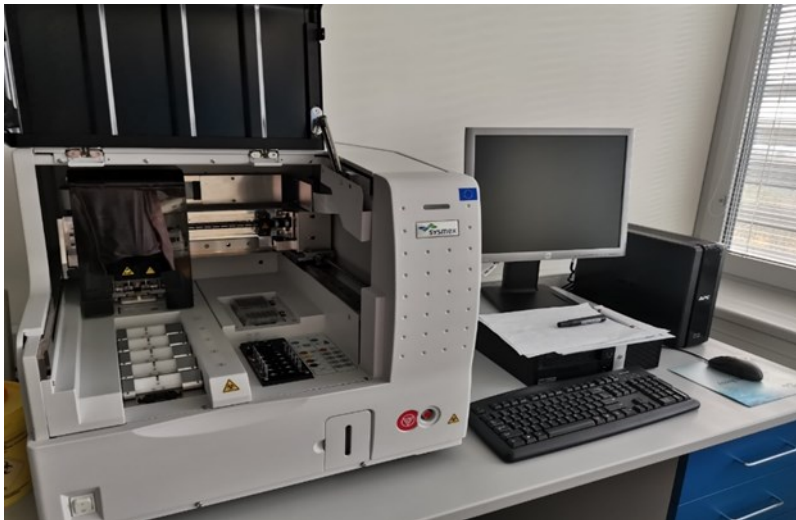
Nasednutím loop primerů na tento produkt z obou stran dovolu je rychlou syntézu dalších řetězců DNA. Čili po denaturaci dvojšroubovice a přidáním těchto šesti výše popisovaných primerů vzniká za stálé teploty velké množství kopií cDNA ve velmi krátkém čase. Vedlejším produktem reakce je magnezium-pyrofosfát. Množství cDNA lze detekovat nepřímo hodnocením množství vytvořeného magnezium-pyrofosfátu v reálním čase metodou real-time turbidimetrie [53–55]. Díky objevu reverzní transkriptázy se rozvinula též metoda detekce mediátorové RNA kyseliny. Zde díky reverzní transkriptáze nejprve dochází k přepisu mediátorové RNA kyseliny na komplementární DNA kyselinu (cDNA) a poté dochází k replikaci metodou LAMP. Tato metoda je tzv. RT-LAMP metoda (Revers Transcription Loop Mediated Izothermal Amplification). Firma Sysmex, Kobe, Japonsko vyvinula diagnostickou soupravu LYNOAMP BC OSNA. Stanovení počtu kopií mRNA CK19 probíhá v přístroji RD 100i (viz obrázek 8, 9) [56]. Přístroj RD 100i je analyzátor s přesným termoblokem, pipetovací

hlavou a turbidimetrem. V přístroji při 65°C proběhne reverzní transkripce mRNA CK19 na cDNA a následně amplifikace cDNA LAMP metodou. Využití teploty 65 stupňů Celsia zaručuje kompletní denaturaci mRNA kyseliny. Po přípravě vzorku ve smyslu jeho homogenizace a lyzace homogenizačním roztokem je zahájeno vlastní vyšetření přidáním 6 primerů (viz obrázek 10, 11). Vyšetření předchází příprava kalibrační křivky. Stanovení probíhá za současně probíhajících kontrol (pozitivní i negativní). Vzhledem k přítomnosti kontaminujících látek v lymfatických uzlinách probíhá stanovení i v ředěném vzorku umožňující odhalit inhibici reakce. Množství počtu kopií mRNA CK 19 je detekováno nepřímo hodnocením množství vytvořeného magnesium-pyrofosfátu v reálném čase metodou real-time turbidimetrie v turbidimetru.

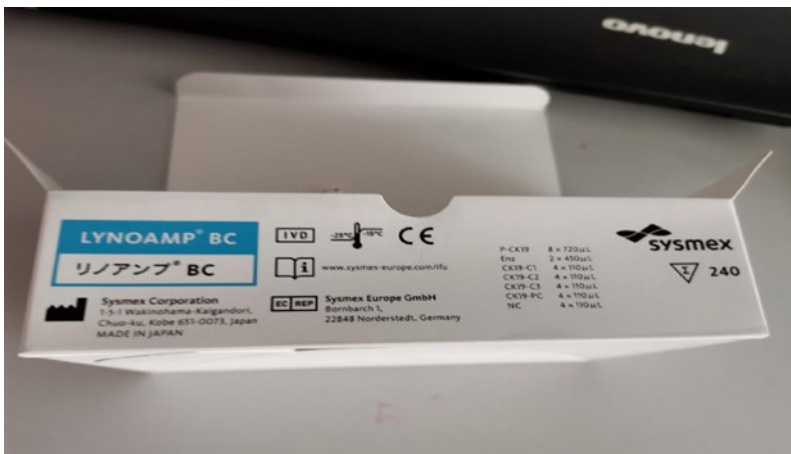


**Obrázek 8** - Přístroj RD 100i. Zdroj: Kateřina Houfková, Ústav biologie a Biomedicínské centrum FN Plzeň





**Obrázek 9** - Přístroj RD 100i. Zdroj: Kateřina Houfková, Ústav biologie a Biomedicínské centrum FN Plzeň



**Obrázek 10** - Diagnostická souprava LYNAMP BC OSNA. Zdroj: Kateřina Houfková, Ústav biologie a Biomedicínské centrum FN Plzeň



**Obrázek 11** - Šest druhů prumerů. Zdroj: Kateřina Houfková, Ústav biologie a Biomedicínské centrum FN Plzeň



## 4 Studie

### 4.1 Cíl práce

- Ověření možnosti senzitivnější detekce výskytu mikrometastáz v regionálních lymfatických uzlinách u pacientů s primárním plicním karcinomem nebo plicními metastázami kolorektálního karcinomu prostřednictvím IHC CK19 a metody OSNA ve srovnání s vyšetřením H-E.
- Zhodnocení vlivu přítomnosti mikrometastáz v lymfatických uzlinách na prognózu nemocných.

## 4.2 Hypotéza

Doporučený postup léčby nemocných s karcinomem plic je závislý nejen na morfologickém typu nádoru, ale zejména na stanovení klinického stadia nemoci. Vyšetření regionálních mízních uzlin tedy sehrává významnou roli pro stanovení správného klinického stadia s cílem naplánování adekvátní terapie. V případě přítomnosti metastáz v lymfatických uzlinách je indikováno po kompletní chirurgické resekci podání adjuvantní onkologické léčby. Proto k preciznímu stanovení pTNM klasifikace každý operační výkon sestává nejen z radikálního odstranění nádorového ložiska, ale též je provedena i systematická nodální disekce, v indikovaných případech lobárně-specifická [39].

V roce 2001 společností Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology byly vydány pokyny způsobu vyšetření odebraných lymfatických uzlin [24]. V dnešní době jediným standardním vyšetřením lymfatických uzlin na přítomnost metastatického procesu je histologická metoda. Standardní histologické vyšetření spočívá ve vytvoření tkáňových bločků, které jsou nakrájeny na tenké plátky, obarveny a vyšetřovány pod mikroskopem. Takto provedené histologické vyšetření spolehlivě prokáže makrometastázy, ale vzhledem k technice provedení této metody, mikrometastázy lokalizované mimo zkoumanou linii řezu, nemusí být vůbec detekovány, což v důsledku může vést k podhodnocení klinického stadia nemoci.

U epitelálních nádorů se v posledních letech nabízí i další možnosti vyšetření lymfatických uzlin. Mezi tyto techniky patří imunohistochemické nebo molekulární vyšetřovací techniky využívající průkaz cytokeratinu 19 (CK19). CK19 je intermediální filamentum cytoskeletu epitelálních buněk. Protože lymfatická uzlina nepostižená nádorovým procesem neobsahuje epitelální buňky, prokázání přítomnosti CK19 v LU je ukazatelem jejich metastatického postižení. Detekovat cytokeratin CK 19 lze dvěma způsoby. První možností je imunohistochemická metoda, která je známa řadu let, avšak rutinně se nepoužívá. Druhou možností je použití molekulárně genetické metody OSNA (One-Step Nucleic Acid Amplification). Tato metoda je založena na stanovení počtu kopií mRNA CK19 ve vzorku na podkladě izotermické amplifikace mRNA pro tento cytokeratin. Na rozdíl od histologického a imunohistochemického vyšetření metodou OSNA je vyšetřena celá homogenizovaná tkáň LU, což dovoluje vyšetřit i tkáň mezi zkoumanými liniemi řezu. Metoda OSNA též není rutinně využívána, avšak v zahraničí byla předmětem mnoha studií pro karcinomy prsu, žaludku atd. [57–59].

Studie použití OSNA metody při vyšetření lymfatických uzlin u pacientů s primárními plicními nádory jsou pouze ojedinělé a pro sekundární plicní nádory dosud zcela chybí [60, 61]. Hypotézou našeho výzkumu je, že metody založené na detekci CK19 jsou senzitivnější k průkazu mikrometastáz v lymfatických uzlinách. V případě potvrzení naší domněnky očekáváme přesnější detekci mikrometastáz v hilových a mediastinálních lymfatických uzlinách metodami IHC CK19 a OSNA vedoucí k přesnějšímu stanovení pTNM stagingu. Preciznost pTNM stagingu povede k minimalizaci podhodnocení pacientů a jejich správnému zařazení do klinických stadií nemoci. Adekvátní zařazení do klinických stadií povede k podání optimální onkologické léčby nemocným. Optimální onkologická léčba může nemocným prodloužit dobu do vzniku lokálních či vzdálených recidiv onemocnění, čili může prodloužit jejich dobu přežití.

## 4.3 Materiál a metodika

### 4.3.1 Soubor nemocných

Do prospektivní studie byli zařazeni pacienti, kteří byli operováni na Chirurgické klinice FN Plzeň v období od února 2013 do listopadu 2017 pro primární nemalobuněčný plicní karcinom či plicní metastázy kolorektálního karcinomu. Celkem bylo do studie zařazeno 100 pacientů, kteří se zařazením do studie souhlasili a podepsali informovaný souhlas (viz příloha).

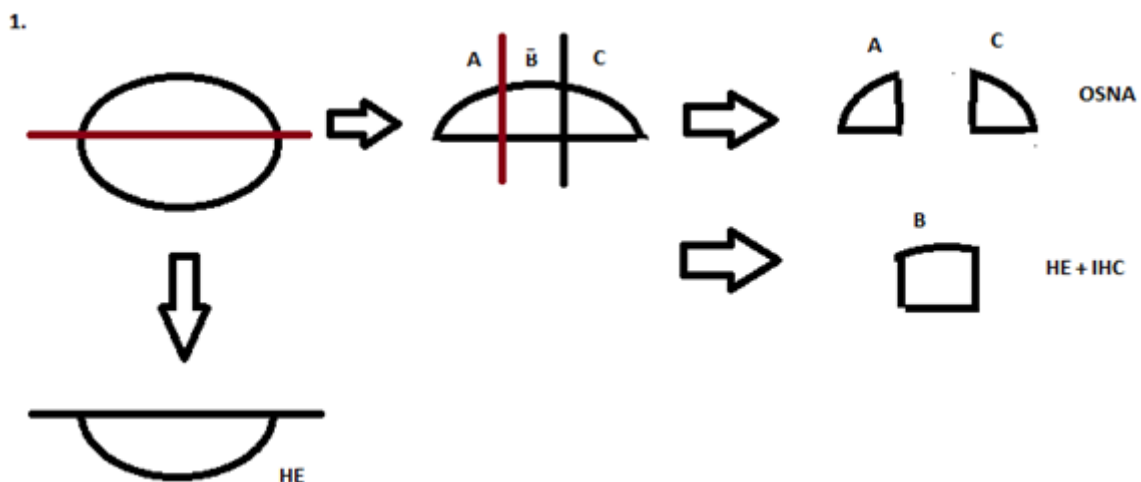
### 4.3.2 Operační postup

Celý soubor pacientů byl operován klasickou operační technikou, přístupem byla zvolena posterolaterální torakotomie. Prováděné typy operačního výkonu vždy splňovaly zásady onkochirurgické radikality. U primárních plicních nádorů byla provedena anatomická resekce, nejmenším výkonem byla lobektomie. U sekundárních plicních nádorů byl rozsah výkonu určován dle počtu, velikosti a lokalizace metastáz. Z neanatomických plicních resekcí pro plicní metastázu byla prováděna buď klínovitá resekce na svorce či použitím stapleru, nebo laserová excize pomocí Nd:YAG laseru. V ojedinělých případech byla provedena i anatomická resekce. Současně u všech nemocných byla provedena systematická nodální disekce. Tato systematická nodální disekce byla vždy provedena podle zavedeného schématu (MD-ATS mapy) vytvořeného Mezinárodní společností pro léčbu rakoviny (The International Association for Study of Lung Cancer (IASLC)).

### 4.3.3 Zpracování lymfatických uzlin

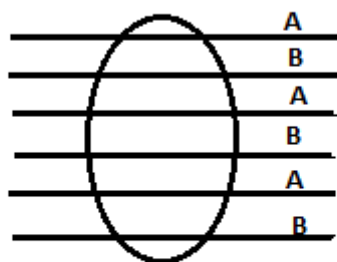
Bezprostředně po skončení operačního výkonu byly odebrané lymfatické uzliny spočítány a zpracovány tak, aby mohly být použity k vyšetření pro zvolené metody. Protože každá metoda vyšetření je založena na jiném principu a potřebuje před použitím jinou přípravu preparátu, nelze tedy vyšetřit celou lymfatickou uzlinu všemi metodami současně. Vzhledem k této skutečnosti musí být vyšetřovaná lymfatická uzlina rozdělena. S cílem minimalizovat zvýhodnění té či oné metody jsou v literatuře udávány různé techniky zpracování lymfatických uzlin (viz obrázek 12-14). V naší studii byly uzliny krájeny v podélné ose na 4 části (viz obrázek 15). Zleva první a třetí část uzliny byla vyšetřena metodou H-E a imunohistochemicky. Zleva druhý a čtvrtý díl uzliny byl vyšetřen metodou OSNA. Velmi malé lymfatické uzliny byly v podélné ose půleny, kdy jedna polovina byla vyšetřena metodami IHC CK19 a H-E, druhá polovina metodou OSNA. Odebrané uzliny ze všech kompartmentů byly během operace

vloženy do nádob s označením daných skupin. Vzhledem k zohlednění postupu šíření metastatického postižení lymfatickými uzlinami podle lokalizace primárního nebo sekundárního nádoru a z metodických důvodů, byly lymfatické uzliny v rámci jedné uzlinové zóny sloučeny. U každého nemocného byly vyšetřeny uzliny skupiny N1, při pravostranné lokalizaci nádorového ložiska současně i uzliny skupin 2+3, 4, 7, 8+9. U pacientů s levostranným postižením byly vyšetřeny uzliny skupin N1, 4, 5+6, 7, 8+9. Všechny získané vzorky v nádobkách byly označeny štítkem s identifikačními údaji: jméno a příjmení pacienta, rodné číslo, diagnóza, datum a čas odběru, číselné označení skupiny lymfatických uzlin. Nádobky byly odeslány na příslušná pracoviště k dalšímu zpracování vzorků.



**Obrázek 12** - První možnost krájení lymfatických uzlin. Zdroj: MUDr. Šárka Vejvodová, CHK FN Plzeň

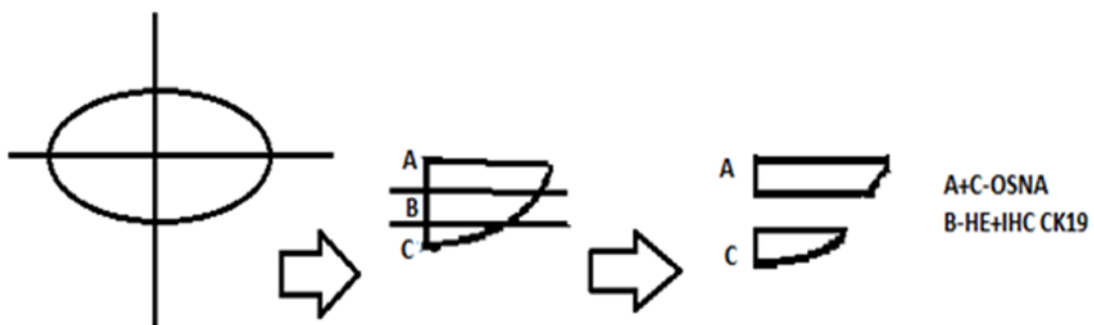
2.



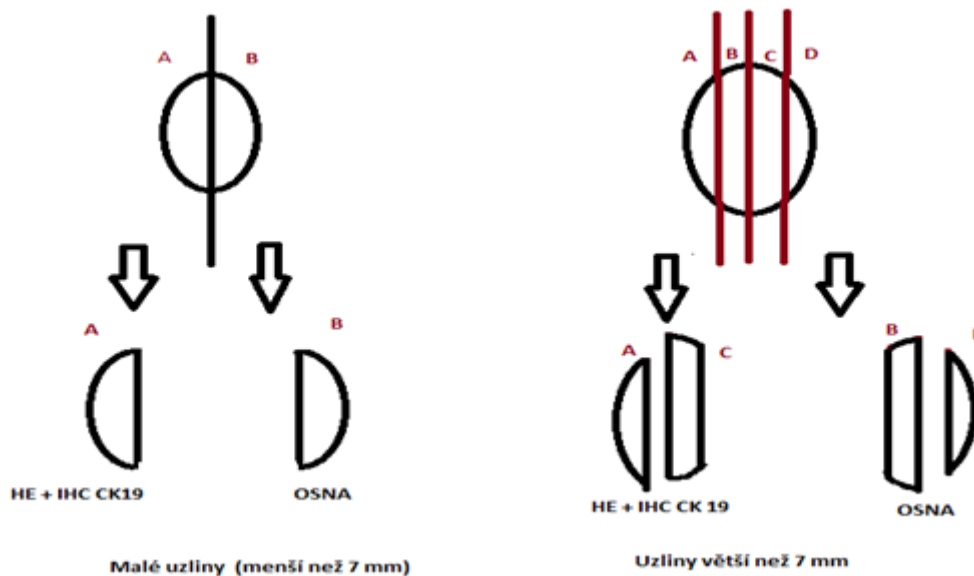
A-HE + IHC 19  
B-OSNA

**Obrázek 13** - Druhá možnost krájení lymfatických uzlin. Zdroj: MUDr. Šárka Vejvodová, CHK FN Plzeň

3.



**Obrázek 14** - Třetí možnost krájení lymfatických uzlin. Zdroj: MUDr. Šárka Vejvodová, CHK FN Plzeň



**Obrázek 15** - Způsob krájení uzlin v naší studii. Zdroj: MUDr. Šárka Vejvodová, CHK FN Plzeň

#### 4.3.4 Histopatologické a imunohistochemické vyšetření

Vzorky zaslané na oddělení Patologické anatomie byly po přípravě vyšetřeny standardním histologickým vyšetřením pomocí barvení hematoxylin-eosin a poté imunohistochemicky s protilátkou proti CK 19.

#### 4.3.5 Metoda OSNA

Části uzlin odeslané na Ústav biologie a Biomedicínského centra byly vyšetřeny metodou OSNA. K vyšetření byla použita souprava LYNOAMP BC OSNA (Sysmex, Kobe, Japonsko). Vyšetření bylo provedeno v přístroji RD100i firmy Sysmex. Vyšetření vzorků probíhalo za pozitivní a negativní kontroly. Vzhledem k možné přítomnosti nečistot bylo provedeno i vyšetření v ředěném vzorku.

### 4.4 Hodnocení výsledků

Vzorky vyšetřené metodou H-E a imunohistochemicky s protilátkou CK 19 byly hodnoceny zkušeným patologem na přítomnost či nepřítomnost nádorových metastáz. Metastatická ložiska byla dělena podle velikosti na makrometastázy, mikrometastázy a clustry buněk (viz tabulka č. 14). Výsledky získané OSNA metodou byly hodnoceny podle kritérií vytvořených Tsujimotem

a jeho kolegy. Podle počtu kopií mRNA CK 19 byla hodnocena přítomnost či nepřítomnost metastatického postižení včetně jeho rozsahu (viz tabulka č. 15). Ze záznamů klinických dat nemocných byly zjištěny informace o datu poslední kontroly nemocného v naší nemocnici (event. datum úmrtí). V případě relapsu onemocnění byla zjištěna doba vzniku relapsu. U obou skupin nemocných (H-E, IHC CK19, OSNA negativní versus OSNA pozitivní) byla porovnána doba vzniku recidivy od doby operace. Protože diseminace maligních buněk do lymfatických uzlin poukazuje na vyšší maligní potenciál onemocnění, byl též zkoumán rozdíl délky přežití u pacientů mající při vyšetření všemi metodami lymfatické uzliny negativní, s pacienty, kteří měli OSNA metodou prokázané metastatické postižení uzlin. Všechny získané výsledky byly porovnány a statisticky zpracovány. Zhodnocení získaných klinicko-patologických dat provedl statistik. Statistická analýza byla provedena s užitím software SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Pravděpodobnost celkového přežití a přežití bez nemoci byla počítána pomocí Kaplan – Meier křivek přežití. Vliv jednotlivých faktorů na OS a DFS byl testován pomocí Log-rank testu. Testovány byly různé varianty kombinací pozitivita a negativita HE, IHC a OSNA. Specificita, senzitivita, pozitivní a negativní prediktivní hodnota zkoumaného parametru OSNA byla stanovena na základě dosažené pozitivita a negativita HE a IHC. Statistická významnost byla stanovena na hranici  $\alpha = 5\%$ .

**Tabulka 14** - Hodnocení metastáz podle velikosti

<b>Typ metastatického postižení</b>	<b>Velikost metastázy</b>
Makrometastáza	> 2 mm
Mikrometastáza	0,2 mm – 2 mm
clustry (trsy) buněk	< 0,2 mm

**Tabulka 15** - Hodnocení metastáz dle kritérií stanovených Tsujimotem [62]

<b>Typ metastatického postižení</b>	<b>Počet kopií mRNA CK 19/<math>\mu</math>l</b>
Makrometastáza	Cut off > 5000
Mikrometastáza	Cut off 250 - 5000
Nepřítomnost nádorových buněk	Cut off < 250



## 4.5 Výsledky

### 4.5.1 Soubor nemocných

Do studie bylo zařazeno 100 pacientů. Průměrný věk nemocných byl 66 let. Nejmladšímu pacientovi bylo 41 let, nejstaršímu 79 let. Soubor zahrnoval 63 mužů a 37 žen. 80 pacientů bylo operováno pro primární plicní karcinom, 20 pacientů pro metastatické postižení plic, kde primárním nádorem byl kolorektální karcinom. Žádnému z pacientů nebyla podána neoadjuvantní chemoterapie. Bližší charakteristika souboru nemocných je zahrnuta v tabulkách 16 - 18. Studie probíhala od února 2013 do listopadu 2017, proto byl pT status hodnocen dle 7. revize TNM klasifikace.

**Tabulka 16 - Zastoupení nemocných podle morfologie nádoru**

<b>Typ nádorového onemocnění</b>	<b>Histologický typ</b>	<b>Počet nemocných</b>	<b>NSCLC (v %)</b>	<b>Z celkového souboru pacientů (v %)</b>
Nemalobuněčný plicní karcinom	Adenokarcinom	45	56,25	45
	Skvamózní karcinom	33	41,25	33
	Adenoskvamózní karcinom	2	2,5	2
Metastázy kolorektálního karcinomu		20		20

**Tabulka 17 - Počet pacientů podle pT nálezů**

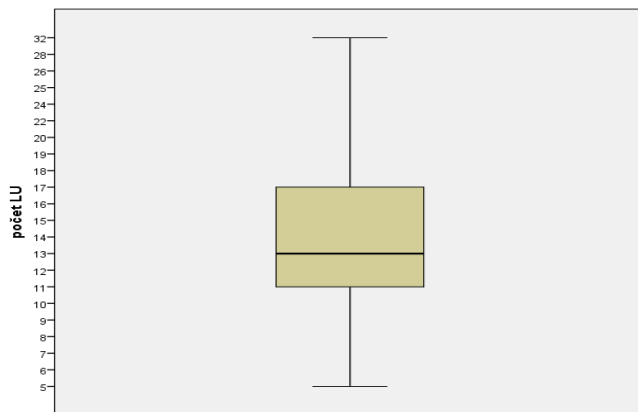
<b>pT status nemalobuněčného plicního karcinomu</b>	<b>počet</b>	<b>%</b>
T1a	20	25
T1b	22	27,5
T2a	26	32,5
T2b	6	7,5
T3	5	6,25
T4	1	1,25

**Tabulka 18 - Počet operací podle typu resekce**

<b>Typ operace</b>	<b>počet</b>	<b>lokalizace</b>	<b>Počet</b>
Klínovitá resekce, laserová excize	14	KR 2xPHL+PSL	1
		KR LDL	2
		KR LHL	3
		KR PDL	2
		KR PHL	2
		KR PHL 2x + KR PDL	2
		KR PHL + KR PDL	1
		KR + laser LHL	1
Lobektomie	74	LDL	9
		LHL	16
		PDL	17
		PHL	29
		PHL + S6	1
		PSL	2
Bilobektomie	6	Dolní	3
		Horní	3
Pneumonektomie	6	Levostranná	3
		Pravostranná	3

#### 4.5.2 Odběr lymfatických uzlin

V našem souboru u 100 nemocných bylo celkem vyšetřeno 1429 uzlin. V průměru bylo odebráno 14,26 uzlin. Medián je 13,00. Nejméně bylo odebráno 5 uzlin, nejvíce 32 uzlin. Viz obrázek 16.



**Obrázek 16** - Počet odebraných uzlin při mediastinální nodální disekci

#### 4.5.3 Postižení lymfatických uzlin metastatickým procesem

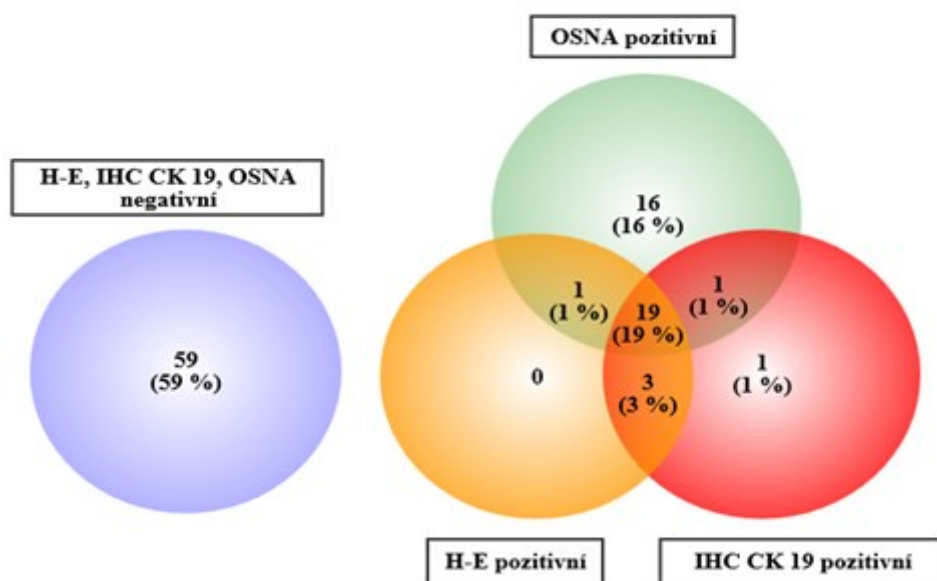
U pacientů operovaných pro primární plicní karcinom bylo prokázáno metastatické postižení lymfatických uzlin v 46 %, u nemocných operovaných pro metastázu kolorektálního karcinomu v 20 %.

#### 4.5.4 Míra shody metod OSNA, IHC CK 19 a H-E

##### 4.5.4.1 Míra shody metod OSNA, IHC CK19 a H-E u všech pacientů

U 78 pacientů z celkového počtu nemocných (78 %) byla shoda ve vyšetření všemi metodami. Shodou ve vyšetření je myšlen fakt, že všechny tři metody (histologické vyšetření s barvením H-E, imunohistochemické vyšetření s protilátkou CK 19 a metoda OSNA) byly shodně negativní či pozitivní. Shoda všech vyšetřovacích metod ve smyslu negativity byla v souboru nemocných prokázána u 59 osob, pozitivní shoda u 19 pacientů. U 22 pacientů byly získány rozdílné výsledky. U 16 % pacientů ze všech vyšetřených byla prokázána pozitivita metody OSNA při negativitě zbylých metod (HE, IHC CK19). Naopak u třech pacientů byla negativní metoda OSNA při pozitivitě vyšetření HE a IHC CK19. U jednoho pacienta byl zaznamenán

negativní výsledek vyšetření HE při pozitivitě zbylých metod, u jednoho pacienta negativní výsledek při imunohistochemickém vyšetření při pozitivitě vyšetření metod HE a OSNA. Jeden pacient měl pozitivní výsledek IHC CK19 při negativitě zbylých metod. Shodu výsledků vyšetření jednotlivými metodami na přítomnost metastáz znázorňuje následující Vennův diagram (obrázek 17).



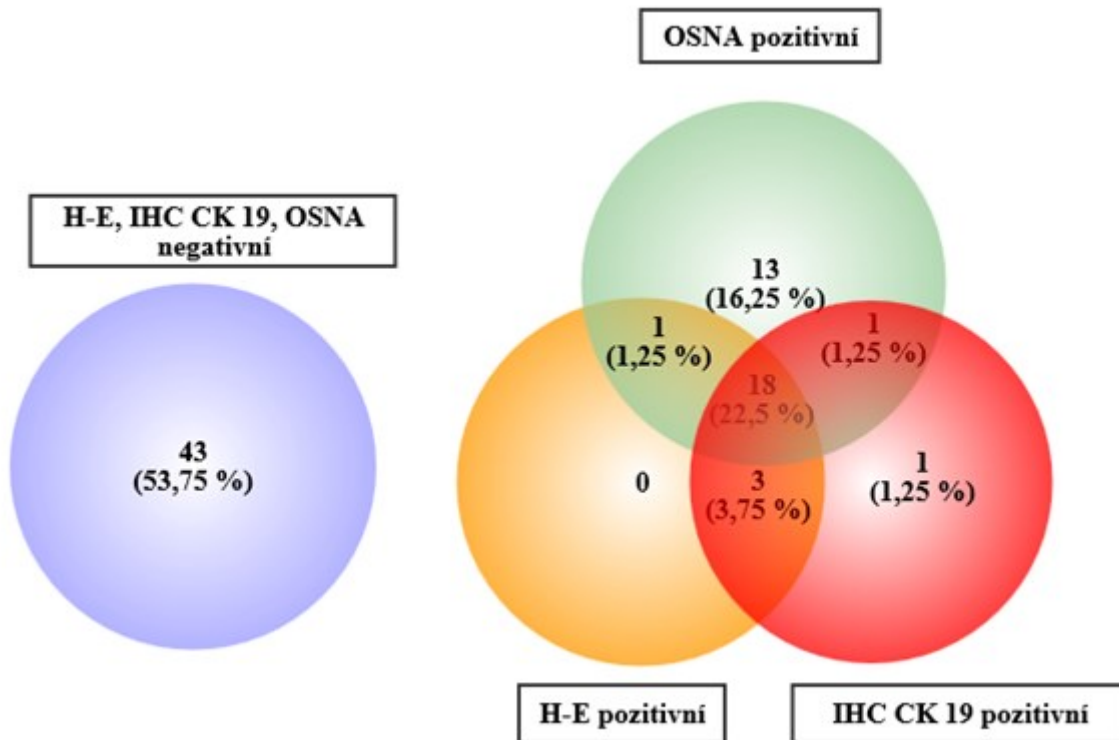
**Obrázek 17** - Shoda vyšetřovacích metod u všech operovaných pacientů

#### 4.5.4.2 Míra shody metod OSNA, IHC CK19 a H-E u pacientů operovaných pro primární plicní karcinom

U 80 pacientů operovaných pro primární plicní karcinom byly shodné výsledky všech tří vyšetřovacích metod v 76,3 % (čili u 61 pacientů). Shoda ve smyslu negativity u 43 osob, shoda ve smyslu pozitivního nálezu u 18 nemocných.

Rozdílné výsledky byly zjištěny u 19 osob. Ve 13 případech byla metoda OSNA pozitivní při negativním histologickém a imunohistochemickém nálezu. Ve třech případech OSNA metoda neprokázala metastatické postižení lymfatických uzlin, avšak zbylé dvě metody byly s pozitivním nálezem. V jednom případě byl prokázán negativní výsledek při standardním histologickém vyšetření, kdy imunohistochemické vyšetření a OSNA metoda byly s pozitivním nálezem. U jedné osoby byl prokázán negativní výsledek imunohistochemického vyšetření při

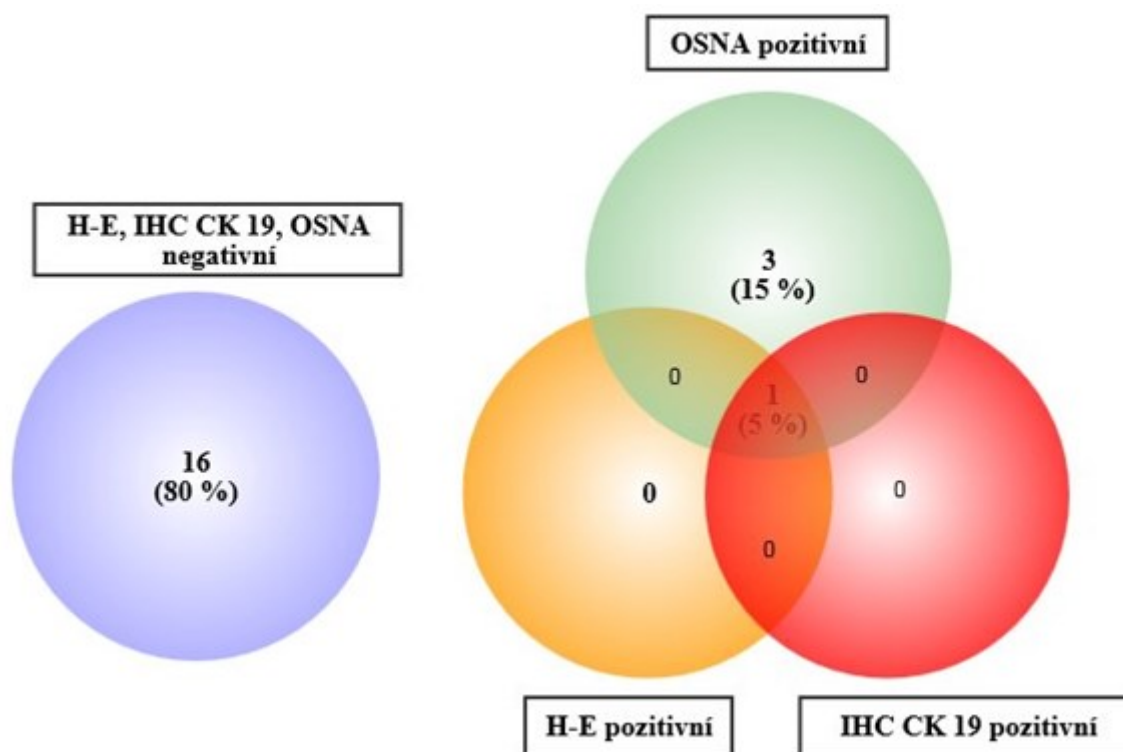
pozitivitě zbylých dvou metod, a v jednom případě pozitivní výsledek imunohistochemického vyšetření při negativitě zbylých dvou metod. Shodu vyšetřovacích metod v souboru nemocných operovaných pro primární plicní karcinom znázorňuje Vennův graf na obrázku 18.



**Obrázek 18** - Shoda vyšetřovacích metod u pacientů s NSCLC

#### 4.5.4.3 Míra shody metod OSNA, IHC CK19 a H-E u pacientů operovaných pro plicní metastázy kolorektálního karcinomu

Pro plicní metastázy kolorektálního karcinomu bylo operováno 20 nemocných. Výsledky se shodovaly u 17 pacientů. Negativní shoda byla prokázána v 16 případech, pozitivní u jednoho pacienta. Zbývající 3 pacienti měli OSNA metodou prokázané metastatické postižení LU při negativitě zbylých dvou vyšetřovacích metod (viz obrázek 19).



**Obrázek 19** - Shoda vyšetřovacích metod u pacientů s plicními metastázami kolorektálního karcinomu

#### 4.5.4.4 OSNA metoda versus IHC CK19 a H-E

Při srovnání jednotlivých metod vyšetření (H-E, IHC CK 19 a OSNA) v našem souboru vykazují metody H-E a IHC CK 19 téměř shodné výsledky vyšetření, zatím co metoda OSNA ukazuje na vyšší procento pacientů s průkazem metastatického postižení lymfatických uzlin (viz tabulka 19).

**Tabulka 19** - Srovnání metod H-E, IHC CK 19 a OSNA podle postižení LU

Typ metody	Výsledek vyšetření	Počet pacientů	%
H-E	Pozitivní	23	23
	Negativní	77	77
IHC CK19	Pozitivní	24	24
	Negativní	76	76
OSNA	Pozitivní	37	37
	Negativní	63	63

Ve skupině pacientů s prokázaným metastatickým postižením pouze metodou OSNA bylo u 8 pacientů prokázano metastatické postižení uzlin skupiny N1, u třech pacientů u skupin N1 i N2 uzlin, v pěti případech pouze v zónách N2 uzlin. Přehled počtu nemocných podle velikosti metastatického ložiska (velikost je hodnocena podle kritérií stanovených Tsujimotem) (viz tabulka 20).

Tabulka 20 - Velikost prokázaných metastáz OSNA metodou

<b>Velikost metastáz</b>	<b>Počet pacientů</b>
Mikrometastáza	13
Makrometastáza	2
Mikro + makrometastáza	1

#### 4.5.5 Senzitivita, specifita a prediktivní hodnoty metody OSNA a IHC-CK 19

Ze získaných údajů vyšetření byly vytvořeny kontingenční tabulky a spočítány hodnoty senzitivity, specifity a prediktivních hodnot metody OSNA. Hodnota zkoumaného parametru OSNA byla stanovena na základě dosažené pozitivivity a negativivity H-E a IHC. Hodnoty byly stanoveny pro celý soubor nemocných, poté zvlášť pro primární plicní nádory a pro metastázy. Přehled získaných hodnot dokumentují následující tabulky 21-22.

Tabulka 21 - Senzitivita, specifita a prediktivní hodnoty metody OSNA versus H-E

## OSNA metoda versus H-E

### 1. Celý soubor pacientů

---

Senzitivita	78,05 %
Specifita	93,46 %
Pozitivní prediktivní hodnota	51,61 %
Negativní prediktivní hodnota	97,95 %

### 2. Pacienti s primárním plicním nádorem

---

Senzitivita	79,49 %
Specifita	92,52 %
Pozitivní prediktivní hodnota	53,45 %
Negativní prediktivní hodnota	97,66 %

### 3. Pacienti s metastatickým postižením plic

---

Senzitivita	50,00 %
Specifita	96,94 %
Pozitivní prediktivní hodnota	25,00 %
Negativní prediktivní hodnota	98,96 %



Tabulka 22 - Senzitivita, specifita a prediktivní hodnoty metody OSNA versus IHC-CK 19

## OSNA metoda versus IHC

### 1. Celý soubor pacientů

Senzitivita	78,57 %
Specifita	93,67 %
Pozitivní prediktivní hodnota	53,23 %
Negativní prediktivní hodnota	97,95 %

### 2. Pacienti s primárním plicním nádorem

Senzitivita	80,00 %
Specifita	92,78 %
Pozitivní prediktivní hodnota	55,17 %
Negativní prediktivní hodnota	97,66 %

### 3. Pacienti s metastatickým postižením plic

Senzitivita	50,00%
Specifita	96,94 %
Pozitivní prediktivní hodnota	25,00 %
Negativní prediktivní hodnota	98,96 %

#### 4.5.6 Změna klinického stadia na podkladě získaných výsledků

Z výše uvedeného vyplývá, že u 16 pacientů bylo OSNA metodou na rozdíl od H-E a IHC CK19 prokázáno metastatické postižení v lymfatických uzlinách. Na základě postižení lymfatických uzlin metastatickým procesem dochází ke změně zařazení nemocných do vyššího klinického stadia nemoci. Naopak u třech pacientů, kde byla metoda OSNA při vyšetření lymfatických uzlin negativní za současné positivity H-E a IHC CK 19, by stanovení klinického stadia při pouhém vyšetření OSNA metodou vedlo k podhodnocení stadia nemoci. Dopad neshod detekce nádorových buněk v lymfatických uzlinách všemi třemi metodami na patologický TNM staging poukazuje následující tabulka 23.

**Tabulka 23** - Změny pTNM stagingu v závislosti na výsledcích vyšetření (H-E, IHC CK19 a OSNA)

**NSCLC**

H&E		IHC CK19		OSNA		Počet pacientů
TNM	St	TNM	St	TNM	St	
T1aN0	IA	T1aN0	IA	T1aN2	IIIA	2
T1bN0	IA	T1bN0	IA	T1bN1	IIA	4
T1bN0	IA	T1bN0	IA	T1bN2	IIIA	1
T2aN0	IB	T2aN0	IB	T2aN1	IIA	2
T2aN0	IB	T2aN0	IB	T2aN2	IIIA	4
T1aN1	IIA	T1aN1	IIA	T1aN0	IA	1
T1aN2	IIIA	T1aN2	IIIA	T1aN0	IA	1
T2aN2	IIIA	T2aN2	IIIA	T2aN0	IB	1
T1bN0	IA	T1bN2	IIIA	T1bN0	IA	1
T3N2	IIIA	T3N0	IIB	T3N2	IIIA	1
T2aN0	IB	T2aN1	IIA	T2aN1	IIA	1

**Metastázy KRCA**

N0	-	N0	-	N1	-	2
N0	-	N0	-	N2	-	1

### Legenda k tabulce č. 23

Barevné označení značí nemocné, kteří jsou zařazeni dle výsledku metod do vyšších nebo nižších klinických stadií nemoci.

	vyšší klinické stadium dle OSNA metody
	nižší klinická stadia dle OSNA metody
	vyšší klinické stadium dle IHC CK19
	nižší klinické stadium dle IHC CK19
	vyšší klinické stadium dle IHC CK 19 a OSNA metody
	pozitivní uzliny dle OSNA metody

#### 4.5.7 Délka přežití a recidiva onemocnění

##### 4.5.7.1 Délka přežití u pacientů operovaných pro primární plicní karcinom

Z hlediska pTNM klasifikace byli pacienti rozděleni do příslušných klinických stadií. Počet nemocných v dané skupině dle použité metody při hodnocení stavu lymfatických uzlin zaznamenávají následující tabulky 24 - 25.

**Tabulka 24** - Rozdělení pacientů do klinických stadií dle výsledků H-E

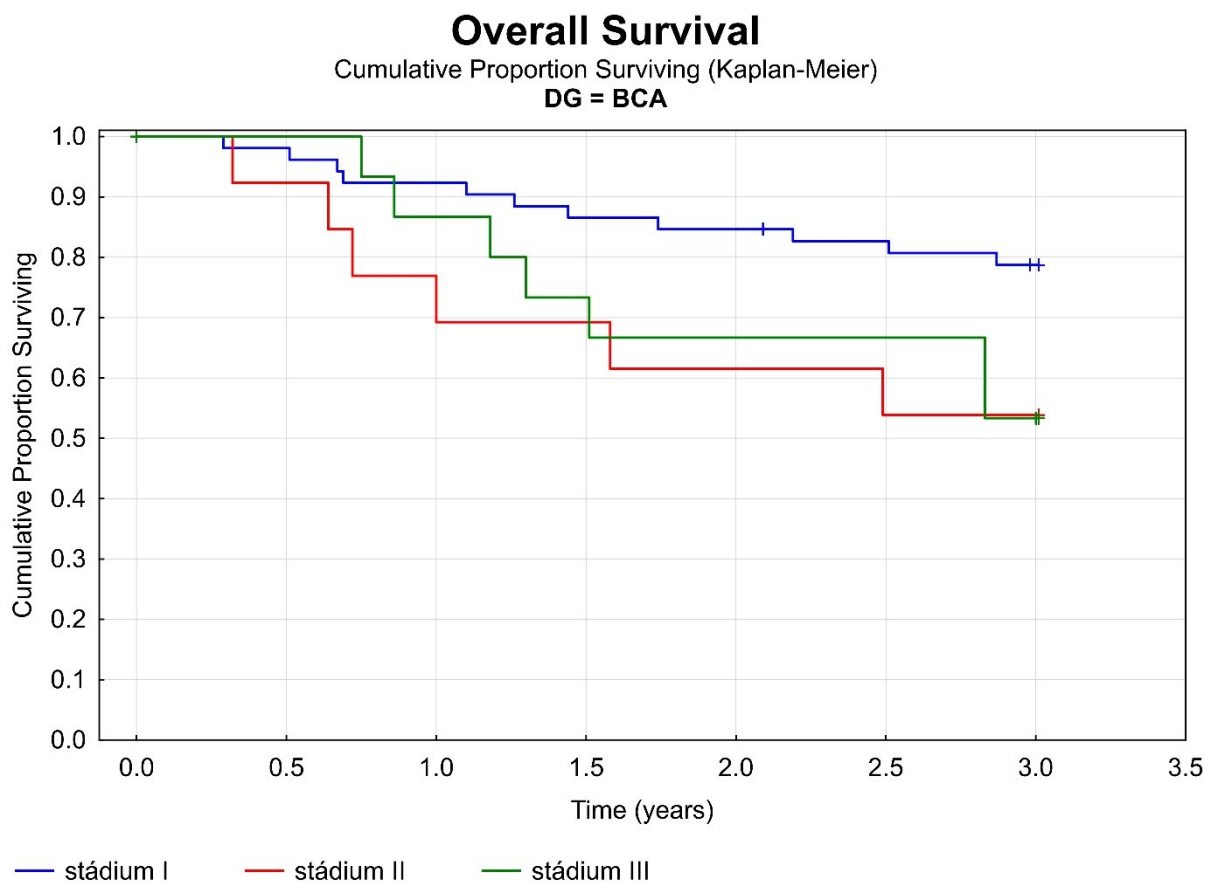
Klinické stadium	počet nemocných	z celk. počtu (v %)
I	52	65
IIA	1	1
IIB	12	15
IIIA	12	15
IIIB	3	4

**Tabulka 25** - Rozdělení pacientů do klinických stádií dle výsledků OSNA

Klinické stadium	počet nemocných	z celk. počtu (v %)
I	39	49
IIA	7	9
IIB	12	15
IIIA	19	24
IIIB	3	4

Dle doporučených postupů pacienti v klinických stádiích II a III obdrželi adjuvantní onkologickou léčbu. Žádný pacient neobdržel neoadjuvantní terapii. Při hodnocení stavu pN metodou HE neobdrželo adjuvantní léčbu 52 pacientů, kteří byli zařazeni do I. stádia nemoci. Medián sledování nemocných operovaných pro primární plicní karcinom je 3 roky 7 měsíců a 20 dní. Z této skupiny nemocných po dobu sledování zemřelo 24 pacientů, zbylých 56 pacientů žije, u 39 žijících nemocných byla zaznamenána recidiva onemocnění.

Rozdíly v přežití pacientů s primárním plicním karcinomem z hlediska klinických stádií dokumentuje následující Kaplan-Meier graf na obrázku 20. Stav lymfatických uzlin, zda jsou či nejsou postiženy metastatickým procesem, byl hodnocen standardní metodou H-E.



**Obrázek 20** - Rozdíly v přežití pacientů s primárním plicním karcinomem z hlediska klinických stádií

Následné tabulky 26-28 přehledně dokumentují procento přeživších nemocných v závislosti na době od operace z pohledu jednotlivých klinických stádií nemoci.

**Tabulka 26** - Procento přeživších nemocných v závislosti na době od operace - klinické stádium I

Doba od operace	přežití (v %)
1. rok	92
2. rok	85
3. rok	79

**Tabulka 27** - Procento přeživších nemocných v závislosti na době od operace -  
klinické stádium II

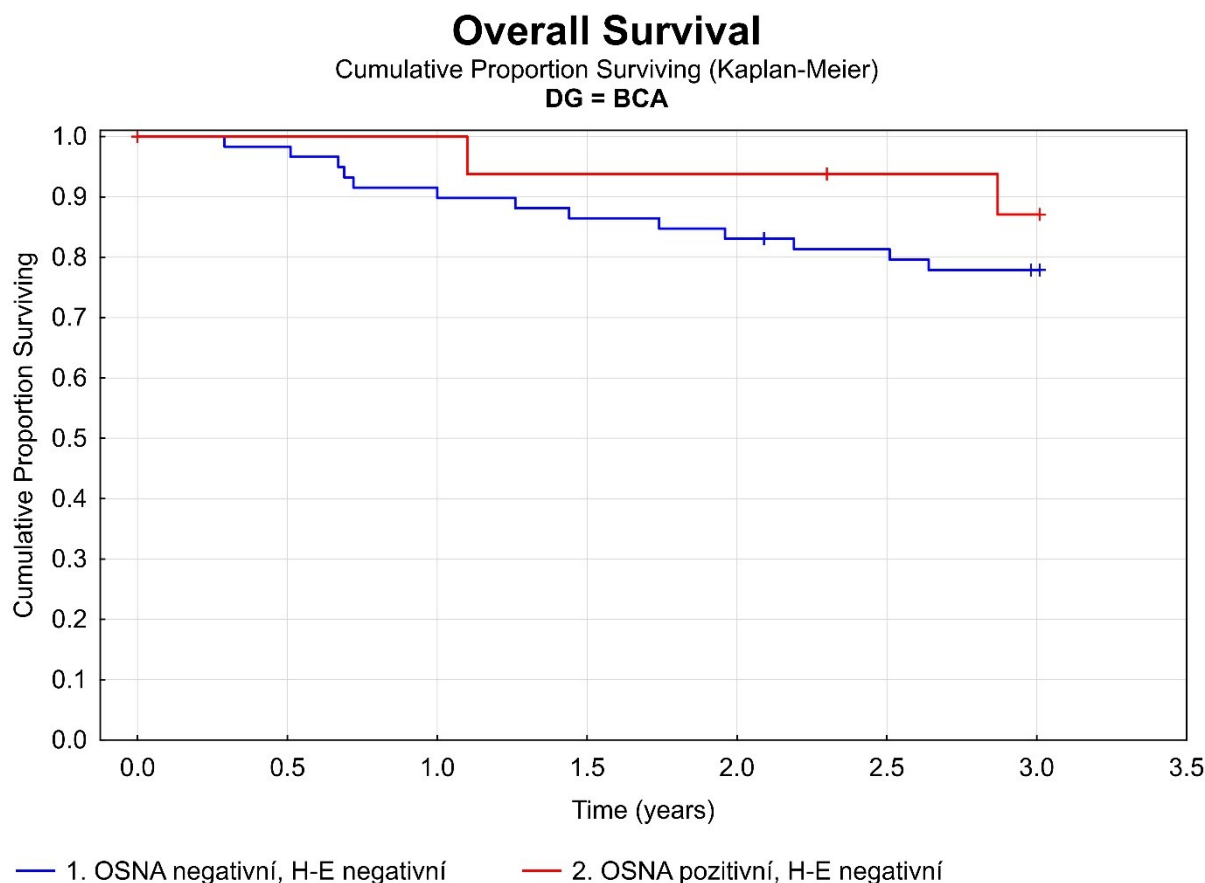
doba od operace	přežití (v %)
1. rok	69
2. rok	62
3. rok	54

**Tabulka 28** - Procento přeživších nemocných v závislosti na době od operace - klinické  
stádium III

doba od operace	Přežití (v %)
1. rok	87
2. rok	67
3. rok	53

Pokud by stav lymfatických uzlin byl hodnocen metodou OSNA, 13 nemocných by bylo zařazeno do vyšších klinických stádií nemoci.

K tomuto faktu byl zkoumán rozdíl délky přežití mezi pacienty majícími při vyšetření všemi metodami (H-E, IHC CK19, OSNA) lymfatické uzliny negativní a pacienty, kteří měli OSNA metodou prokázané metastatické postižení uzlin. Statistické hodnocení bylo provedeno i přes velmi malý soubor nemocných a velmi krátký časový úsek sledování. Doba přežití jednotlivých skupin se statisticky významně nelišila ( $p$ -value 0,41) - viz obrázek 21 a tabulka 29.



**Obrázek 21** - Srovnání délky přežití pacientů OSNA + a OSNA-

**Tabulka 29** - Srovnání přežití pacientů OSNA + a OSNA-

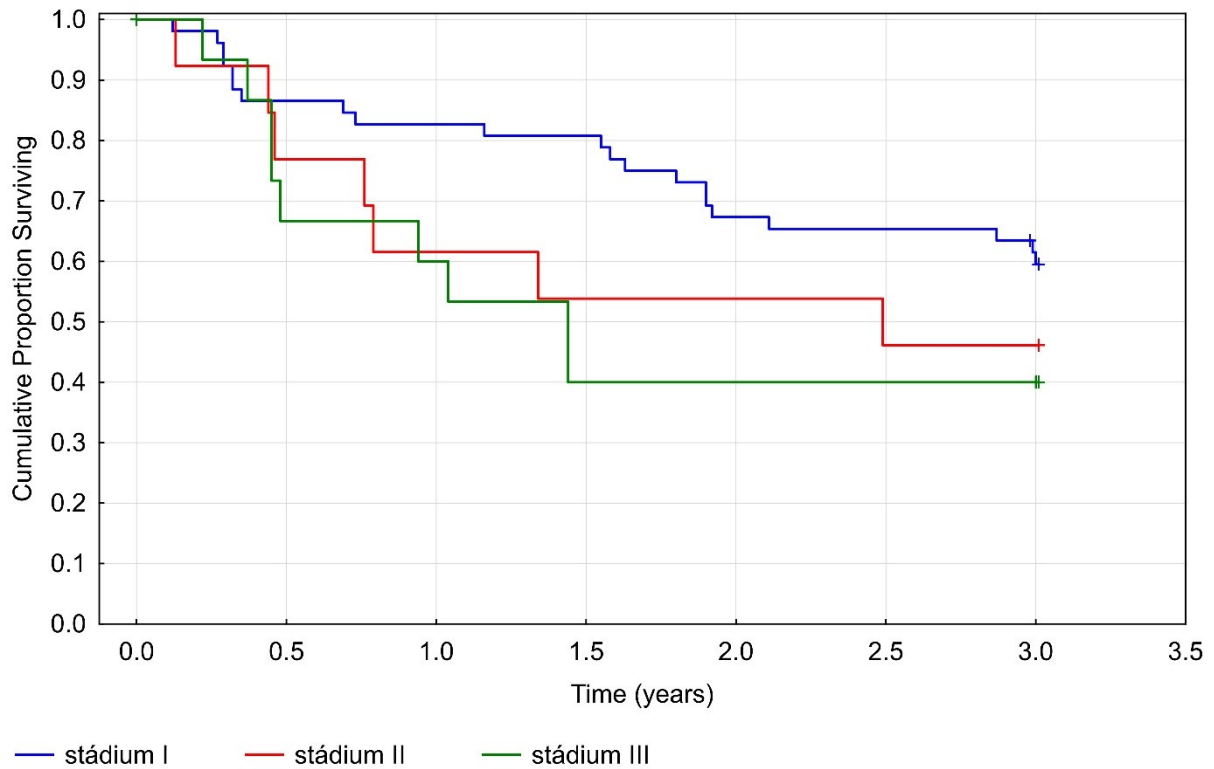
Doba od operace	Přežití (v %)	
	OSNA +	OSNA -
1. rok	100	86
2. rok	92	79
3. rok	85	74

#### 4.5.7.2 Recidiva onemocnění u pacientů operovaných pro primární plicní karcinom

V našem souboru operovaných pro primární plicní karcinom v časném stádiu nemoci jsme zaznamenali relaps onemocnění u 29 % nemocných. Následující obrázek 22 dokumentuje vznik recidivy onemocnění v závislosti na době operace u jednotlivých klinických stádií.

## Disease Free Survival

Cumulative Proportion Surviving (Kaplan-Meier)



**Obrázek 22** - Vznik recidivy onemocnění v závislosti na době operace u jednotlivých klinických stádií

Následné tabulky 30-32 dokumentují procento nemocných bez známek recidivy v závislosti na době od operace z pohledu jednotlivých klinických stádií nemoci.

**Tabulka 30** - Procento nemocných bez známek recidivy onemocnění v závislosti na době od operace - klinické stádium I

Doba od operace	Pacienti bez recidivy (v %)
1. rok	83
2. rok	67
3. rok	60



**Tabulka 31** - Procento nemocných bez známek recidivy onemocnění v závislosti na době od operace - klinické stádium II

Doba od operace	Pacienti bez recidivy (v %)
1. rok	62
2. rok	54
3. rok	46

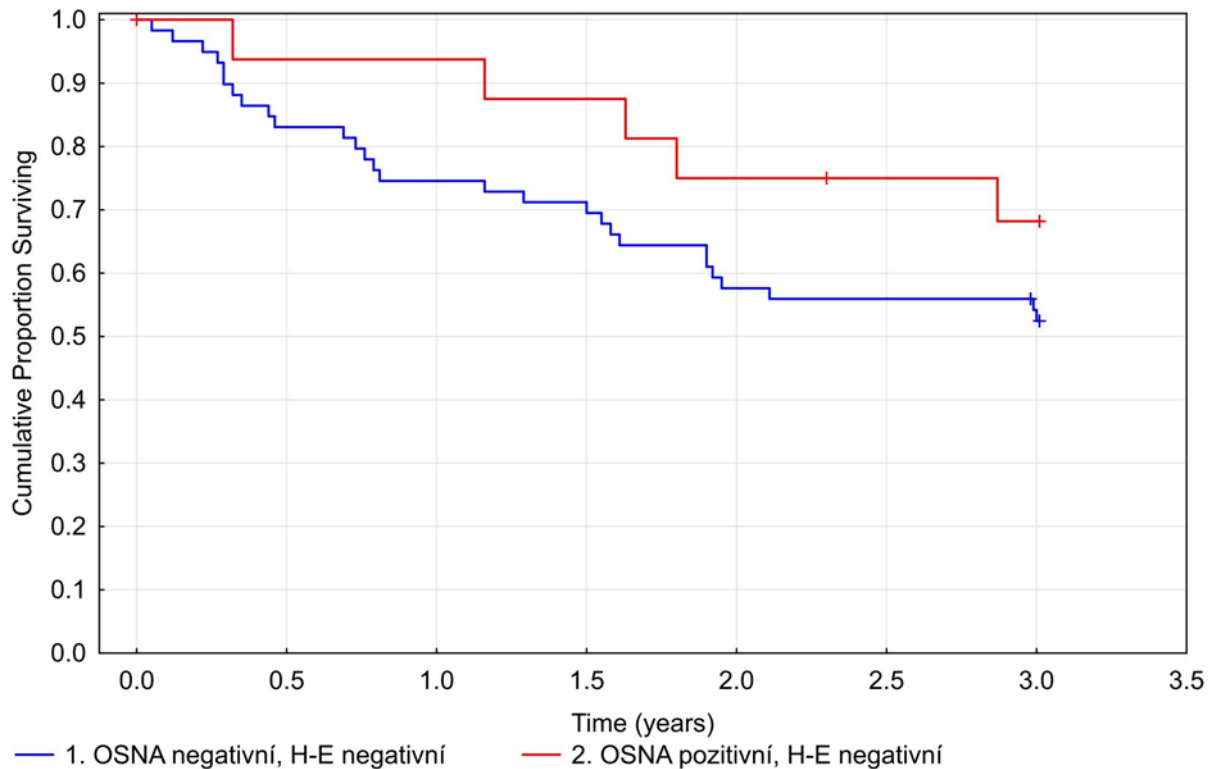
**Tabulka 32** - Procento nemocných bez známek recidivy onemocnění v závislosti na době od operace - klinické stádium III

Doba od operace	Pacienti bez recidivy (v %)
1. rok	60
2. rok	40
3. rok	40

Procento nemocných bez známek recidivy v závislosti na době od operace z pohledu postižení LU metastatickým procesem zaznamenává obrázek 23 a tabulka 33. Srovnávání jsou pacienti mající při vyšetření všemi metodami (H-E, IHC CK19, OSNA) lymfatické uzliny negativní (OSNA-) s pacienty, kteří měli OSNA metodou prokázané metastatické postižení uzlin (OSNA+). Rozdíl mezi jednotlivými skupinami nebyl statisticky významný (p-value 0,64).

## Disease Free Survival

Cumulative Proportion Surviving (Kaplan-Meier)

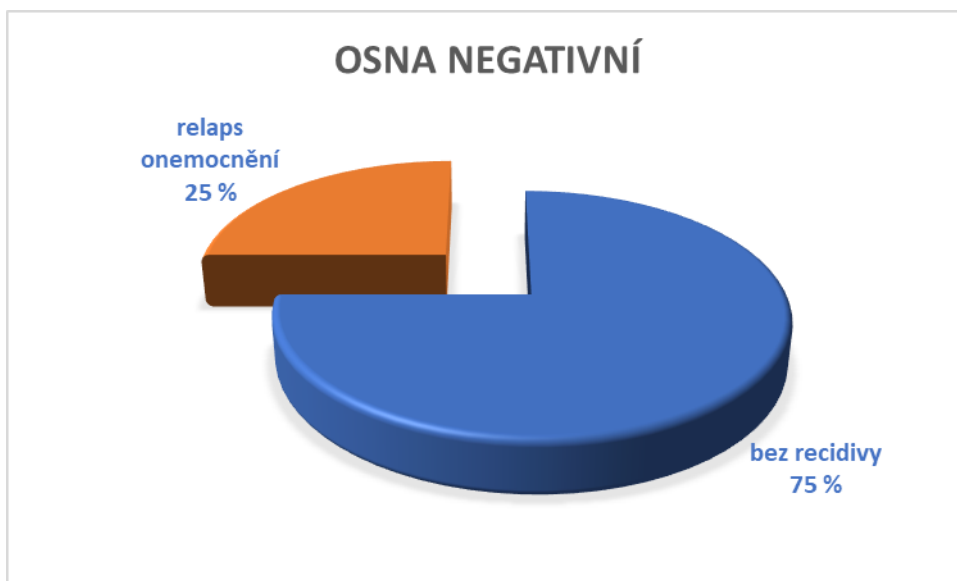


**Obrázek 23** - Srovnání vzniku recidivy u OSNA+ a OSNA-

**Tabulka 33** - Srovnání pacientů OSNA+ a OSNA- z hlediska vzniku recidivy v závislosti na době od operace

Doba od operace	Pacienti bez recidivy (v %)	
	OSNA +	OSNA-
1. rok	94	75
2. rok	75	58
3. rok	68	53

Rozdíly v % zastoupení pacientů dle vzniku relapsu onemocnění při hodnocení stavu lymfatických uzlin metodou OSNA jsou zobrazeny na obrázku 24 a 25.



**Obrázek 24** - Procento recidiv u pacientů s primárním plicním karcinomem - pN dle OSNA negativní



**Obrázek 25** - Procento recidiv u pacientů s primárním plicním karcinomem - pN dle OSNA pozitivní

#### 4.5.7.3 Délka přežití a recidiva onemocnění u pacientů operovaných pro metastázu kolorektálního karcinomu

Medián sledování nemocných operovaných pro metastázu kolorektálního karcinomu byl 3 roky 9 měsíců a 11 dní. Z této skupiny nemocných po dobu sledování zemřeli 3 pacienti, ze 17 žijících byla zaznamenána recidiva onemocnění u 7 nemocných. Celkem byla recidiva či úmrtí

prokázána u 10 nemocných. Následující tabulka 32 zaznamenává procento přeživších nemocných v závislosti na době od operace.

**Tabulka 34** - Procento přeživších nemocných v závislosti na době od operace

Doba od operace	Přežití (v %)
1. rok	95
2. rok	90
3. rok	85

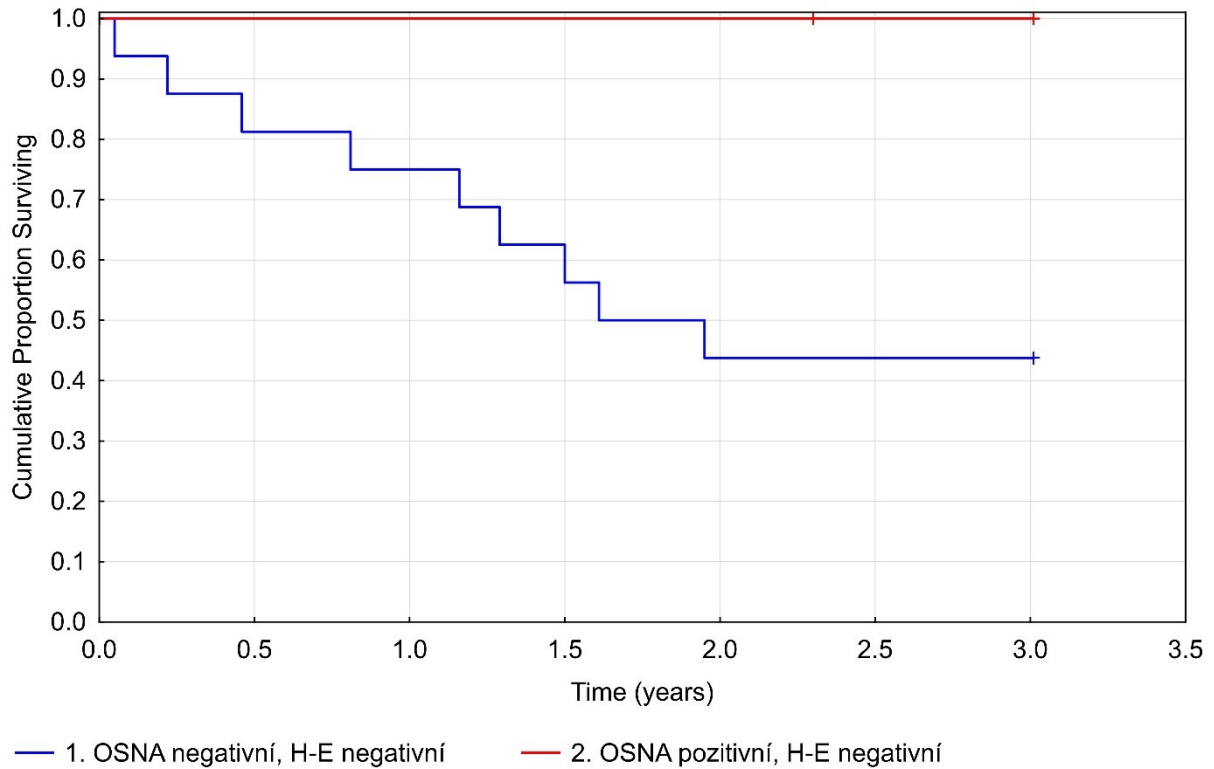
Následující tabulka č. 35 dokumentuje procento nemocných bez známek recidivy v závislosti na době od operace. Graf na obrázku 26 ukazuje rozdíl v DFI od doby operace u OSNA + a OSNA-. Tento rozdíl nebyl statisticky významný (p-value 0,12). Tabulka 36 zaznamenává procento nemocných bez známek recidivy v závislosti na době od operace z pohledu postižení LU metastatickým procesem.

**Tabulka 35** - Procento nemocných bez známek recidivy onemocnění v závislosti na době od operace

Doba od operace	Pacienti bez recidivy (v %)
1. rok	75
2. rok	50
3. rok	50

## Disease Free Survival

Cumulative Proportion Surviving (Kaplan-Meier)  
DG = CRC



**Obrázek 26** - Srovnání vzniku recidivy u OSNA+ a OSNA-

**Tabulka 36** - Srovnání pacientů OSNA+ a OSNA- z hlediska vzniku recidivy v závislosti na době od operace

Doba od operace	Pacienti bez recidivy (v %)	
	OSNA +	OSNA -
1. rok	100	75
2. rok	100	44
3. rok	100	44

## 5 Diskuze

Proces metastazování je jedním ze základních rysů malignity nádoru. Přítomnost metastáz poukazuje na pokročilost onemocnění a je hlavním faktorem kurability a prognózy. Poněvadž primární i sekundární plicní nádory metastazují lymfogenně do regionálních lymfatických uzlin, jejich vyšetření sehrává významnou roli pro stanovení správného klinického stadia nemoci s cílem naplánování adekvátní terapie.

V dnešní době je jediným standardním vyšetřením lymfatických uzlin na přítomnost metastáz histologická metoda. Ze statistických údajů je patrné, že až u 40 % pacientů po radikální chirurgické resekci plicního nádoru s histologicky negativními regionálními uzlinami dochází k relapsu onemocnění do 24 měsíců po operaci [63]. U pacientů v klinickém stádiu I je zaznamenán relaps onemocnění až ve 20 % do pěti let od operace [64]. Možným vysvětlením časného relapsu je, že i když jsou lymfatické uzliny histologicky negativní, mohou obsahovat mikrometastázy, jejichž přítomnost je důležitým ukazatelem vysokého maligního potenciálu onemocnění s tendencí ke vzniku lokálních či vzdálených relapsů onemocnění i přes radikální chirurgickou léčbu.

Možnosti zpřesnění diagnostiky mikrometastatického postižení regionálních lymfatických uzlin mohou přinášet imunohistochemické a molekulární vyšetřovací metody detekující cytokeratin CK19 exprimovaný epiteliálními nádory [65, 66]. Obě metody se nyní rutinně nevyužívají, avšak četné studie, které dosud byly publikovány, poukazují na velmi slibné výsledky. Např. Passlick a kol. ve své studii v roce 2001 prokazují imunohistochemicky mikrometastázy až v 16 % při negativitě histologické metody [63]. Podobné výsledky dokumentují ve své studii i Chen a kol., kteří prokazují mikrometastázu v 17 % u 588 vyšetřených lymfatických uzlin [67]. Nicholson a kol. prokazují hodnoty up-stagingu nižší ve srovnání s předchozími studiemi, pouze 6 %, což vysvětlují větším souborem vyšetřených plátků lymfatických uzlin (1447) [68]. V letech 1997 až 2002 byla provedena prospektivní studie Cancer and Leukemia Group B 9761 (CALBG 9761) zahrnující 501 pacientů. Zde byla imunohistochemická pozitivita uzlin prokázána ve 14 % z celkového počtu 298 pacientů [64]. V roce 2003 publikovali Vollmer s kolegy studii, kde porovnávali možnosti detekce mikrometastáz v lymfatických uzlinách u nemocných s NSCLC. Histologicky a poté imunohistochemicky bylo vyšetřeno 825 uzlin u 193 pacientů. Porovnáním senzitivity obou metod byla zjištěna dvojnásobná detekce pozitivních lymfatických uzlin IHC metodou oproti H-E [69].

Druhou možností detekce mikrometastáz je molekulárně genetická metoda OSNA (One-Step Nucleic Acid Amplification) na podkladě stanovení mRNA CK19 metodou RT-LAMP. Výhodou této metody je zpracování celé lymfatické uzliny, která je homogenizována. Tím je eliminována možnost minutí mikrometastázy uložené mimo zkoumanou linii řezu. Croner a kol. ve své studii publikují tuto možnost až ve 20 % [70]. Vogelaar a kol. ve své práci prokazují na podkladě senzitivnější detekce metastatického postižení lymfatických uzlin OSNA metodou u nemocných s kolorektálním karcinomem up-staging o 36,4 %. První studii zaměřenou na srovnání metody OSNA se standardním histologickým vyšetřením provedli v roce 2007 Tsujimoto s kolegy, kteří prokázali citlivost OSNA metody 95,8 %, její specifitu 98,6 % a míru shody 98,2 % u 325 vyšetřených lymfatických uzlin [62].

Prvotně byla metoda OSNA vyvinuta k průkazu metastatického postižení lymfatických uzlin u karcinomu prsu k peroperační diagnostice mikrometastáz pro krátký časový interval při vyšetření. Od té doby proběhly četné studie zabývající se srovnáváním detekce mikrometastáz OSNA metodou u karcinomu prsu (např. Visserova, Schemova, Tamakiho, Feldmanova, Buglioniho studie atd.) [71–77]. V období let 2007-2015 bylo celkem vyšetřeno 6808 lymfatických uzlin u pacientů s karcinomem prsu, kde průměrná citlivost OSNA metody je 89,3 %, průměrná specifita 94,8 % a míra shody v 93,8 %, negativní prediktivní hodnota 97,6 % [72]. Pro rychlost vyšetření a možnost využití při peroperační diagnostice v případě průkazu diseminace metastatického procesu do sentinelových uzlin je v literatuře dostupná řada studií srovnávající metodu OSNA se standardním histologickým vyšetřením u karcinomů různé lokalizace, např. u karcinomu kolorekta, žaludku nebo štítné žlázy [59, 78–82]. I tyto studie přinesly obdobné výsledky jako u karcinomu prsu. Např. Yamamoto a kol. ve své studii vyšetřili 1925 lymfatických uzlin u nemocných s kolorektálním karcinomem prokazující senzitivitu OSNA metody 86,2 %, specifitu 96,5 %, míru shody v 95,7 %, negativní prediktivní hodnotu 100 % [82]. Del Carmen a kol. u nemocných s karcinomem štítné žlázy prokazují vyšetřením 273 uzlin senzitivitu OSNA metody 81,5 %, specifitu 92,1 %, míru shody v 87,9 %, negativní prediktivní hodnotu 88,3 % [59].

Studie zabývající se vyšetřováním lymfatických uzlin u primárních plicních karcinomů jsou ojedinělé. V roce 2012 Inoue a kol. prezentovali studii peroperačně vyšetřených 165 lymfatických uzlin u 49 pacientů s karcinomem plic. Prokázaná citlivost OSNA metody byla 95,0 %, specifita 99,3 % a míra shody v 98,8 % [61]. Mezi další studie patří například výzkum Hayama a kol. srovnávající detekci nádorových buněk OSNA metodou s histologickým vyšetřením u 20 pacientů. V této studii bylo vyšetřeno 149 uzlin. Zjištěná senzitivita OSNA

metody byla 100 %, specifita 92 % [83]. V roce 2014 Massai a kol. zkoumali expresi cytokeratinu CK19 u primárních plicních nádorů a u plicních metastáz karcinomu prsu. Studie analyzující 801 uzlin prokázala expresi CK 19 u většiny primárních plicních nádorů mimo pleomorfního adenokarcinomu, malobuněčného karcinomu a karcinoidu. V 90,9 % (30 ze 33) případů studie potvrdila expresi CK19 u plicních metastáz karcinomu prsu [46]. V roce 2016 Nakagawa s kolegy publikovali data o vyšetření 410 lymfatických uzlin u 111 pacientů. V této studii byla citlivost metody 79,7 %, míra shody 92,7 % [60]. Z výše uvedeného vyplývá, že je celá řada studií zjišťující údaje o citlivosti metody OSNA, míře specifity a shody jednotlivých metod vyšetření (OSNA versus histologické vyšetření, imunohistochemie versus histologické vyšetření).

Dostupné studie u karcinomu plic srovnávají metodu OSNA se standardním histologickým vyšetřením v případě peroperační diagnostiky. Protože v případě diseminace metastatického postižení do regionálních lymfatických uzlin se klinické stadium zvyšuje, náš výzkum jsme zaměřili na zjištění nejpřesnější metody detekce nádorové diseminace v lymfatických uzlinách za účelem stanovení precizního pTNM po provedení systematické mediastinální disekce.

V našem souboru 100 nemocných bylo vyšetřeno celkem 1429 uzlin, což je v průměru 14,3 uzlin na jednoho pacienta. Ve srovnání s dostupnými studii obdobného výsledku bylo dosaženo pouze ve dvou případech u vyšetření pacientů s kolorektálním karcinomem [72, 84]. Mimo tyto dvě uvedené studie (Cronerova a Gullerova) byly získávány v průměru 2,5 - 10 lymfatických uzlin na jednoho pacienta [70, 85]. Ve studiích s pacienty s primárním plicním karcinomem byly odebírány 2 - 3,7 uzliny na jednoho pacienta (Hayama, Inoue, Nakagawa) [60, 61, 83]. Tento malý počet uzlin je v důsledku diagnostiky lymfatických uzlin peroperačně. V naší studii jsme prokázali metastatické postižení lymfatických uzlin u pacientů operovaných pro primární plicní karcinom ve 46 %, u nemocných operovaných pro metastázu kolorektálního karcinomu v 20 %. Prokázaná citlivost metody OSNA oproti standardní metodě H-E byla v naší studii u nemocných s primárním plicním karcinomem 80 %, specifita 93 %, pozitivní prediktivní hodnota 54 % a negativní prediktivní hodnota 98 %. U pacientů s metastatickým postižením plic byla senzitivita 50 %, specifita 97 %, pozitivní prediktivní hodnota 25 % a negativní prediktivní hodnota 99 %. Citlivost OSNA metody versus IHC CK 19 byla 80 %, u plicních metastáz 50 %. Shoda všech tří metod (H-E, IHC CK19 a OSNA) byla v 78 %, u nemocných s primárním plicním karcinomem v 76,3 %, u nemocných operovaných pro metastázu kolorektálního karcinomu v 85 %. Ve srovnání H-E a OSNA byla shoda v 80 %. Tyto hodnoty jsou ve srovnání z dostupnými studii nižší. Zde je udávané rozmezí mezi 87,9



- 98,8 %. Při vyšetření imunohistochemickou metodou byla pozitivita lymfatických uzlin prokázána s téměř identickými výsledky jako při histologickém vyšetření. Ačkoliv proběhlé studie naopak poukazují na zvýšení přesnosti diagnostiky metastatického postižení v lymfatických uzlinách metodou imunohistochemie (Vogelaar a kol. udávají zvýšení až o 36 %, Vollmer s kolegy udávají 2x vyšší detekci IHC CK 19 metodou oproti H-E), nám se dané tvrzení nepotvrdilo [58, 69]. Přesnější detekci metastatického postižení v lymfatických uzlinách v naší studii prokázalo vyšetření metodou OSNA oproti standardnímu histologickému vyšetření ve shodě s prezentovanými studiemi Chena a Gullera [67, 85].

Míra up-stagingu v našem souboru je v případě použití OSNA metody 16 %, v případě použití metod IHC CK19 a OSNA 17 %. Ve studiích hodnotících míru up-stagingu u OSNA metody se tyto hodnoty pohybují mezi 2-25 % [86]. Hodnota dosažená v našem souboru nemocných je tedy v rozmezí hodnot udávaných ostatními studiemi. I v našem souboru nemocných byla ve 3 % OSNA metoda negativní při pozitivitě ostatních metod vyšetření. To si vysvětlujeme tím, že nemůže být vzhledem k technice provedení jednotlivých metod vyšetřena celá uzlina současně všemi způsoby. Protože histologická metoda vyšetřuje pouze linii řezu na rozdíl od metody OSNA, kdy je homogenizován a vyšetřen celý vzorek, snažili jsme se minimalizovat riziko minutí mikrometastázy mimo linii řezu nakrájením vyšetřovaných dvou čtvrtin uzliny na tenké plátky. Tímto jsme se v naší studii lišili od Nakagawovy studie, kde byly zkoumány linie řezu pouze v místě prvotního dělení na čtvrtiny [60].

Zaměřili jsme se také na otázku, zda preciznější diagnostika metastatického postižení v lymfatických uzlinách a up-staging nemocných má klinický dopad pro pacienta. Z dostupné literatury je zřejmé, že diseminace maligních buněk poukazuje na vyšší maligní potenciál onemocnění. To vede ke kratší době přežití nemocných a zkrácení DFS intervalu [87–90]. Jak dokazují i výsledky naší studie, pacienti zařazení do vyšších stádií nemoci měli kratší dobu přežití než pacienti v časných stádiích. V našem souboru nemocných bylo mikrometastatické postižení lymfatických uzlin pacientů zařazených do klinického stadia I prokázáno ve 14 % při negativitě zbylých metod (H-E a IHC). Mnoho autorů v dostupné literatuře uvádí výskyt metastatického postižení charakteru okulních metastáz mezi 4 % a 27,8 %. Ve většině studií však autoři nerozlišují v jakém klinickém stadiu nemoci bylo mikrometastatické postižení bylo prokázáno, a také není srovnání např. s histologickým typem nádoru, či jaká skupina uzlin byla mikrometastatickým procesem postižena. Prognostická hodnota mikrometastáz v LU ve stadiu I u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic byla zkoumána pouze v ojedinělých studiích. Gu a spol. zkoumali vliv přítomnosti mikrometastáz v LU u pacientů operovaných pro

adenokarcinom v I klinickém stadiu. Jejich studie prokázala nižší dlouhodobé přežití u pacientů s postiženými lymfatickými uzlinami mikrometastatickým procesem [91]. Osaki a kol. též ve své studii prokazují negativní vliv mikrometastáz v I stádiu na dlouhodobé přežití [92]. Souhlasně i Jeong s kolegy při svém výzkumu prokázali, že přítomnost mikrometastáz významně koreluje s vyšší mírou recidivy a horší mírou přežití v NSCLC v rané fázi onemocnění [93]. Vzhledem k tomu byla statisticky zhodnocena a srovnána doba přežití u pacientů, kteří měli lymfatické uzliny při vyšetření všemi metodami negativní a pacientů, kteří měli OSNA metodou prokázané metastatické postižení uzlin.

Průkaz mikrometastáz v naše souboru neměl statisticky významný vliv na dobu přežití. Tento závěr si vysvětlujeme tím, že náš výzkum byl ukončen nedávno a dosud odoperovaní nemocní nedosáhli pětiletého intervalu od operace. Recentní studie hodnotí vždy pětiletý interval přežití, při kterém již byl statisticky významný rozdíl zaznamenán. Dostupné prameny udávají, že u pacientů při R0 resekci dochází ke vzniku relapsu onemocnění první rok po operaci až ve 30 %. Relaps onemocnění je ve vyšší míře prokázán u nemocných s prokázaným mikrometastatickým postižením lymfatických uzlin. Vyšší incidenci např. ve své studii zaznamenal Gu a kol, kde u pacientů s prokázaným mikrometastatickým postižením lymfatických uzlin zaznamenali relaps v 45 % oproti skupině nemocných bez postižených uzlin (relaps v 7 %) [91]. V našem souboru operovaných pacientů jsme zaznamenali relaps onemocnění u 28,6 % nemocných operovaných v časném stádiu pro primární plicní karcinom, což je téměř v souladu s procentuálním množstvím udávaným v dostupných studiích. U pacientů, kterým OSNA metodou bylo prokázáno metastatické postižení lymfatických uzlin při negativním nálezu při H-E a IHC CK 19, byla zjištěna recidiva onemocnění v 38 %. U pacientů operovaných pro metastázu kolorektálního karcinomu jsme zaznamenali recidivu onemocnění ve 40 %. Doba do vzniku relapsu onemocnění u nemocných operovaných pro primární plicní karcinom s prokázaným metastatickým procesem OSNA metodou byla paradoxně mírně delší, než u pacientů bez postižení LU mikrometastázami. Z tohoto výsledku však nelze provádět rozhodující závěr, protože je hodnocen velmi malý počet nemocných, různé skupiny uzlin (N1 nebo N2) a současně je výrazná heterogenita souboru stran histologického typu nádoru. Zde se i nabízí otázka, jaký je kritický mezní bod (cut off) počtu kopií CK19, který je patologicky významný. V této práci jsme použili parametry pro rakovinu prsu, kdy mezní hodnota je 250 kopií CK19/  $\mu$ l. Tato mezní hodnota testu OSNA je též používaná v četných studiích karcinomu žaludku, u kolorektálního karcinomu apod. [58, 79, 82]. Uplatnění této hodnoty vychází z poznatku, že úroveň exprese mRNA CK19 je u různých typů malignit podobná.

Cílem naší studie bylo ověření možnosti senzitivnější detekce výskytu mikrometastáz v regionálních lymfatických uzlinách u pacientů s primárním plicním karcinomem nebo plicními metastázami kolorektálního karcinomu. Při srovnání dostupných metod se OSNA metoda vyšetření LU jeví jako velmi slibná. Nicméně při hodnocení přítomnosti mikrometastáz v lymfatických uzlinách k follow-up nemocných vyvstává mnoho otázek. Proto je nutné provedení řady dalších studií s větším souborem nemocných a menší heterogenitou vyšetřovaného souboru.

## 6 Závěr

Studie probíhající na Chirurgické klinice od února 2013 do listopadu 2017 odpověděla na všechny otázky, které jsme si stanovili. Z dosažených výsledků vyplývá, že ve srovnání se standardně doporučovanou histologickou metodou vyšetřování uzlin se imunohistochemická metoda jeví jako nepřínosná, poněvadž výsledky získané tímto vyšetřením byly srovnatelné s výsledky histologických metod. Nejpreciznější diagnostickou metodou vyšetření lymfatických uzlin na přítomnost metastatického postižení epitelálních plicních nádorů nebo plicních metastáz epitelálních nádorů (v naší studii plicní metastázy kolorektálního karcinomu) se jeví metoda OSNA. Pokud by byla zavedena do rutinní praxe, došlo by k up-stagingu nemocných, u kterých klinické stádium nemoci bylo při vyšetření standardní histologickou metodou podhodnoceno. Celková doba přežití a doba vzniku relapsu onemocnění se však na rozdíl od našeho očekávání statisticky významně nezměnily. To si vysvětlujeme tím, že v naší studii byl zkoumán malý soubor nemocných s histologicky různorodou skupinou primárních plicních nádorů a doba sledování nemocných byla velmi krátká. Při hodnocení vlivu prokázaných mikrometastáz k follow-up nemocných vyvstává mnoho dosud nezodpovězených otázek. Proto je dle našeho názoru důležité provedení dalších studií.

## 7 Seznam obrázků

Obrázek 1 - Incidence karcinomu plic v evropských zemích .....	13
Obrázek 2 - Index růstu incidence v České republice .....	13
Obrázek 3 – Incidence ZN plic v ČR u mužů a žen .....	14
Obrázek 4 - Incidence a mortalita ZN průdušnice, průdušek a plic v závislosti na čase v ČR	14
Obrázek 5 - Zastoupení klinických stádií v čase v době stanovení diagnózy .....	15
Obrázek 6 - MD-ATS mapa lymfatických uzlin .....	33
Obrázek 7 - LAMP produkt .....	38
Obrázek 8 - Přístroj RD 100i.....	39
Obrázek 9 - Přístroj RD 100i.....	40
Obrázek 10 - Diagnostická souprava LYNOAMP BC OSNA .....	40
Obrázek 11 - Šest druhů prumerů .....	40
Obrázek 12 - První možnost krájení lymfatických uzlin.....	45
Obrázek 13 - Druhá možnost krájení lymfatických uzlin .....	46
Obrázek 14 - Třetí možnost krájení lymfatických uzlin .....	46
Obrázek 15 - Způsob krájení uzlin v naší studii.....	47
Obrázek 16 - Počet odebraných uzlin při mediastinální nodální disekci .....	51
Obrázek 17 - Shoda vyšetřovacích metod u všech operovaných pacientů.....	52
Obrázek 18 - Shoda vyšetřovacích metod u pacientů s NSCLC.....	53
Obrázek 19 - Shoda vyšetřovacích metod u pacientů s plicními metastázami kolorektálního karcinomu.....	54
Obrázek 20 - Rozdíly v přežití pacientů s primárním plicním karcinomem z hlediska klinických stádií .....	61
Obrázek 21 - Srovnání délky přežití pacientů OSNA + a OSNA-.....	63
Obrázek 22 - Vznik recidivy onemocnění v závislosti na době operace u jednotlivých klinických stádií .....	64
Obrázek 23 - Srovnání vzniku recidivy u OSNA+ a OSNA- .....	66
Obrázek 24 - Procento recidiv u pacientů s primárním plicním karcinomem - pN dle OSNA negativní.....	67
Obrázek 25 - Procento recidiv u pacientů s primárním plicním karcinomem - pN dle OSNA pozitivní.....	67
Obrázek 26 - Srovnání vzniku recidivy u OSNA+ a OSNA- .....	69

## 8 Seznam tabulek

Tabulka 1 - Přehled nejčastějších nádorů metastazujících do plic.....	16
Tabulka 2 - Přehled výskytu plicních metastáz u vybraných typů nádorů.....	16
Tabulka 3 - Délka přežití v závislosti na typu primárního nádoru.....	17
Tabulka 4 - Délka přežití v závislosti na počtu metastáz.....	18
Tabulka 5 - Délka přežití v závislosti na DFI.....	18
Tabulka 6 - Délka přežití v závislosti na postižení LU meta procesem.....	19
Tabulka 7 - Prognostické skupiny.....	19
Tabulka 8 - Základní histologické typy a podtypy primárního plicního karcinomu.....	21
Tabulka 9 - T-charakteristika nádoru.....	23
Tabulka 10 - Charakteristika postižení LU.....	24
Tabulka 11 - Charakteristika přítomnosti vzdálených metastáz.....	24
Tabulka 12 - Klinická stádia dle pTNM.....	25
Tabulka 13 - Doporučené skupiny uzlin odebrané v závislosti na lobární lokalizaci nádoru..	35
Tabulka 14 - Hodnocení metastáz podle velikosti.....	48
Tabulka 15 - Hodnocení metastáz dle kritérií stanovených Tsujimotem.....	48
Tabulka 16 - Zastoupení nemocných podle morfologie nádoru.....	49
Tabulka 17 - Počet pacientů podle pT nálezu.....	50
Tabulka 18 - Počet operací podle typu resekce.....	50
Tabulka 19 - Srovnání metod H-E, IHC CK 19 a OSNA podle postižení LU.....	54
Tabulka 20 - Velikost prokázaných metastáz OSNA metodou.....	55
Tabulka 21 - Senzitivita, specifita a prediktivní hodnoty metody OSNA versus H-E.....	56
Tabulka 22 - Senzitivita, specifita a prediktivní hodnoty metody OSNA versus IHC-CK 19 .....	57
Tabulka 23 - Změny pTNM stagingu v závislosti na výsledcích vyšetření (H-E, IHC CK19 a OSNA.....	58
Tabulka 24 - Rozdělení pacientů do klinických stádií dle výsledků H-E.....	59
Tabulka 25 - Rozdělení pacientů do klinických stádií dle výsledků OSNA.....	60
Tabulka 26 - Procento přeživších nemocných v závislosti na době od operace - klinické stádium I.....	61
Tabulka 27 - Procento přeživších nemocných v závislosti na době od operace - klinické stádium II.....	62

Tabulka 28 - Procento přeživších nemocných v závislosti na době od operace - klinické stádium III .....	62
Tabulka 29 - Srovnání přežití pacientů OSNA + a OSNA- .....	63
Tabulka 30 - Procento nemocných bez známek recidivy onemocnění v závislosti na době od operace - klinické stádium I .....	64
Tabulka 31 - Procento nemocných bez známek recidivy onemocnění v závislosti na době od operace - klinické stádium II .....	65
Tabulka 32 - Procento nemocných bez známek recidivy onemocnění v závislosti na době od operace - klinické stádium III.....	65
Tabulka 33 - Srovnání pacientů OSNA+ a OSNA- z hlediska vzniku recidivy v závislosti na době od operace.....	66
Tabulka 34 - Procento přeživších nemocných v závislosti na době od operace .....	68
Tabulka 35 - Procento nemocných bez známek recidivy onemocnění v závislosti na době od operace .....	68
Tabulka 36 - Srovnání pacientů OSNA+ a OSNA- z hlediska vzniku recidivy v závislosti na době od operace.....	69

## 9 Literatura

1. BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2018, 68(6), 394–424. ISSN 00079235. Doi:10.3322/caac.21492
2. NOONE, A.M. et al. SEER Cancer Statistics Review (CSR) 1975-2015. *SEER Cancer Statistics Review (CSR) 1975-2015*. 2004. Dostupné z: [https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975\\_2015/](https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2015/)
3. LU, T. et al. Trends in the incidence, treatment, and survival of patients with lung cancer in the last four decades. *Cancer Management and Research*. 2019, 11, 943–953. ISSN 1179-1322. Doi:10.2147/CMAR.S187317
4. DUŠEK, L. et al. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice [online]. Masarykova univerzita, 2005, [cit. 2020-4-04]. ISSN 1802 – 8861. Dostupné z: <http://www.svod.cz>. Verze 7.0
5. Národní onkologický registr - ÚZIS ČR [online]. [cit. 2020-04-02]. Dostupné z: <https://www.uzis.cz/index.php?pg=registry-sber-dat--narodni-zdravotni-registry--narodni-onkologicky-registr>
6. KOLEK, V. Doporučené postupy v pneumologii. 2016. ISBN 978-80-7345-507-1.
7. SKŘIČKOVÁ, J. a V. KOLEK. Základy moderní pneumoonkologie. 2017. ISBN 978-80-7345-551-4.
8. KUZDZAL, J. et al. *ESTS Textbook of thoracic surgery*. 2014. ISBN 978-83-7430-409-2.
9. RENA, O. et al. Pulmonary metastases from epithelial tumours: late results of surgical treatment☆. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2006, 30(2), 217–222. ISSN 10107940. Doi: 10.1016/j.ejcts.2006.04.032
10. IIZASA, T. et al. Prediction of Prognosis and Surgical Indications for Pulmonary Metastectomy From Colorectal Cancer. *The Annals of Thoracic Surgery*. 2006, 82(1), 254–260. ISSN 00034975. Doi: 10.1016/j.athoracsur.2006.02.027



11. SZKORUPA, M. et al. Surgery of the Pulmonary Metastases. *Klinická onkologie*. 2013, 26(1), 35–41. ISSN 0862495X, 18025307. Doi: 10.14735/amko201335
12. MARGALIT, O. et al. Lung Metastasis Predicts Better Prognosis in Metastatic Colorectal Cancer With Mutated KRAS. *Clinical Colorectal Cancer*. 2019, 18(3), e300–e307. ISSN 15330028. Doi: 10.1016/j.clcc.2019.06.001
13. TŘEŠKA, V. et al. Liver and pulmonary metastases of the colorectal carcinoma - the experience of the Department of Surgery, University Hospital in Pilsen. *Rozhledy v chirurgii: Mesicnik Ceskoslovenske Chirurgicke Spolecnosti*. 2013, 92(9), 488–493. ISSN 0035-9351.
14. ČAPOV, I. a UNIVERZITA KARLOVA. *Chirurgie orgánových metastáz*. Praha: Galén : Karolinum, 2008. ISBN 978-80-7262-493-5.
15. RENA, O. Pulmonary resection for metastases from colorectal cancer: factors influencing prognosis. Twenty-year experience. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*. 2002, 21(5), 906–912. ISSN 10107940. Doi: 10.1016/S1010-7940(02)00088-X
16. VODIČKA, J. et al. Surgical therapy of pulmonary metastases - 10-year results. *Bratislavské Lekárske Listy*. 2013, 114(4), 218–224. ISSN 0006-9248. Doi: 10.4149/bll\_2013\_045
17. VODIČKA, J. et al. Surgical treatment of colorectal cancer pulmonary metastases: 12-year results. *Anticancer Research*. 2014, 34(8), 4239–4245. ISSN 1791-7530.
18. PASTORINO, U. et al. Long-term results of lung metastasectomy: Prognostic analyses based on 5206 cases. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 1997, 113(1), 37–49. ISSN 00225223. Doi: 10.1016/S0022-5223(97)70397-0
19. VODIČKA, J. et al. Pulmonary metastases of the clear cell (conventional) renal cell carcinoma--options and results of surgical treatment. *Klinická Onkologie: Casopis Ceske a Slovenske Onkologicke Spolecnosti*. 2011, 24(4), 293–297. ISSN 0862-495X.

20. DOLEŽEL, J. et al. Systematic mediastinal lymphadenectomy in surgery for sarcomatous pulmonary metastases. *Acta Chirurgiae Orthopaedicae Et Traumatologiae Cechoslovaca*. 2013, 80(1), 77–81. ISSN 0001-5415.
21. GOLDSTRAW, P. et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*. 2016, 11(1), 39–51. ISSN 15560864. Doi: 10.1016/j.jtho.2015.09.009
22. BRIERLEY, J. et al. TNM: klasifikace zhoubných novotvarů. 2018. ISBN 978-80-7472-173-1.
23. BRIERLEY, J. a NATIONAL CANCER INSTITUTE OF CANADA COMMITTEE ON CANCER STAGING. The evolving TNM cancer staging system: an essential component of cancer care. *CMAJ: Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*. 2006, 174(2), 155–156. ISSN 1488-2329. Doi: 10.1503/cmaj.045113
24. STAHEL, R. et al. 1st ESMO Consensus Conference in lung cancer; Lugano 2010: Small-cell lung cancer. *Annals of Oncology*. 2011, 22(9), 1973–1980. ISSN 09237534. Doi: 10.1093/annonc/mdr313
25. RIQUET, M. et al. Prognostic significance of surgical-pathologic N1 disease in non-small cell carcinoma of the lung. *The Annals of Thoracic Surgery*. 1999, 67(6), 1572–1576. ISSN 0003-4975.
26. MARTINI, N. et al. Incidence of local recurrence and second primary tumors in resected stage I lung cancer. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 1995, 109(1), 120–129. ISSN 0022-5223. Doi: 10.1016/S0022-5223(95)70427-2
27. FAHIM, Ch. a W. C. HANNA. Surveillance after surgical resection of stage I non-small cell lung cancer. *AME Medical Journal*. 2017, 2, 128–128. ISSN 25200518. Doi: 10.21037/amj.2017.08.23
28. PLANCHARD, D. et al. Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*. 2018, 29, iv192–iv237. ISSN 09237534. Doi: 10.1093/annonc/mdy275

29. VANSTEENKISTE, J. et al. Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*. 2013, 24 (6), vi89-98. ISSN 1569-8041. Doi: 10.1093/annonc/mdt241
30. MONTEIRO, A. et al. Surgical resection of lung metastases from epithelial tumors. *The Annals of Thoracic Surgery*. 2004, 77(2), 431–437. ISSN 00034975. Doi: 10.1016/j.athoracsur.2003.06.012
31. PRUD'HOMME, C. et al. Image-guided lung metastasis ablation: a literature review. *International Journal of Hyperthermia*. 2019, 36(2), 37–45. ISSN 0265-6736, 1464-5157. Doi:10.1080/02656736.2019.1647358
32. QI, H. a W. FAN. Value of ablation therapy in the treatment of lung metastases: Ablation treatment of lung metastases. *Thoracic Cancer* [online]. 2018, 9(2), 199–207. ISSN 17597706. Doi:10.1111/1759-7714.12567
33. FILOSSO, P. L. et al. Anatomical resections are superior to wedge resections for overall survival in patients with Stage 1 typical carcinoids. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery: Official Journal of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery*. 2019, 55(2), 273–279. ISSN 1873-734X. Doi: 10.1093/ejcts/ezy250
34. JENSIK, R. J. et al. Segmental resection for lung cancer. A fifteen-year experience. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 1973, 66(4), 563–572. ISSN 0022-5223.
35. HANNA, J. M., M. F. BERRY a T. A. D'AMICO. Contraindications of video-assisted thoracoscopic surgical lobectomy and determinants of conversion to open. *Journal of Thoracic Disease*. 2013, 5(3), S182-189. ISSN 2072-1439. Doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2013.07.08
36. ANILE, M. et al. Uniportal video assisted thoracoscopic lobectomy: going directly from open surgery to a single port approach. *Journal of Thoracic Disease*. 2014, 6(6), S641-643. ISSN 2072-1439. Doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2014.08.28

37. FANTA J., J. MARVAN, P. HORÁK. Surgical Use of NanoKnife (Irreversible Electroporation) in Patients with Unresectable Lung Tumors. *Annals of Case Reports*. 2018, 2018. ISSN 2574-7754.
38. FANTA, J. et al. The NanoKnife and two successful cases of intracavitary irreversible electroporation of main bronchus tumours. *Rozhledy V Chirurgii: Mesicnik Ceskoslovenske Chirurgicke Spolecnosti*. 2012, 91(11), 625–630. ISSN 0035-9351.
39. DENG, H.-Y. et al. Can lobe-specific lymph node dissection be an alternative to systematic lymph node dissection in treating early-stage non-small cell lung cancer: a comprehensive systematic review and meta-analysis? *Journal of Thoracic Disease*. 2018, 10(5), 2857–2865. ISSN 2072-1439. Doi: 10.21037/jtd.2018.04.137
40. KOULAXOUZIDIS, G. et al. Sampling versus systematic full lymphatic dissection in surgical treatment of non-small cell lung cancer. *Oncology Reviews*. 2013, 7(1), 2. ISSN 1970-5565, 1970-5557. Doi: 10.4081/oncol.2013.e2
41. BALKO, J., Z. TONAR a I. VARGA. *Memorix histologie*. 2017. ISBN 978-80-7553-249-7.
42. JIRKOVSKÁ, M. *Histologická technika: pro studenty lékařství a zdravotnické techniky*. Praha: Galén, 2006. ISBN 978-80-7262-263-4.
43. HERRMANN, H. et al. Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2007, 8(7), 562–573. ISSN 1471-0072, 1471-0080. Doi: 10.1038/nrm2197
44. FRANKE, W. et al. Intermediate-sized filaments of human endothelial cells. *The Journal of Cell Biology*. 1979, 81(3), 570–580. ISSN 0021-9525, 1540-8140. Doi: 10.1083/jcb.81.3.570
45. SCHWEIZER, J. et al. New consensus nomenclature for mammalian keratins. *Journal of Cell Biology*. 2006, 174(2), 169–174. ISSN 1540-8140, 0021-9525. Doi:10.1083/jcb.200603161

46. MASAI, K. et al. Cytokeratin 19 expression in primary thoracic tumors and lymph node metastases. *Lung Cancer*. 2014, 86(3), 318–323. ISSN 01695002. Doi: 10.1016/j.lungcan.2014.09.018
47. UPASANI, O. S, M. M VAIDYA a A. N BHISEY. Database on monoclonal antibodies to Cytokeratins. *Oral Oncology*. 2004, 40(3), 236–256. ISSN 13688375. Doi: 10.1016/j.oraloncology.2003.08.022
48. DABBS, D. J.. Diagnostic immunohistochemistry: theranostic and genomic applications. 3rd ed. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier, 2010. ISBN 978-1-4160-5766-6.
49. KATO, H. et al. Loop-mediated isothermal amplification method for the rapid detection of *Enterococcus faecalis* in infected root canals. *Oral Microbiology and Immunology*. 2007, 22(2), 131–135. ISSN 0902-0055, 1399-302X. Doi: 10.1111/j.1399-302X.2007.00328.x
50. KLEPPE, K. et al. Studies on polynucleotides. *Journal of Molecular Biology*. 1971, 56(2), 341–361. ISSN 00222836. Doi: 10.1016/0022-2836(71)90469-4
51. Eiken Chemical website [online]. [cit. 2020-4-04]. Dostupné z: [www.eiken.co.jp](http://www.eiken.co.jp)
52. NAGAMINE, K., T. HASE a T. NOTOMI. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Molecular and Cellular Probes* [online]. 2002, 16(3), 223–229. ISSN 08908508. Doi:10.1006/mcpr.2002.0415
53. PARIDA, M. et al. Real-Time Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification for Rapid Detection of West Nile Virus. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004, 42(1), 257–263. ISSN 0095-1137. Doi:10.1128/JCM.42.1.257-263.2004
54. NOTOMI, T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*. 2000, 28(12), 63e–663. ISSN 13624962. Doi: 10.1093/nar/28.12.e63

55. MORI, Y. et al. Detection of Loop-Mediated Isothermal Amplification Reaction by Turbidity Derived from Magnesium Pyrophosphate Formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2001, 289(1), 150–154. ISSN 0006291X. Doi: 10.1006/bbrc.2001.5921
56. Sysmex home page ( in English) [online]. [cit. 2020-4-04] Dostupné z: [www.sysmex.cz](http://www.sysmex.cz)
57. OGURA, T. et al. The New Intraoperative Diagnostic Method to Predict Non-Slms Status in Breast Cancer Patients. *Annals of Oncology*. 2014, 25, iv104. ISSN 09237534. Doi: 10.1093/annonc/mdu327.59
58. VOGELAAR, F. J. et al. The Diagnostic Value of One-Step Nucleic acid Amplification (OSNA) for Sentinel Lymph Nodes in Colon Cancer Patients. *Annals of Surgical Oncology*. 2014, 21(12), 3924–3930. ISSN 1068-9265, 1534-4681. Doi: 10.1245/s10434-014-3820-5
59. DEL CARMEN, S. et sl. Concordance study between one-step nucleic acid amplification and morphologic techniques to detect lymph node metastasis in papillary carcinoma of the thyroid. *Human Pathology*. 2016, 48, 132–141. ISSN 00468177. Doi:10.1016/j.humpath.2015.09.020
60. NAKAGAWA, K. et al. The novel one-step nucleic acid amplification (OSNA) assay for the diagnosis of lymph node metastasis in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC): Results of a multicenter prospective study. *Lung Cancer*. 2016, 97, 1–7. ISSN 01695002. Doi: 10.1016/j.lungcan.2016.03.015
61. INOUE, M. et al. An accurate and rapid detection of lymph node metastasis in non-small cell lung cancer patients based on one-step nucleic acid amplification assay. *Lung Cancer*. 2012, 78(3), 212–218. ISSN 01695002. Doi: 10.1016/j.lungcan.2012.08.018
62. TSUJIMOTO, M. et al. One-step nucleic acid amplification for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast cancer patients. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. 2007, 13(16), 4807–4816. ISSN 1078-0432. Doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2512
63. PASSLICK, B. Micrometastases in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Lung Cancer*. 2001, 34, 25–29. ISSN 01695002. Doi: 10.1016/S0169-5002(01)00375-0

64. MARTIN, L. W. et al. Detection of Occult Micrometastases in Patients With Clinical Stage I Non-Small-Cell Lung Cancer: A Prospective Analysis of Mature Results of CALGB 9761 (Alliance). *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2016, 34(13), 1484–1491. ISSN 1527-7755. Doi: 10.1200/JCO.2015.63.4543
65. VODIČKA, J. et al. A more sensitive detection of micrometastases of NSCLC in lymph nodes using the one-step nucleic acid amplification (OSNA) method. *Journal of Surgical Oncology*. 2018, 117(2), 163–170. ISSN 1096-9098. Doi: 10.1002/jso.24826
66. VODIČKA, J. et al. Can the One-Step Nucleic Acid Amplification method of lymph nodes examination make the staging of pulmonary tumours more precise? *Rozhledy V Chirurgii: Mesicnik Ceskoslovenske Chirurgicke Spolecnosti*. 2018, 97(8), 373–378. ISSN 0035-9351.
67. CHEN, Z.-L. et al. Frequency and Distribution of Occult Micrometastases in Lymph Nodes of Patients With Non-Small-Cell Lung Carcinoma. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. 1993, 85(6), 493–498. ISSN 0027-8874, 1460-2105. Doi: 10.1093/jnci/85.6.493
68. NICHOLSON, A.G. et al. Does the use of immunohistochemistry to identify micrometastases provide useful information in the staging of node-negative non-small cell lung carcinomas? *Lung Cancer*. 1997, 18(3), 231–240. ISSN 01695002. Doi: 10.1016/S0169-5002(97)00065-2
69. VOLLMER, R. T. et al. Immunohistochemical detection of occult lymph node metastases in non-small cell lung cancer: anatomical pathology results from Cancer and Leukemia Group B Trial 9761. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*. 2003, 9(15), 5630–5635. ISSN 1078-0432.
70. CRONER, R. S. et al. Molecular staging of lymph node-negative colon carcinomas by one-step nucleic acid amplification (OSNA) results in upstaging of a quarter of patients in a prospective, European, multicentre study. *British Journal of Cancer*. 2014, 110(10), 2544–2550. ISSN 0007-0920, 1532-1827. Doi: 10.1038/bjc.2014.170

71. VISSER, M. et al. Intra-operative rapid diagnostic method based on CK19 mRNA expression for the detection of lymph node metastases in breast cancer. *International Journal of Cancer*. 2008, 122(11), 2562–2567. ISSN 00207136, 10970215. Doi: 10.1002/ijc.23451
72. TAMAKI, Y.. One-step nucleic acid amplification (OSNA): where do we go with it? *International Journal of Clinical Oncology* [online]. 2017, 22(1), 3–10. ISSN 1341-9625, 1437-7772. Doi: 10.1007/s10147-016-1030-9
73. TAMAKI, Y.. One-step nucleic acid amplification assay (OSNA) for sentinel lymph node biopsy. *Breast Cancer*. 2015, 22(3), 230–234. ISSN 1340-6868, 1880-4233. Doi: 10.1007/s12282-012-0390-x
74. TAMAKI, Y. et al. Molecular Detection of Lymph Node Metastases in Breast Cancer Patients: Results of a Multicenter Trial Using the One-Step Nucleic Acid Amplification Assay. *Clinical Cancer Research*. 2009, 15(8), 2879–2884. ISSN 1078-0432, 1557-3265. Doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-1881
75. SCHEM, Ch. et al. One-step nucleic acid amplification—a molecular method for the detection of lymph node metastases in breast cancer patients; results of the German study group. *Virchows Archiv*. 2009, 454(2), 203–210. ISSN 0945-6317, 1432-2307. Doi: 10.1007/s00428-008-0703-9
76. FELDMAN, S. et al. A novel automated assay for the rapid identification of metastatic breast carcinoma in sentinel lymph nodes: Molecular Assay to Evaluate SLNs. *Cancer*. 2011, 117(12), 2599–2607. ISSN 0008543X. Doi: 10.1002/cncr.25822
77. BUGLIONI, S. et al. Quantitative Molecular Analysis of Sentinel Lymph Node May Be Predictive of Axillary Node Status in Breast Cancer Classified by Molecular Subtypes. *PLoS ONE*. 2013, 8(3), e58823. ISSN 1932-6203. Doi: 10.1371/journal.pone.0058823
78. WILD, J. B. et al. Is it time for one-step nucleic acid amplification (OSNA) in colorectal cancer? A systematic review and meta-analysis. *Techniques in Coloproctology*. 2017, 21(9), 693–699. ISSN 1128-045X. Doi: 10.1007/s10151-017-1690-0



79. KUMAGAI, K. et al. Multicenter study evaluating the clinical performance of the OSNA assay for the molecular detection of lymph node metastases in gastric cancer patients. *Gastric Cancer*. 2014, 17(2), 273–280. ISSN 1436-3291, 1436-3305. Doi: 10.1007/s10120-013-0271-9
80. YAGUCHI, Y. et al. One-Step Nucleic Acid Amplification (OSNA) for the Application of Sentinel Node Concept in Gastric Cancer. *Annals of Surgical Oncology*. 2011, 18(8), 2289–2296. ISSN 1068-9265, 1534-4681. Doi: 10.1245/s10434-011-1591-9
81. COLLING, R. et al. OSNA testing for lymph node staging in colorectal cancer. *Journal of Clinical Pathology*. 2017, 70(7), 638–639. ISSN 1472-4146. Doi: 10.1136/jclinpath-2016-204299
82. YAMAMOTO, H. et al. OSNA-Assisted Molecular Staging in Colorectal Cancer: A Prospective Multicenter Trial in Japan. *Annals of Surgical Oncology*. 2016, 23(2), 391–396. ISSN 1068-9265, 1534-4681. Doi: 10.1245/s10434-015-4880-x
83. HAYAMA, M. One-step Nucleic Acid Amplification for Detection of Lymph Node Metastasis in Lung Cancer. *Annals of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 2014, 20(3), 181–184. ISSN 1341-1098, 2186-1005. Doi: 10.5761/atcs.oa.12.02224
84. ZHOU, M. et al. The diagnostic value of one step nucleic acid amplification (OSNA) in differentiating lymph node metastasis of tumors: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Surgery (London, England)*. 2018, 56, 49–56. ISSN 1743-9159. Doi:10.1016/j.ijso.2018.05.010
85. GÜLLER, U. et al.. Molecular investigation of lymph nodes in colon cancer patients using one-step nucleic acid amplification (OSNA): A new road to better staging? *Cancer*. 2012, 118(24), 6039–6045. ISSN 0008543X. Doi: 10.1002/cncr.27667
86. VODIČKA, J. et al. A more sensitive detection of micrometastases of NSCLC in lymph nodes using the one-step nucleic acid amplification (OSNA) method. *Journal of Surgical Oncology*. 2018, 117(2), 163–170. ISSN 1096-9098. Doi: 10.1002/jso.24826
87. DEMIR, A. et al. Prognostic significance of surgical-pathologic N1 lymph node involvement in non-small cell lung cancer. *The Annals of Thoracic Surgery*. 2009, 87(4), 1014–1022. ISSN 1552-6259. Doi:10.1016/j.athoracsur.2008.12.053

88. DAI, Ch. et al. Relationship of Lymph Node Micrometastasis and Micropapillary Component and Their Joint Influence on Prognosis of Patients With Stage I Lung Adenocarcinoma: *The American Journal of Surgical Pathology*. 2017, 41(9), 1212–1220. ISSN 0147-5185. Doi: 10.1097/PAS.0000000000000901
89. DAI, Ch.-H., et al. Molecular diagnosis and prognostic significance of lymph node micrometastasis in patients with histologically node-negative non-small cell lung cancer. *Tumor Biology*. 2013, 34(2), 1245–1253. ISSN 1010-4283, 1423-0380. Doi:10.1007/s13277-013-0667-5
90. REN, Y. et al. Lymph Node Micrometastasis Prognosticates Survival for Patients with Stage 1 Bronchogenic Adenocarcinoma. *Annals of Surgical Oncology*. 2018, 25(13), 3812–3819. ISSN 1068-9265, 1534-4681. Doi: 10.1245/s10434-018-6743-8
91. GU, Ch.-D. et al. Detection of Micrometastatic Tumor Cells in pN0 Lymph Nodes of Patients With Completely Resected Nonsmall Cell Lung Cancer: Impact on Recurrence and Survival. *Annals of Surgery*. 2002, 235(1), 133–139. ISSN 0003-4932. Doi: 10.1097/00000658-200201000-00017
92. OSAKI, T. a K. YASUMOTO. Clinical significance of micrometastases in the lymph nodes of patients with resectable lung cancer. *Nihon Geka Gakkai Zasshi*. 2013, 114(1), 28–33. ISSN 0301-4894.
93. JEONG, J. H., N. Y. KIM a J.-S. PYO. Prognostic roles of lymph node micrometastasis in non-small cell lung cancer. *Pathology - Research and Practice*. 2018, 214(2), 240–244. ISSN 03440338. Doi:10.1016/j.prp.2017.11.005

## 10 Příloha

### Informovaný souhlas pacienta

S využitím odebraných biologických vzorků pro potřeby lékařské vědy a výzkumu

**Název projektu: Senzitivnější detekce mikrometastáz plicních nádorů v lymfatických uzlinách metodami RT-LAMP, imunohistochemií CK19.**

Vážená paní, vážený pane,

Byl/a jste požádán/a o účast ve studii, jejímž úkolem je identifikace případných mikrometastáz primárních (nemalobuněčných) a sekundárních epiteliálních (metastázy kolorektálního karcinomu a karcinomu prsu) plicních nádorů v hilových a mediastinálních lymfatických uzlinách. Detekce nádorových buněk v lymfatických uzlinách u nemocných s těmito nádory plic je v současné době limitována možnostmi standardních histopatologických metod. Cílem plánované studie je zjistit jednak možnosti imunohistochemického vyšetření protilátkou cytokeratinu 19 (CK19), jednak možnosti nové metody izotermické amplifikace CK19 (RT-LAMP – Reverse Transcription - Loop Mediated Isothermal Amplification) v lymfatických uzlinách těchto nádorů. Tento přístup se dosud rutinně nepoužívá a je zatím předmětem jen ojedinělých publikací. Navrhovaný projekt je součástí širšího výzkumu nádorové diseminace, který na Chirurgické klinice LF UK a FN v Plzni dlouhodobě probíhá. Ve studii bude porovnávána senzitivita detekce mikrometastáz (clusterů, izolovaných nádorových buněk) v hilových a mediastinálních lymfatických uzlinách výše uvedených typů nádorů plic pomocí standardního histologického vyšetření v barvení hematoxylin-eosin, dále imunohistochemického vyšetření protilátkou CK 19, metodou RT-LAMP CK19. Zároveň chceme výsledky detekce mikrometastáz vyhodnotit spolu s klinicko-patologickými charakteristikami pacientů. Výstupem studie byl měl být zpřesnění stagingu nádorového onemocnění u nemocných s primárními a sekundárními plicními nádory a spolehlivější identifikace pacientů, kterým má být podána správná a včasná adjuvantní léčba, což by v konečném důsledku mělo vést ke zlepšení prognózy, resp. přežití.

### **Vyšetření postupu, potencionální rizika:**

Účastí v tomto projektu dáváte souhlas k vyšetření vzorku lymfatických uzlin plicního hilu a mediastina pro výzkumné účely. Při radikální chirurgické léčbě nemalobuněčných primárních plicních karcinomů a metastáz epitelálních maligních nádorů budou podle standardního schématu odebrány hilové a mediastinální lymfatické uzliny. Tyto uzliny budou ihned po chirurgickém výkonu děleny na 4 stejné části, přičemž část první a třetí zleva bude určena k histologickému vyšetření, část druhá a čtvrtá k vyšetření metodou RT-LAMP CK19. Velmi malé uzliny budou v podélné ose pouze půleny. Jedna polovina analogicky případně histologickému vyšetření, druhá vyšetření metodou RT-LAMP CK19. Při histologickém vyšetření budou příslušné části uzlin nejprve vyšetřeny standardním postupem v barvení hematoxylin-eosin a následně pak i imunohistochemicky protilátkou CK19. U každého nemocného bude oběma metodami vyšetřováno 5 skupin lymfatických uzlin. Výsledky poskytnuté jednotlivými metodami budou standardně porovnány a statisticky zpracovány, odděleně budou hodnoceny primární a sekundární plicní nádory.

Vyšetřovány budou vzorky lymfatických uzlin, které Vám byly odebrány v rámci standardního léčebného postupu. Tento výzkum tedy znamená pouze další laboratorní zpracování již odebrané tkáně a v žádném případě proto není spojen s nutností nového operačního zákroku a dalšího odběru tkáně. Není tedy pro Vás spojen s žádnými dalšími zákroky ani s žádným dalším zdravotním rizikem.

### **Zpracování a analýza biologických vzorků:**

Laboratorní zpracování a analýza odebraných vzorků bude probíhat ve specializovaných laboratořích Šiklova ústavu patologie a Ústavu biologie Lékařské fakulty v Plzni, Univerzity Karlovy v Praze a Fakultní nemocnice Plzeň. Odebrané vzorky budou standardně archivovány.

### **Osobní informace, označení vzorků, upozornění:**

Informace týkající se Vaší účasti ve studii budou utajeny a použity pouze k vědeckým účelům dle právního řádu České republiky. Veškeré zpracovávané vzorky budou anonymizovány, označovány číselnými kódy, bez možnosti identifikace na základě údajů o linii či vzorku. Klinické údaje o průběhu Vašeho onemocnění a o terapii nutné pro hodnocení a interpretaci výsledků budou rovněž anonymizovány bez možnosti Vaší identifikace. Nebudete mít žádné náklady s účastí ve studii a také nedostanete žádné náhrady nebo odměnu za poskytnutí biologického materiálu. Výsledky našeho výzkumného projektu mohou být publikovány ve

vědeckých a lékařských časopisech nebo prezentovány na odborných akcích, rovněž bez možnosti Vaší identifikace.

V případě otázek nebo problémů spojených s tímto projektem prosím kontaktujte:

Doc. MUDr. Josef Vodička, PhD., Chirurgická klinika FN Plzeň, Alej Svobody 80, 304 60, Plzeň; tel. 377104513

### **PROHLÁŠENÍ VYŠETŘOVANÉ OSOBY:**

Jméno a příjmení pacienta .....r.č.....

Bydliště .....

Jméno a příjmení informujícího lékaře: .....

Já, níže podepsaný/á, souhlasím s využitím odebraného vzorku biologického materiálu pro potřeby lékařské vědy a výzkumu. Jsem si vědom/a, že udělení souhlasu je dobrovolné, neudělení souhlasu nebude mít žádný vliv na poskytování zdravotní péče, a že tento souhlas mohu kdykoliv písemně odvolat. Přečetl/a jsem si informaci o výzkumu, měl/a jsem možnost se zeptat informujícího lékaře na jakékoliv otázky, které s tímto projektem souvisejí, obdržel/a jsem uspokojivou odpověď a všemu jsem porozuměl/a. Souhlasím s využitím odebraných vzorků lymfatických uzlin pro výzkumné účely popsané výše. Souhlasím s tím, že anonymizované (tedy neidentifikovatelné) vzorky s odebraných lymfatických uzlin mohou být skladovány v závislosti na pokroku výzkumu v této oblasti i po ukončení tohoto projektu.

Potvrzuji, že jsem četl/a výše uvedené a obdržel/a jsem kopii tohoto informovaného souhlasu. Souhlasím se svou účastí v tomto projektu.

V Plzni dne:.....

Podpis pacienta:.....

Podpis informujícího lékaře:.....

## 11 Seznam vlastních publikací

### První autor:

1. VEJVODOVÁ, Š., a J. VODIČKA. Spontaneous pneumomediastinum (Hammans syndrome). *Rozhledy V Chirurgii: Mesicnik Ceskoslovenske Chirurgicke Spolecnosti*. 2014, 93(8), 436–438.
2. VEJVODOVÁ, Š. et al. Solitary Fibrous Tumor - Less Common Neoplasms of the Pleural Cavity. *Annals of Thoracic and Cardiovascular Surgery: Official Journal of the Association of Thoracic and Cardiovascular Surgeons of Asia*. 2017, 23(1), 12–18. IF 0,658

### Spoluautor:

1. DOLEŽAL, J. et al. Pleural empyema - single center experience. *Rozhledy V Chirurgii: Mesicnik Ceskoslovenske Chirurgicke Spolecnosti*. 2018, 97(8), 379–383.
2. VODIČKA, J. et al. A more sensitive detection of micrometastases of NSCLC in lymph nodes using the one-step nucleic acid amplification (OSNA) method. *Journal of Surgical Oncology*. 2018, 117(2), 163–170. IF 3,114
3. VODIČKA, J. et al. Can the One-Step Nucleic Acid Amplification method of lymph nodes examination make the staging of pulmonary tumours more precise? *Rozhledy V Chirurgii: Mesicnik Ceskoslovenske Chirurgicke Spolecnosti*. 2018, 97(8), 373–378.
4. VODIČKA, J. et al. Penetrating chest trauma - experience of the Pilsen University Hospital Trauma Centre. *Rozhledy V Chirurgii: Mesicnik Ceskoslovenske Chirurgicke Spolecnosti*. 2017, 96(11), 463–468.
5. VODIČKA, J. et al. Traumatic pneumothorax - diagnosis and treatment of 322 cases over a five-year period. *Rozhledy V Chirurgii: Mesicnik Ceskoslovenske Chirurgicke Spolecnosti*. 2017, 96(11), 457–462.
6. VODIČKA, J. et al. Do Weather Phenomena Have Any Influence on the Occurrence of Spontaneous Pneumothorax? *Arch Broncopneumol.*, 2016, 52(5), 239-243. IF 1,771
7. VODIČKA, J. et al. Chest Injury and its Surgical Treatment in Polytrauma Patients. Five-Year Experience. *Acta Chirurgiae Orthopaedicae Et Traumatologiae Cechoslovaca*. 2016, 83(2), 123–126. IF 0,552

8. VODIČKA, J. et al. Surgical treatment of colorectal cancer pulmonary metastases: 12-year results. *Anticancer Research*. 2014, 34(8), 4239–4245. IF 1,826