

**Univerzita Karlova
Lékařská fakulta v Plzni**



Autoreferát dizertační práce

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

**Detection of micrometastases in the hilar and mediastinal lymph nodes at
the primary and secondary lung tumors using OSNA and
immunohistochemistry methods.**

MUDr. Šárka Vejvodová

Plzeň 2020

Univerzita Karlova
Lékařská fakulta v Plzni



Autoreferát dizertační práce

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

**Detection of micrometastases in the hilar and mediastinal lymph nodes at
the primary and secondary lung tumors using OSNA and
immunohistochemistry methods.**

MUDr. Šárka Vejvodová

Plzeň 2020

Obsah

Abstrakt	1
Summary	2
1 Úvod	3
2 Hypotéza a cíle práce	3
3 Materiál a metodika.....	4
3.1 Soubor nemocných	4
3.2 Operační postup.....	4
3.3 Zpracování lymfatických uzlin.....	4
3.4 Histopatologické a imunohistochemické vyšetření	5
3.5 Metoda OSNA	5
3.6 Hodnocení výsledků	5
4 Výsledky.....	6
4.1 Soubor nemocných	6
4.2 Odběr lymfatických uzlin	7
4.3 Míra shody metod OSNA, IHC CK 19 a H-E	8
4.3.1 Míra shody metod OSNA, IHC CK19 a H-E u všech pacientů	8
4.3.2 Míra shody metod OSNA, IHC CK19 a H-E u pacientů operovaných pro NSCLC.....	8
4.3.3 Míra shody metod OSNA, IHC CK19 a H-E u pacientů operovaných pro plicní metastázy kolorektálního karcinomu	9
4.3.4 OSNA metoda versus IHC CK19 a H-E	10
4.4 Senzitivita, specifita a prediktivní hodnoty metody OSNA a IHC-CK 19.....	10
4.5 Změna klinického stadia na podkladě získaných výsledků	11
4.6 Délka přežití a recidiva onemocnění	12
4.6.1 Délka přežití u pacientů operovaných pro primární plicní karcinom.....	12
4.6.2 Recidiva onemocnění u pacientů operovaných pro primární plicní karcinom...	14

4.6.3	Délka přežití a recidiva onemocnění u pacientů operovaných pro metastázu kolorektálního karcinomu	16
5	Diskuze.....	18
6	Závěr.....	21
7	Použitá literatura	22
8	Přehled publikační činnosti autora	26

Abstrakt

Úvod: Doporučené postupy pro léčbu karcinomu plic, ale i plicních metastáz, se odvíjí od morfologické diagnózy nádoru a klinického stádia nemoci. Správné určení stádia nemoci umožní zvolit optimální léčebnou strategii, proto je důležité co nejpřesnější stanovení TNM klasifikace. 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 lymfadenektomii. Odebrané LU jsou podrobeny standardnímu histopatologickému vyšetření, které je schopné spolehlivě detektovat makrometastázy, avšak mikrometastázy nemusí být tímto postupem vždy odhaleny. Jelikož karcinomy jsou nádory epiteliálního původu, jejich základními proteiny intermediárního cytoskeletu jsou cytokeratiny (CK). Poněvadž nepostižené LU cytokeratiny neobsahují, jejich průkaz v odebraných LU je ukazatelem postižení uzlin metastatickým procesem. Cytokeratinů je celá škála, 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 LU 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 LU na přítomnost metastatického postižení epiteliálních plicních nádorů nebo plicních metastáz epiteliálních nádorů se jeví metoda OSNA. Zavedením této metody do rutinní praxe by došlo k up-stagingu nemocných. Celková doba přežití se na rozdíl od našeho očekávání statisticky významně nezměnila, avšak dle našeho názoru je důležité další pečlivé sledování nemocných.

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. 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 lymph nodes (LN) are subjected to standard histopathological evaluation, which is able to reliably identify macrometastases, although micrometastases may not always be detected. Since carcinomas are tumors of epithelial origin, their essential proteins of intermediate cytoskeleton are the cytokeratins (CK). Since unaffected lymph nodes don't contain CK, the verification of CK in removed LN 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 metastases 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 (Reverse 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 is the OSNA method. By introducing these methods into routine practice would lead to up-staging of disease in patients. The overall survival, contrary to our expectation, was not statistically changed, although according to our opinion, following closely monitoring of these patients is mandatory.

1 Úvod

Doporučený postup léčby nemocných s karcinomem plic je závislý nejen na morfoloickém typu nádoru, ale zejména na stanovení klinického stádia nemoci. Vyšetření regionálních mízních uzlin tedy sehrává významnou roli pro stanovení správného klinického stádia 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 [1].

V roce 2001 společností Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology byly vydány pokyny způsobu vyšetření odebraných lymfatických uzlin [2]. 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 stádia nemoci.

U epiteliálních 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 epiteliálních buněk. Protože lymfatická uzlina nepostižená nádorovým procesem neobsahuje epiteliální buňky, prokázání přítomnosti CK19 v LU je ukazatelem jejich metastatického postižení [3]. 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 dovolu je 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. [4–6]. 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 [7, 8].

2 Hypotéza a cíle práce

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 stádií nemoci. Adekvátní zařazení do klinických stádií 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.

Cílem této disertační práce je 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. Dále se práce zabývá zhodnocením vlivu přítomnosti mikrometastáz v lymfatických uzlinách na prognózu nemocných.

3 Materiál a metodika

3.1 Soubor nemocných

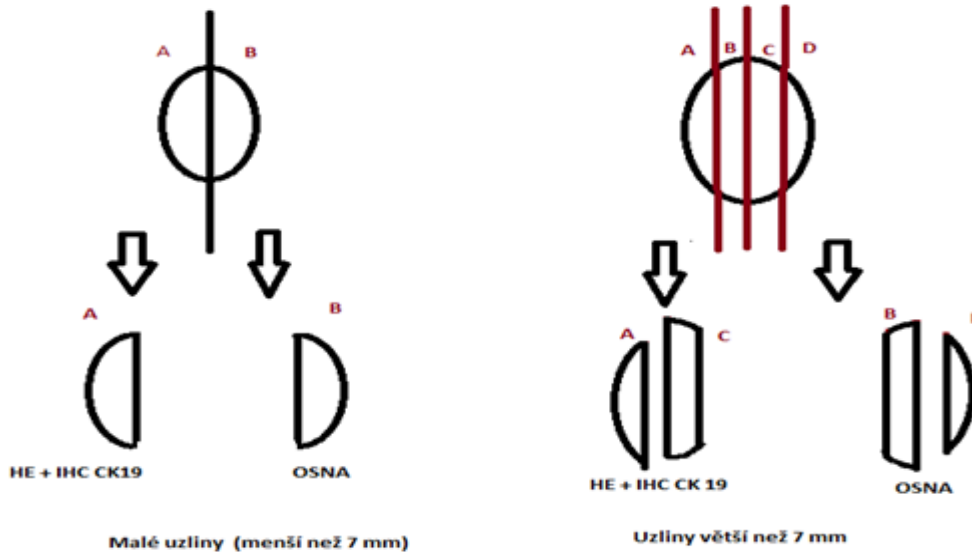
Do prospektivní studie byli zařazeni pacienti, kteří byli operováni na Chirurgické klinice FN Plzeň v období od února 2013 do listopadu 2017 pro primární nemalobuněčný plicní karcinom či plicní metastázy kolorektálního karcinomu. Celkem bylo do studie zařazeno 100 pacientů, kteří se zařazením do studie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

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 sorce 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)).

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. V naší studii byly uzliny krájeny v podélné ose na 4 části (viz obrázek 1). 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 1- Způsob krájení uzlin v naší studii. Zdroj: MUDr. Šárka Vejvodová, CH FN Plzeň

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.

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.

3.6 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 1). Výsledky získané OSNA metodou byly hodnoceny podle kritérií vytvořených Tsujimotem a jeho kolegy [9]. Podle počtu kopií mRNA CK 19 byla hodnocena přítomnost či nepřítomnost metastatického postižení včetně jeho rozsahu (viz tabulka 2). 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 pozitivivity a negativity HE, IHC a OSNA.

Specificita, senzitivita, pozitivní a negativní prediktivní hodnota zkoumaného parametru OSNA byla stanovena na základě dosažené pozitivity a negativity HE a IHC. Statistická významnost byla stanovena na hranici $\alpha = 5\%$.

Tabulka 1 - Hodnocení metastáz podle velikosti

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

Tabulka 2 - Hodnocení metastáz dle kritérií stanovených Tsujimotem [9]

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

4 Výsledky

4.1 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 3 - 5. Studie probíhala od února 2013 do listopadu 2017, proto byl pT status hodnocen dle 7. revize TNM klasifikace.

Tabulka 3 - Zastoupení nemocných podle morfologie nádoru

Typ nádorového onemocnění	Histologický typ	Počet nemocných	NSCLC (v %)	Z celkového souboru pacientů (v %)
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 4 - Počet operací podle typu resekce

Typ operace	počet	lokalizace	Počet
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

Tabulka 5 - Počet pacientů podle pT nálezů

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

4.2 Odběr lymfatických uzlin

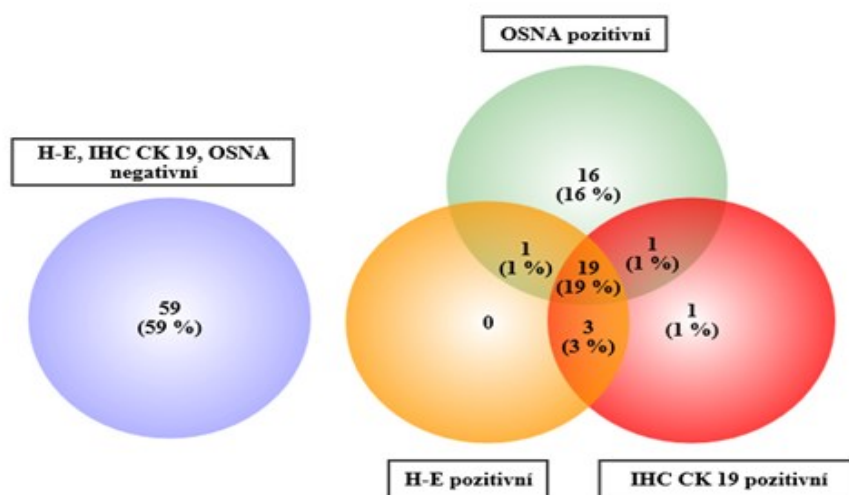
V našem souboru u 100 nemocných bylo celkem vyšetřeno 1429 uzlin. V průměru bylo odebráno 14,26 uzlin. Medián je 13,00. Nejméně bylo odebráno 5 uzlin, nejvíce 32 uzlin.

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

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

4.3.1 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 (viz obrázek 2).



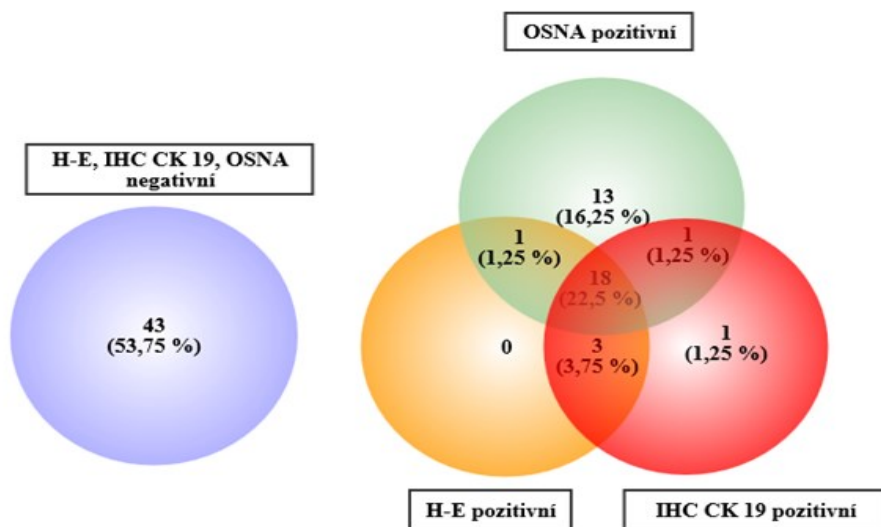
Obrázek 2- Shoda vyšetřovacích metod u všech operovaných pacientů

4.3.2 Míra shody metod OSNA, IHC CK19 a H-E u pacientů operovaných pro NSCLC

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

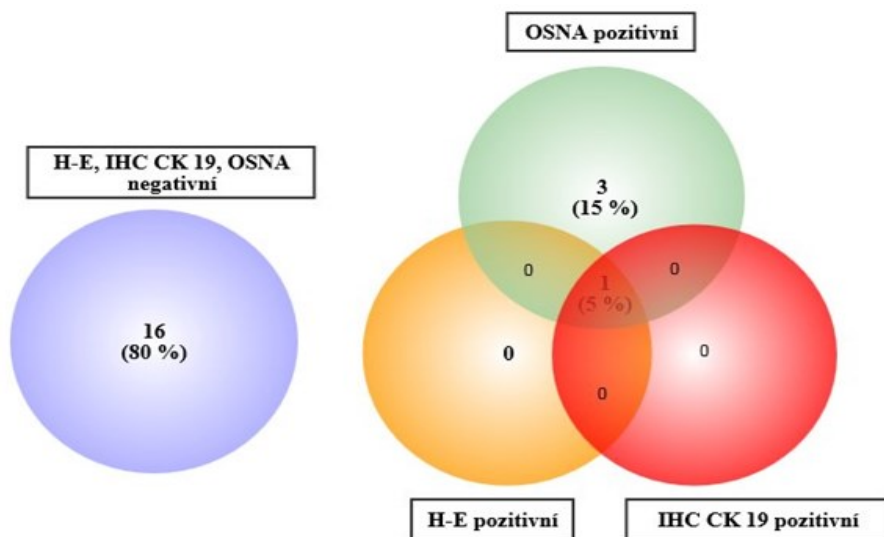
metod v souboru nemocných operovaných pro primární plicní karcinom znázorňuje Vennův graf na obrázku 3.



Obrázek 3- Shoda vyšetřovacích metod u pacientů s NSCLC

4.3.3 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 4).



Obrázek 4 - Shoda vyšetřovacích metod u pacientů s plicními metastázami kolorektálního karcinomu

4.3.4 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 6). 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.

Tabulka 6 - 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

4.4 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 pozitivity a negativity H-E a IHC. Hodnoty byly stanoveny pro celý soubor nemocných, poté zvlášť pro NSCLC a pro metastázy (viz tabulky 7 a 8)

Tabulka 7- Senzitivita, specifita a prediktivní hodnoty metody OSNA versus H-E

Soubor pacientů	Celý soubor pacientů	NSCLC	Metastázy KRCA
Senzitivita (v %)	78,05	79,49	50
Specifita (v %)	93,46	92,52	96,94
Pozitivní prediktivní hodnota (v %)	51,61	53,45	25
Negativní prediktivní hodnota (v %)	97,95	97,66	98,96

Tabulka 8 - Senzitivita, specifita a prediktivní hodnoty metody OSNA versus IHC-CK 19

Soubor pacientů	Celý soubor pacientů	NSCLC	Metastázy KRCA
Senzitivita (v %)	78,57	80	50
Specifita (v %)	93,67	92,78	96,94
Pozitivní prediktivní hodnota (v %)	53,23	55,17	25
Negativní prediktivní hodnota (v %)	97,95	97,66	98,96

4.5 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 9.

Tabulka 9 - 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 9

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

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

4.6 Délka přežití a recidiva onemocnění

4.6.1 Délka přežití u pacientů operovaných pro primární plicní karcinom

Z hlediska pTNM klasifikace byli pacienti rozděleni do příslušných klinických stádií. Počet nemocných v dané skupině dle použité metody při hodnocení stavu lymfatických uzlin zaznamenávají následující tabulky 10 - 11.

Tabulka 10 - Rozdělení pacientů do klinických stádií dle výsledků H-E

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

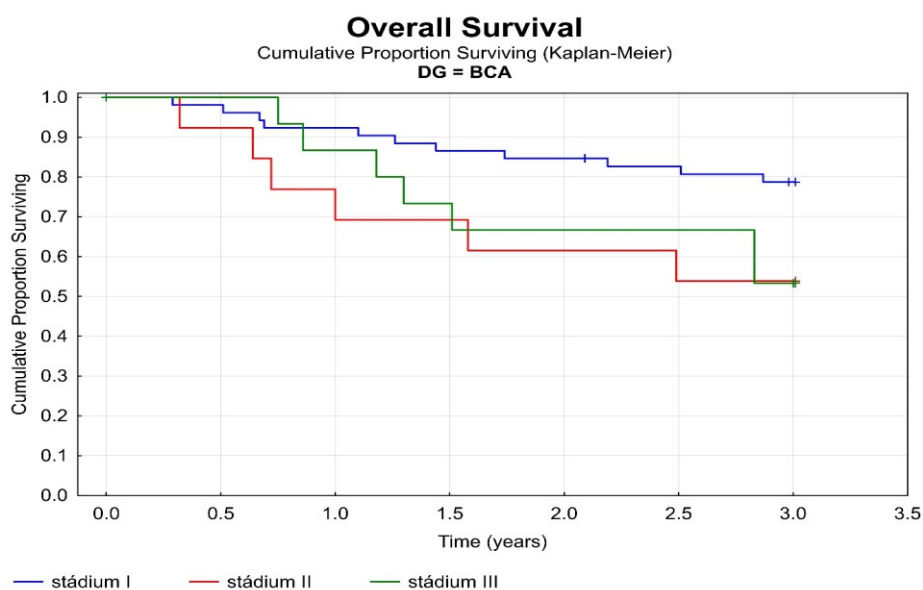
Tabulka 11 - Rozdělení pacientů do klinických stádií dle výsledků OSNA

Klinické stádium	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 5. Stav lymfatických uzlin, zda jsou či nejsou postiženy metastatickým procesem, byl hodnocen standardní metodou H-E.



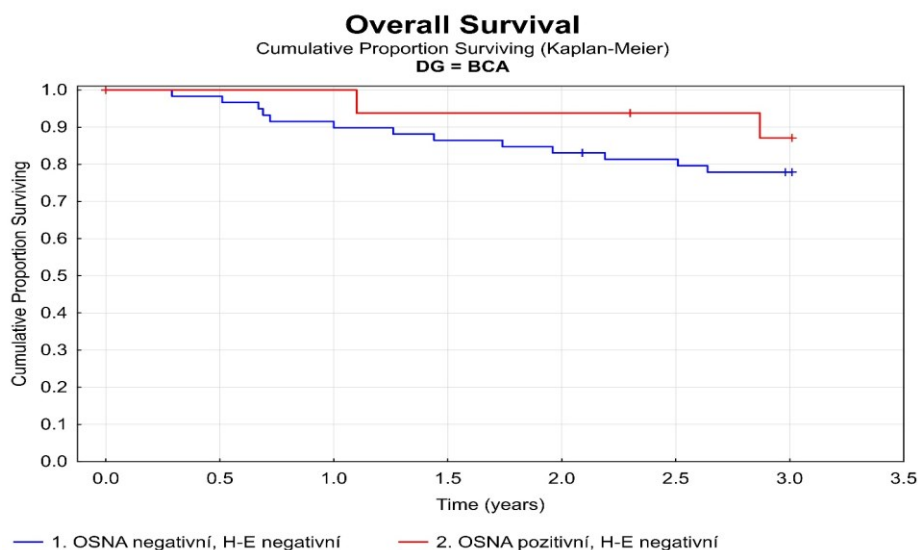
Obrázek 5 - Rozdíly v přežití pacientů s primárním plicním karcinomem z hlediska klinických stádií

Následující tabulka 12 přehledně dokumentuje procento přeživších nemocných v závislosti na době od operace z pohledu jednotlivých klinických stádií nemoci.

Tabulka 12 - Procento přeživších nemocných v závislosti na době od operace u jednotlivých klinických stádií

Doba od operace	Přežití (v %) I. stádium	Přežití (v %) II. stádium	Přežití (v %) III. stádium
1. rok	92	69	87
2. rok	85	62	67
3. rok	79	54	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 6 a tabulka 13.



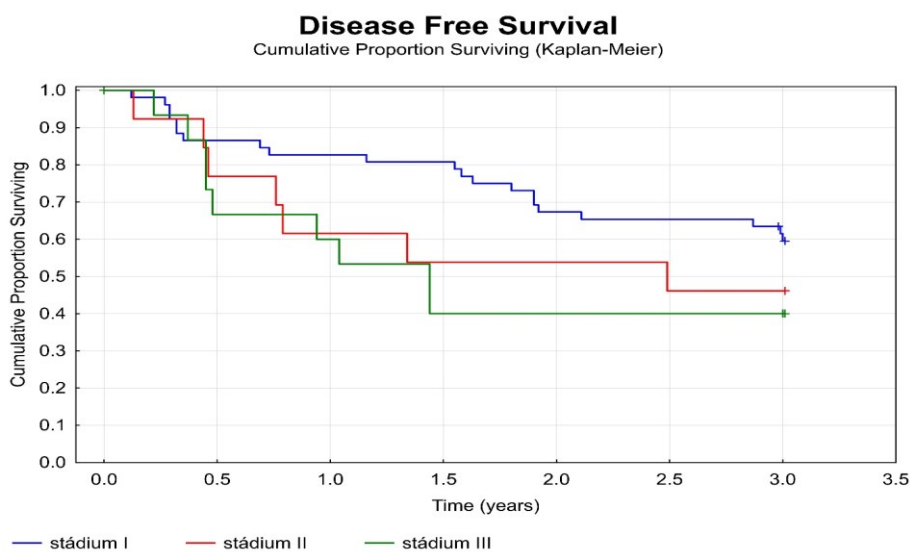
Obrázek 6 - Srovnání délky přežití pacientů OSNA + a OSNA-

Tabulka 13 - 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

4.6.2 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 7 dokumentuje vznik recidivy onemocnění v závislosti na době operace u jednotlivých klinických stádií.



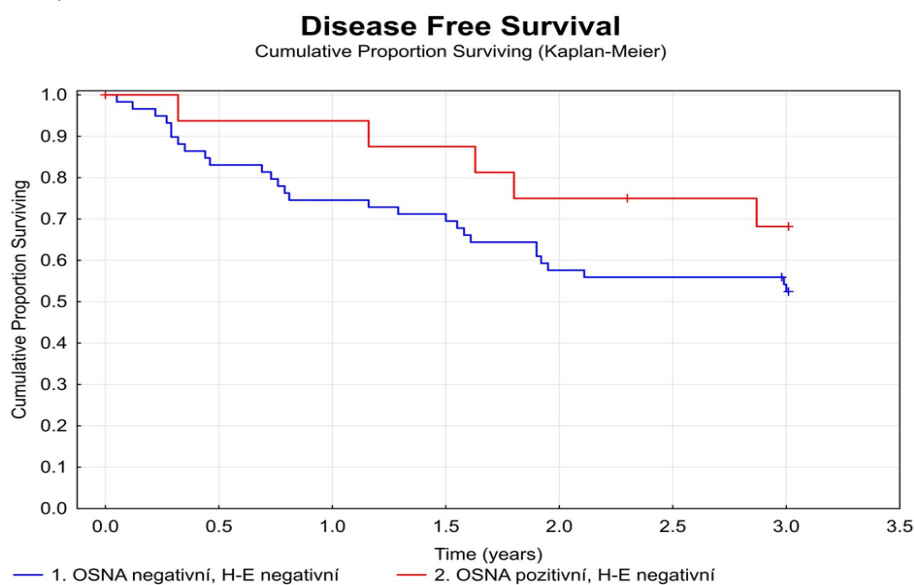
Obrázek 7 - Vznik recidivy onemocnění v závislosti na době operace u jednotlivých klinických stádií

Následující tabulka 14 dokumentuje procento nemocných bez známek recidivy v závislosti na době od operace z pohledu jednotlivých klinických stádií nemoci.

Tabulka 14 - Procento nemocných bez recidivy v závislosti na době od operace u jednotlivých klinických stádií

Doba od operace	Pacienti bez recidivy (v %) I. stádium	Pacienti bez recidivy (v %) II. stádium	Pacienti bez recidivy (v %) III. stádium
1. rok	83	62	60
2. rok	67	54	40
3. rok	60	46	40

Procento nemocných bez známek recidivy v závislosti na době od operace z pohledu postižení LU metastatickým procesem zaznamenává obrázek 8 a tabulka 15. Srovnání 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).

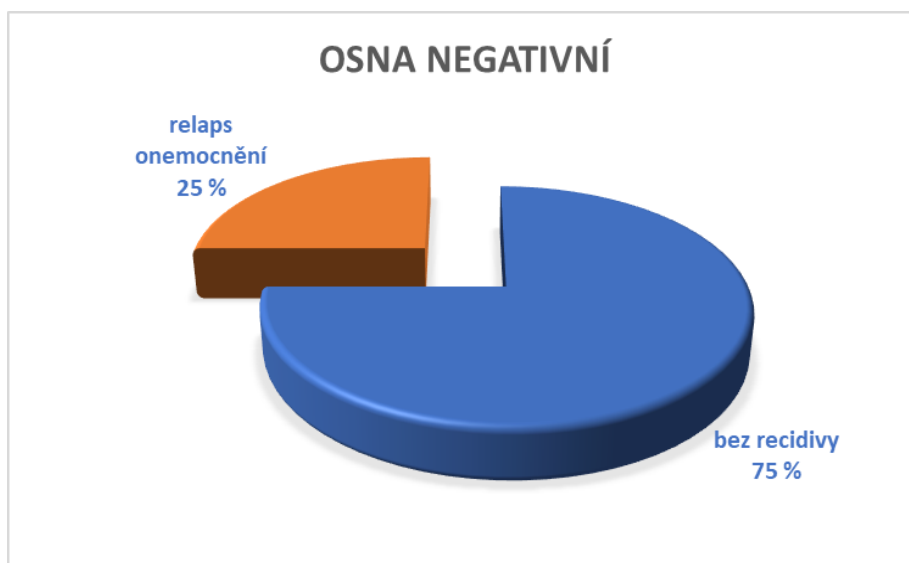


Obrázek 8 - Srovnání vzniku recidivy u OSNA+ a OSNA-

Tabulka 15 - 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 obrázcích 9 - 10.



Obrázek 9 - Procento recidiv u pacientů s primárním plicním karcinomem - pN dle OSNA negativní



Obrázek 10 - Procento recidiv u pacientů s primárním plicním karcinomem - pN dle OSNA pozitivní

4.6.3 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 16 zaznamenává procento přeživších nemocných v závislosti na době od operace.

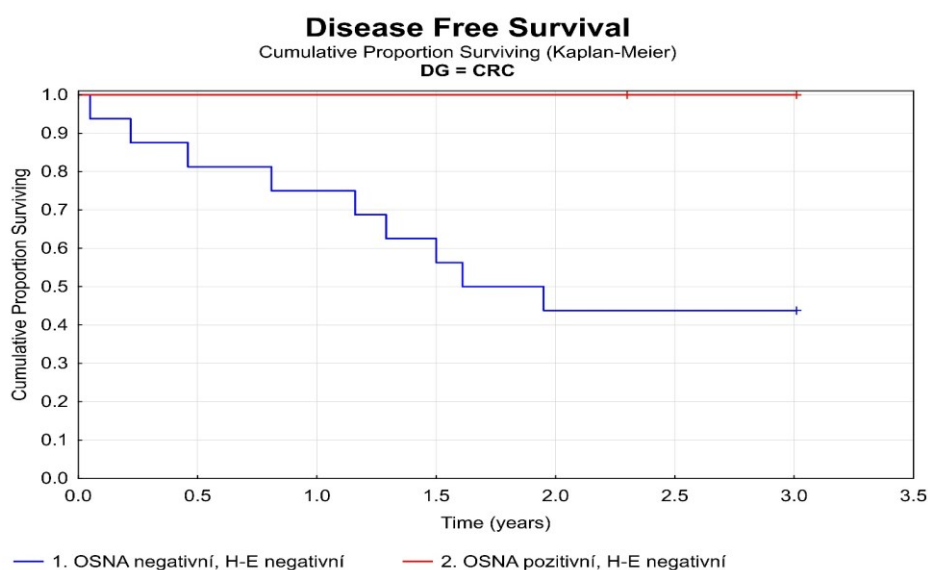
Tabulka 16 - Procento přeživších nemocných v závislosti na době od operace

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

Následující tabulka 17 dokumentuje procento nemocných bez známek recidivy v závislosti na době od operace. Graf (viz obr. č. 11) ukazuje rozdíl v DFI od doby operace u OSNA + a OSNA-. Tento rozdíl nebyl statisticky významný (p-value 0,12). Tabulka 18 zaznamenává procento nemocných bez známek recidivy v závislosti na době od operace z pohledu postižení LU metastatickým procesem.

Tabulka 17- 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



Obrázek 11 - Srovnání vzniku recidivy u OSNA+ a OSNA-

Tabulka 18 - 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 [10]. U pacientů v klinickém stádiu I je zaznamenán relaps onemocnění až ve 20 % do pěti let od operace [11]. 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 [12, 13]. 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 [10]. Podobné výsledky dokumentují ve své studii i Chen a kol., kteří prokazují mikrometastázu v 17 % u 588 vyšetřených lymfatických uzlin [14]. Nicholson a kol. prokazují hodnoty up-stagingu nižší ve srovnání s předchozími studiemi, pouze 6 %, což vysvětlují větším souborem vyšetřených plátků lymfatických uzlin (1447) [15]. 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 [11]. 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 [16].

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 % [17]. 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 [9].

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, Buglionioho studie atd.) [18–23]. 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 % [20]. 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 [6, 24–28]. 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 %, specificitu 96,5 %, míru shody v 95,7 %, negativní prediktivní hodnotu 100 % [28]. Del Carmen a kol. u nemocných s karcinomem štítné žlázy prokazují vyšetřením 273 uzlin senzitivitu OSNA metody 81,5 %, specificitu 92,1 %, míru shody v 87,9 %, negativní prediktivní hodnotu 88,3 % [6].

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 % [8]. 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 % [29]. 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 [3]. 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 % [7]. 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 [20, 30]. Mimo tyto dvě uvedené studie (Cronerova a Gullerova) byly získávány v průměru 2,5 - 10 lymfatických uzlin na jednoho pacienta [17, 31]. Ve studiích s pacienty s primárním plicním karcinomem byly odebírány 2 - 3,7 uzliny na jednoho pacienta (Hayama, Inoue, Nakagawa) [7, 8, 29]. 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 s 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 [5, 16]. 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 [14, 31].

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 % [32]. 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 pozitivě 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 [7].

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 [33–36]. 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 negativě zbylých metod (H-E a IHC). Mnoho autorů v dostupné literatuře uvádí výskyt metastatického postižení charakteru okultních 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 [37]. Osaki a kol. též ve své studii prokazují negativní vliv mikrometastáz v I stadiu na dlouhodobé přežití [38]. 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 [39]. 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 %) [37]. 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/ μ l. Tato mezní hodnota testu OSNA je též používaná v četných studiích karcinomu žaludku, u kolorektálního karcinomu apod. [5, 25, 28]. 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 doporučenou 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) se jeví metoda OSNA. Pokud by byla zavedena do rutinní praxe, došlo by k upstagingu 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 Použitá literatura

1. 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
2. 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
3. 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
4. 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
5. 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
6. DEL CARMEN, S. et al. 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
7. 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
8. 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
9. 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
10. 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
11. 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

12. 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
13. 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.
14. 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
15. 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
16. 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.
17. 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
18. 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
19. 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
20. 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
21. 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

22. 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
23. 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
24. 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
25. 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
26. 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
27. 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
28. 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
29. 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.0a.12.02224
30. 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
31. 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
32. 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
33. 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

34. 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
35. 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
36. REN, Y. et al. Lymph Node Micrometastasis Prognosticates Survival for Patients with Stage I Bronchogenic Adenocarcinoma. *Annals of Surgical Oncology*. 2018, 25(13), 3812–3819. ISSN 1068-9265, 1534-4681. Doi: 10.1245/s10434-018-6743-8
37. 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
38. 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.
39. 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

8 Přehled publikační činnosti autora

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