

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

Studijní program: Doktorské studijní programy v biomedicíně

Studijní obor: Zobrazovací metody v lékařství



**Prim. MUDr. Jiří Votruba**

## **Nové diagnostické metody v bronchologii**

*New diagnostic methods in bronchology*

**Disertační práce**

Školitel: Prof. MUDr. Jan Daneš, CSc.

Konzultant: MUDr. Ing. Lukáš Lambert, Ph.D.

Praha, 2016

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 20. 6. 2016

Prim. MUDr. Jiří Votruba

Identifikační záznam:

VOTRUBA, Jiří. *Nové diagnostické metody v bronchologii. [New diagnostic methods in bronchology]*. Praha, 2016. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, I. klinika tuberkulózy a respiračních nemocí VFN a 1. LF UK. Školitel: Daneš, Jan. Školitel-konzultant: Lambert, Lukáš.

*Motto: Každá otázka, na kterou se člověk ptá, je zodpovězena v témž okamžiku, kdy si ji v duchu položil. Celý život není nic jiného než otázky, které dostaly tvar a které v sobě nesou zárodek odpovědi - a není nic než odpovědi, které jsou obtěžkány otázkami. Kdo v něm vidí něco jiného, je blázen*

Gustav Meyrink, Golem

## Abstrakt

Tato práce se zabývá vývojem a optimalizací moderních metod umožňujících časnou diagnostiku plicní rakoviny a prekancerózních lézí s ohledem na jejich přínos a začlenění do rutinní klinické praxe.

V rámci práce jsme vyvinuli zařízení pro kontaktní měření endobronchiální teploty (termobronchoskopie) a v pilotní studii jsme prokázali statisticky významný rozdíl teploty na endoluminálním povrchu bronchu jak v oblasti nádoru, tak i nad nádorově infiltrovanými uzlinami v porovnání se zdravou sliznicí jak ipsilaterálně, tak i kontralaterálně. Dále jsme zkonstruovali zařízení pro spektroskopii bronchiální sliznice v blízkém infračerveném pásmu, identifikovali charakteristiky pro lokalizaci solitárního plicního uzle a prokázali, že použití tohoto systému zvyšuje počet pozitivních bioptických nálezů v porovnání s endobronchiálním ultrazvukem. V následující části popisujeme další techniky časné diagnostiky bronchogenního karcinomu, jako je endobronchiální ultrasonografie, optická koherenční tomografie, konfokální fluorescenční mikroendoskopie, reflektanční spektroskopie, autofluorescenční bronchoskopie, fluorescenční bronchoskopie a zobrazení v úzkém pásmu (narrow band imaging), a stručně uvádíme naše zkušenosti s některými z nich v rámci provedených pilotních projektů. V další části jsme ukázali, že koncentrace kyseliny octové ve vydechaném vzduchu je slibným biomarkerem k neinvazivní identifikaci pacientů se symptomatickým kyselým gastroezofageálním refluxem. Poslední část práce dokumentuje významné rozdíly v radiační zátěži při HRCT vyšetření plic na třech různých přístrojích v rámci jedné kliniky.

**Klíčová slova:** bronchogenní karcinom, bronchologie, bronchoskopie, spektroskopie, autofluorescence, gastroezofageální reflux, výpočetní tomografie

## **Abstract**

The aim of this work has been the development and optimization of methods for early diagnosis of lung cancer, their utility and integration into daily practice.

Firstly, we developed a device for measurement of endobronchial temperature (thermobronchoscopy) and found significant difference in endoluminal temperature above tumors and infiltrated lymph nodes compared to healthy regions. We further designed an appliance for near infrared spectroscopy of the bronchial mucosa and identified spectroscopic features useful for localization of solitary pulmonary nodule. The use of the appliance improved yield of endobronchial biopsy compared to endobronchial ultrasound. In the next part of the study, we describe further techniques for early diagnosis of lung cancer including endobronchial ultrasound, optical coherence tomography, confocal fluorescence microendoscopy, reflectance spectroscopy, autofluorescence bronchoscopy, fluorescence bronchoscopy, and narrow band imaging with concise introduction of our experience gained in several pilot projects. Next, we showed the utility of measurement of acetic acid in exhaled air as a promising biomarker for non-invasive identification of patients with symptomatic acid gastroesophageal reflux. Lastly, we demonstrated significant difference in radiation dose in HRCT of the lung among three CT scanners in a single institution.

**Keywords:** lung cancer, bronchology, bronchoscopy, spectroscopy, autofluorescence, gastroesophageal reflux, computed tomography

## Seznam použitých zkratk

Zkratka	Význam
AF	autofluorescence
AFB	autofluorescenční bronchoskopie
ALA	hydrochlorid $\delta$ -aminolevulové kyseliny
ASD	angiogenní skvamózní dysplazie
BAL	bronchoalveolární laváž
CIS	carcinoma in situ
EBUS	endobronchiální ultrasonografie
FAD	flavin adenin dinukleotid
GGO	opacita typu mléčného skla („ground glass opacity“)
NADH	nikotin adenin dinukleotid fosfát
NBI	zobrazení v úzkém pásmu („narrow band imaging“)
NIR	spektrum blízké infračervenému záření („near infrared“)
NPV	negativní prediktivní hodnota
NSCLC	nemalobuněčný plicní karcinom („non-small cells lung carcinoma“)
PPV	pozitivní prediktivní hodnota
SPN	solitární plicní uzel („solitary pulmonary nodule“)
VDT	doba zdvojnásobení objemu („volume doubling time“)
VEGFR	receptor pro vaskulární endoteliární růstový faktor („vascular endothelial growth factor receptor“)
WLB	klasická bronchoskopie („white light bronchoscopy“)

## Obsah

1	Úvod.....	10
1.1	Epidemiologie plicní rakoviny .....	10
1.2	Prekancerózní plicní léze.....	11
1.3	Genomika bronchogenního karcinomu .....	13
1.4	Základní informace o bronchologii .....	14
1.4.1	Vývoj bronchologie .....	14
1.4.2	Standardní bronchoskopické bioptické metody.....	16
2	Nové techniky časně diagnostiky bronchogenního karcinomu.....	18
2.1	Termobronchoskopie .....	18
2.1.1	Úvod .....	18
2.1.2	Metodika.....	20
2.1.3	Výsledky.....	20
2.1.4	Diskuse .....	21
2.1.5	Závěr.....	22
2.2	Spektroskopie v blízkém infračerveném pásmu (NIR) v jako vodičko pro biopsii v diagnostice periferních plicních tumorů .....	23
2.2.1	Úvod .....	23
2.2.2	Metodika.....	25
2.2.1	Výsledky.....	27
2.2.2	Diskuse .....	31
2.2.3	Závěr.....	32
2.3	Další techniky časně diagnostiky bronchogenního karcinomu .....	33



2.3.1	Endobronchiální ultrasonografie .....	33
2.3.2	Optická koherenční tomografie .....	34
2.3.3	Konfokální fluorescenční mikroendoskopie.....	34
2.3.4	Reflektanční spektroskopie .....	35
2.3.1	Autofluorescenční bronchoskopie .....	37
2.3.2	Fluorescenční bronchoskopie .....	40
2.3.3	Zobrazení v úzkém pásmu - narrow band imaging .....	41
3	Vyšetření dechového kondenzátu u pacientů s gastroezofageálním refluxem .....	42
3.1	Úvod .....	42
3.2	Metodika.....	43
3.3	Výsledky.....	44
3.4	Diskuse .....	46
3.5	Závěr.....	47
4	Radiační zátěž a obrazová kvalita při HRCT plic.....	48
4.1	Úvod .....	48
4.2	Metodika.....	48
4.3	Výsledky.....	50
4.4	Diskuse .....	51
4.5	Závěr.....	52
5	Závěr .....	53
6	Poděkování.....	55
7	Literatura.....	56

# 1 Úvod

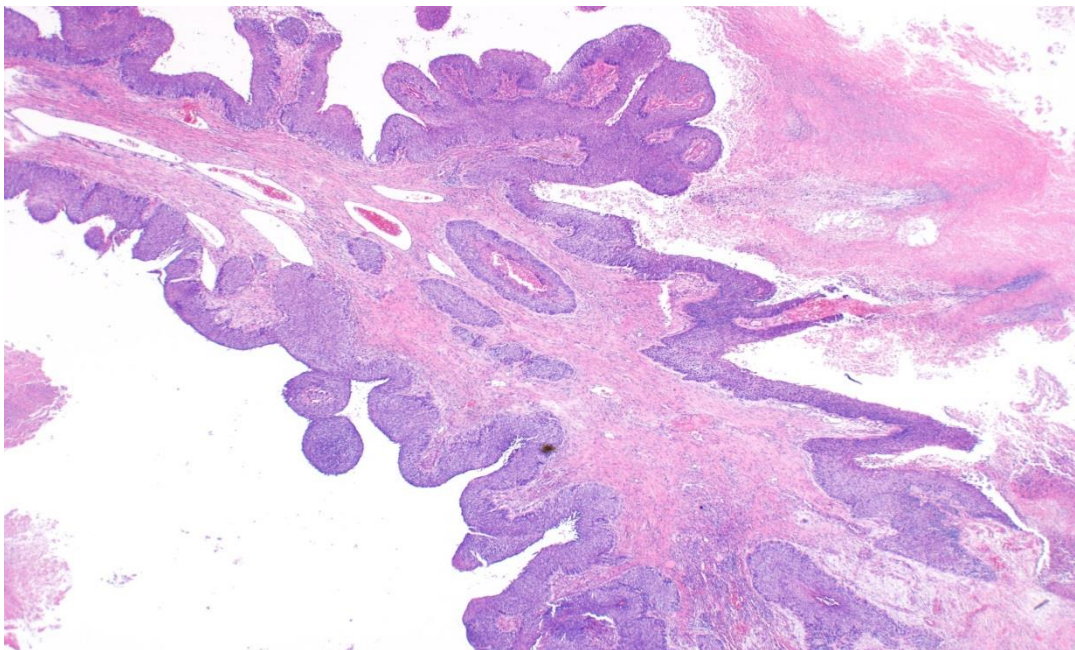
## 1.1 Epidemiologie plicní rakoviny

Plicní rakovina reprezentuje stále 12,3% všech nových diagnostikovaných případů rakoviny a v roce 2014 bylo toto onemocnění zjištěno u asi 1 400 000 lidí celosvětově (Fritscher-Ravens et al., 2000; Smith, 2009). Onemocnění má vyšší incidenci u mužů (i když incidence u žen v poslední době rovněž stoupá) a nejvyšší výskyt je zaznamenáván ve Východní Evropě, Severní Americe, Austrálii a Jižní Americe. Kouření cigaret je dobře zdokumentovanou kauzální příčinou plicní rakoviny a odhaduje se, že zhruba 90% případů tohoto onemocnění je kouřením přímo způsobeno. Byla také jasně prokázána závislost počtu vykouřených cigaret za den, hloubce inhalace a věku kuřáka na riziko vzniku plicní rakoviny (Smith, 2009).

V posledních několika letech je vyvíjeno značné úsilí, aby se časná diagnostika bronchogenního karcinomu zkvalitnila a zejména zrychlila. Pokud totiž onemocnění zachytíme v jeho pozdní fázi, jak je u nás, ale i ve světě zatím obvyklé, je pětiletá úmrtnost kolem 85%. Příčinou této statistiky je nepochybně pokročilý nález při záchytu. V době diagnózy má totiž jen 20% pacientů lokalizovanou chorobu, zatímco 25% má již rozšíření do regionálních uzlin a 55% má vzdálené metastázy. Nicméně i v případě, kdy je nádor lokalizovaný (bez prorůstání, lymfadenopatie či metastáz) je pětileté přežití jen 30 - 40% (Manser et al., 2013). Pokud se však podaří zachytit onemocnění v časném stádiu (ideálně, když je nádor ohraničený jenom na sliznici průdušky), šance pacienta na dlouhodobé přežití se prudce zvyšuje. Pětileté přežití pak může dosáhnout až osmdesáti procent. Často se dokonce může nemocný vyhnout i chirurgickému výkonu, a pokud je nádor ve fázi preinvazivní léze (carcinoma in situ, těžké dysplazie), je možné využít některou z moderních bronchoskopických technik léčby – fotodynamická léčba, laseroterapie, kryoterapie, brachyradioterapie (Simone et al., 2012).

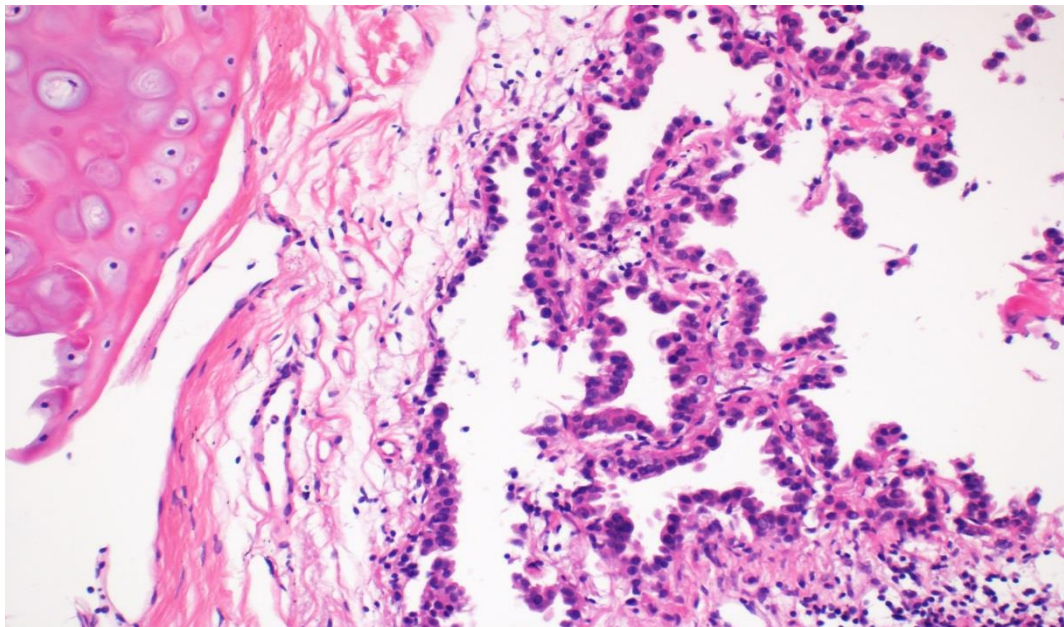
## 1.2 Prekancerózní plicní léze

Plicní rakovina není důsledek rychlé, radikální změny v buňkách bronchiálního epitelu, ale procesu o mnoha krocích, ve kterých se odehrává sekvence morfologických a genetických změn progredujících do maligního onemocnění. Změny prekancerózní bývají často nalézány v asociaci s již diagnostikovaným maligním onemocněním, nebo u pacientů s vysokým rizikem vzniku nádoru. Pro dlaždicobuněčný nádor byla určena sekvence slizničních změn v posloupnosti hyperplazie-metaplazie-dysplazie-carcinoma in situ (CISO**obrázek 1**) (Brambilla et al., 2001) Obr 1.



**Obrázek 1:** Dlaždicobuněčný carcinoma in situ (HE, zvětšení 100x). U mírné dysplázie je patrná mírně zesílená šíře epitelu, mírná pleomorfie, jádra jsou vertikálně orientována, chybí mitózy. Středně ztlustělý epitel, střední anizocytóza a pleomorfie, vertikální orientace jader s mitotickými figurami ve střední třetině nacházíme u středně těžké dysplázie. U těžké dysplázie je patrna výrazně zesílená vrstva epitelu, výrazná anizocytóza a pleomorfie, vertikálně orientovaná nepravidelná jádra v dolní třetině, mitózy v dolních dvou třetinách. U carcinoma in situ, který je zachycen na obrázku, nacházíme výrazně zvětšené buňky, výraznou pleomorfii, bez jasné orientace jader, mitotické figury v celé šíři. Z databáze Kliniky Patologie VFN, poskytl doc. MUDr. P. Dundr, Ph.D.

Kromě změn ve vlastním epiteliálním krytu jsou stále podrobněji zkoumány také změny v podpůrném stromatu epiteliálních buněk. Ukázalo se, že v bronchiální výstelce dochází v poměrně častých stádiích vzniku plicní rakoviny k neoangiogenezi, která se projevuje jako prorůstání kapilár do dysplastické sliznice. Tato léze pak dostala název angiogenní skvamózní dysplazie (ASD). Tato změna se vyskytuje mnohem častěji u prekursorů dlaždicobuněčného karcinomu, nežli u adenokarcinomu (Franklin, 2004). Zdá se také, že je spojena se zvýšenou expresí receptoru pro vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGFR). Pro adenokarcinom s lepidickým růstem (obrázek 2) pak byla v posledních letech určena ještě nepříliš ujasněná sekvence probíhající cestou atypické alveolární hyperplazie. Plicní karcinoidy pak mají spíše uváděný, než prokázaný prekursor v idiopatické plicní hyperplazii neuroendokrinních buněk. Prekursor pro malobuněčnou plicní rakovinu nebyl dosud popsán.



**Obrázek 2:** Adenocarcinoma in situ s lepidickým růstem (HE, zvětšení 200x). Z databáze Kliniky Patologie VFN, poskytl doc. MUDr. P. Dundr Ph.D.

### 1.3 Genomika bronchogenního karcinomu

Asi u 15-20% dlouhodobých kuřáků vznikne plicní rakovina, ale 10% případů bronchogenního karcinomu vzniká u lidí, kteří nikdy nekouřili. U nekuřáků tedy jako karcinogen přichází v úvahu pasivní kouření, expozice jiným karcinogenům, jako radon, azbest nebo arsenik, či expozice znečištěnému životnímu prostředí. Jak u kuřáků, tak u nekuřáků pak hrají významný vliv polymorfismy genů asociovaných s metabolismem kancerogenů, s opravnými mechanismy DNA a kontrolou buněčného cyklu. Ty pak ovlivňují náchylnost buněk k nádorové přeměně a různě modifikují poškození buňky po expozici karcinogenům. Nedávné studie ukazují na to, že úsek na chromozomu 15q je asociován s plicní rakovinou (Hung et al., 2008). Obvyklá varianta (rs1051730) v clusteru CHRNA5-A3-B4 obsahuje tři geny kódující podjednotky receptoru pro nikotinový acetylcholinový receptor. Tento receptor, který v sobě obsahuje membránový kanál, je ligandem pro acetylcholin, nikotin, či vysoce kancerogenní derivát nikotinu 4(methylnitrosamin)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (Lam et al., 2007). Není jen zcela jasné, zda různé genové variace vedou ke zvýšené náchylnosti ke karcinogenezi tím, že ovlivňují kuřácký návyk, či zda mají přímý vliv na růst nádoru a inhibici apoptózy. Expozicí tabákovému kouři tedy vznikají plošné prekancerózní změny s alterací DNA celé bronchiální sliznice („*field cancerogenesis*“). Tyto alterace způsobují aktivaci onkogenů, inhibici tumor supresorových genů a všeobecnou ztrátu heterozygoty. Zjišťování rozsahu a variace těchto změn budou v krátké budoucnosti velmi důležitým vodítkem k rozhodnutí, kteří kuřáci by měli podstupovat intenzivní odvykací programy a screeningové programy ke zjišťování časných fází plicní rakoviny.

## 1.4 Základní informace o bronchologii

### 1.4.1 Vývoj bronchologie

První dokumentované úspěšné pokusy o vizualizaci dýchacích cest, aniž by byla narušena jejich integrita, jsou více než 100 let staré. Vývoj jak historicky staršího rigidního instrumentaria, tak i zhruba o 70 let později flexibilních bronchoskopů, s jistou latencí navazoval na rozvoj esofagogastroskopie.

Za historický mezník v dějinách bronchoskopie bývá tradičně uváděn rok 1897, kdy německý otorhinolaryngolog Gustav Killian provedl za pomoci laryngoskopu, rigidního esofagoskopu, čili rigidní kovové trubky, a kleští extrakci vepřové kosti z pravého hlavního bronchu, čímž pacienta ušetřil tracheotomie. V následujícím roce již popsal další 3 případy extrakce cizího tělesa touto cestou. Další technický vývoj bronchoskopie je spojován především se jménem amerického laryngologa Chevaliera Jacksona z Philadelphie, který na počátku 20. století vylepšil rigidní bronchoskop o přímou optiku, odsávání a distální osvětlení. Rigidní instrumentarium umožňující vyšetření trachey a hlavních bronchů se využívalo výhradně až do 60. let 20. století. V letech 1964-1966 vyvinul Shigeto Ikeda v Japonsku flexibilní fibrobronchoskop, který umožnil vizualizaci dýchacích cest na úrovni segmentů a subsegmentů. Zavedení flexibilní fibrobronchoskopie odstartovalo nebývalý rozvoj, který směřuje ke stále dokonalejší diagnostice, obzvláště v oblasti časně detekce bronchogenního karcinomu, a endobronchiálním intervenčním metodám. Co se týče vývoje optiky a záznamové techniky flexibilních bronchoskopů, jsou v současné době čím dál více používány videobronchoskopy, kde integrální součástí přístroje je videočip. Videoendoskopie umožňuje zobrazení a záznam se všemi výhodami digitalizace.

V následujícím textu jsou uvedeny chronologicky některé metody a technologie, které ilustrují pokrok v bronchoskopii od zavedení flexibilní techniky:

1971 – zobrazení barevnou videokamerou

1974 – zavedení bronchoalveolární laváže

- 1978 - využití hematoporfyrinové fluorescence
- 1978 – zavedení transbronchiální jehlové biopsie
- 1978 – zavedení terapie laserem
- 1979 – zavedení iridiové brachyterapie
- 1980 – využití fotodynamické terapie
- 1987 – vývoj videobronchoskopu
- 1989 – implantace silikonového stentu
- 1991 – využití autofluorescence
- 1999 – zavedení endobronchiální ultrasonografie
- 2003 – první studie s elektromagneticky navigovanou flexibilní bronchoskopií

V současné době je flexibilní bronchoskopie v porovnání s rigidní využívána mnohem častěji. Obecně ale bývá ve velkých centrech asi 20% bronchoskopií prováděno rigidní technikou. Nicméně, přes všechny pokroky ve flexibilní bronchologii platí, že správný výběr endoskopu není otázkou zvýhodňování jednoho nástroje na úkor druhého, ale musí být určován dobrou znalostí možností a limitací obou metod

Rigidní bronchoskopie si podržela svoje místo především v extrakci cizích těles, ošetření masivní hemoptýzy, při intervencích na velkých dýchacích cestách (laser, implantace stentů, ad.) a biopsii větších tkáňových vzorků. Někdy se obě metody bronchoskopie - rigidní a flexibilní technikou - během jednoho výkonu kombinují.

V neposlední řadě je třeba zmínit, že rozvoj bronchoskopie, především intervenčních metod, souvisí i s pokrokem v anesteziologii a ventilačních technikách (Beamis, 2005).

### 1.4.2 Standardní bronchoskopické bioptické metody

Cílem této části není popis běžného bronchoskopického instrumentária. Pro přiblížení důležitosti bioptických metod jako primárního výstupu a „zlatého standardu“ při hodnocení nových metod zobrazení je však nutné alespoň základní informaci o možnostech endobronchiálního odběru histologického materiálu (aspirační cytologie, kartáčková „brush“ biopsie, klíšťová biopsie) podat.

Bronchiální výplachy prováděné aspirací pracovním kanálem po předchozí instalaci fyziologického roztoku do bronchiálních cest nepřináší informaci z bronchiolárního, či alveolárního prostoru a jsou velmi často kontaminovány z horních dýchacích cest. Pro bakteriologickou diagnostiku jsou tak nevhodné, ale pro cytologickou diagnostiku nádorových onemocnění se stále široce využívají. Stále více jsou však nahrazovány atypickou bronchoalveolární laváží jednou, či dvěma porcemi. Cílenější, než prosté odsátí pracovním kanálem, je také aspirace speciální aspirační sondou (Harrow et al., 2000).

Kartáčky používané k cytologické diagnostice endobronchiálních malignit jsou tužší, než kryté kartáčky používané pro mikrobiologickou diagnostiku a riziko krvácení při jejich užití je mírně vyšší. Jejich přínos pro cytologickou (a někdy virologickou) diagnostiku v bronchologii je stále vysoký - u viditelných lézí je diagnóza provedena v 52-77%, u lézí bronchoskopicky okultních je výtěžnost 26-52% (Bewig et al., 2000; Harrow et al., 2000).

V posledních letech jsou ke zpracování vzorků nově používány metody genetické analýzy. Zochbauer-Muller vyšetřoval aberantní metylaci jako důležitý způsob inaktivace tumor supresorových genů u nádorů (Zöchbauer-Müller et al., 2003). U plicních tumorů jde nejčastěji o metylace genu pro receptor RAR 2 (retinoic acid receptor 2), CDH13 (H-cadherin), p16 (INK4a), RASSF1A (RAS association domain family D). Autoři vyšetřovali vzorky získané pharyngeálním kartáčkem, sputum, bronchiální kartáčkovou biopsií a BAL získané u těžkých kuřáků bez nálezu plicní rakoviny. Zjistili nejvyšší četnost methylocí u vzorků získaných kartáčkovou biopsií



z centrálních dýchacích cest. Zdá se tedy, že kartáčková biopsie má z cytologických metod nejlepší výtěžnost pro velké bronchy.

Vyšší výtěžnost u endobronchiálně patrných lézí ale má samozřejmě biopsie klíšťková s odesláním materiálu na histologické zhodnocení (71-91%) (van der Drift et al., 2005).

## **2 Nové techniky časné diagnostiky bronchogenního karcinomu**

Podobně jako u jiných nádorových lézí, je i u bronchogenního karcinomu časná diagnóza spojena s vyhlídkou lepšího přežití (Hirsch et al., 2001; Manser et al., 2013). Výrazem úspěchu trendů snažících se posouvat diagnostiku plicní rakoviny do časnějších stádií onemocnění jsou nové metody bronchologické diagnostiky. Jsou to zejména autofluorescenční a fluorescenční bronchoskopie a endobronchiální ultrasonografie. Experimentálně se také vyvíjejí metody takzvané optické biopsie, které jsou nejčastěji založené na spektroskopii – autofluorescenční spektroskopii a reflektanční spektroskopii. Systémy založené na optické koherenční tomografii jsou již součástí některých komerčně dostupných sestav. V dalších odstavcích jsou tyto nové techniky popsány v kontextu výzkumné činnosti autora.

### **2.1 Termobronchoskopie**

#### **2.1.1 Úvod**

Nové metody časné diagnostiky plicní rakoviny (autofluorescenční a fluorescenční bronchoskopie, reflektanční spektroskopie, endobronchiální ultrasonografie) mají podobný nedostatek - jsou málo specifické i přes výbornou sensitivitu. Nevíme ani zcela přesně, jaké typy patologií jimi vlastně zachytíme. Tato pomocná vyšetření jsou navíc instrumentálně i interpretačně náročná. O postižení lymfatických uzlin dostaneme v případě autofluorescenční i fluorescenční bronchoskopie nulovou informaci, stejně jak i u reflektanční spektroskopie. Endobronchiální ultrasonografie poskytuje informaci jen částečnou a nespecifickou.

Screening plicní rakoviny je dnes také velmi často diskutovaná metoda, která bude v budoucnu hrát spolu s tlakem na primární prevenci hlavní roli při snižování mortality a morbidit bronchogenního karcinomu. Bylo by tedy velmi vhodné zavést

vyšetřovací metodu levnou a přitom se sensitivitou srovnatelnou s autofluorescenční bronchoskopií, která by poskytla podrobnější informace o bronchiálních tumorech a patologicky infiltrovaných lymfatických uzlinách.

Bylo prokázáno, že nádorová tkáň je oproti nenádorové teplejší. Užitečnost termovizního vyšetření byla studována v mamologii i dermatologii (Ng, 2009). Teplotní rozdíl mezi bronchiální sliznicí postiženou nádorem a sliznicí normální zatím nebyl jednoznačně určen. Není navíc také jasné, zda nádorově změněné uzlina způsobí lokální zvýšení teploty v oblasti sliznice k uzlině přilehlé. V případě, že by tomu tak bylo, bylo by možné touto metodou snáze určit i uzlinový staging bronchogenního karcinomu.

Lze předpokládat, že mezi důvody, které by mohly být příčinou zvýšení teploty bronchiální sliznice v blízkosti nádorové tkáně, patří následující: 1) normální povrch bronchiální sliznice je porušen v již nečasnějších stádiích plicní rakoviny, 2) plicní karcinomy jsou charakterizovány vysokým stupněm neoangiogeneze – tj. průtok krve hypervaskularizovanou tkání je zvýšen a tím se mění i její termální charakteristiky, 3) v nejbližším okolí nádorové tkáně je variabilní ohraničená zánětlivá reakce, která může rovněž způsobit změnu teploty tkáně. Na základě těchto úvah jsme vyslovili následující hypotézy:

- 1) Endobronchiálně rostoucí tumory mají oproti svému okolí vyšší teplotu
- 2) V oblasti sliznice normálního vzhledu nad nádorovou tkání a v oblasti nad nádorově změněnou lymfatickou uzlinou je teplota vyšší, nežli je teplota okolí.

Předpokládaným klinickým využitím poznatků této studie bylo, že:

- 1) Zobrazením termální mapy průdušek bude umožněno přesnější rozlišení mezi nádorovou a nenádorovou tkání, dojde ke zvýšení záhytu časných stádií plicní rakoviny, a tím ke snížení mortality nemocných s bronchogenním karcinomem nebo s jeho rizikem,
- 2) Zobrazením teplotní difference v oblasti sliznice přiléhající k nádorově změněné uzlině se výrazně usnadní cílení transbronchiální punkce.

Výsledkem by pak bylo zpřesnění stagingu plicní rakoviny, a tím ke zrychlení a zpřesnění diagnostického postupu.

### **2.1.2 Metodika**

Studie byla schválena Etickou komisí Nemocnice Na Homolce (thermo/dg/03). Do studie bylo zahrnuto 17 pacientů (5 žen) s podezřením na bronchogenní karcinom z předchozího CT vyšetření, kteří byli indikováni k provedení bronchoskopie v celkové anestézii. Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas.

Pro zhodnocení přínosu měření povrchové teploty bronchiální sliznice pro diagnostiku a staging bronchogenního karcinomu jsme zvolili dotykové kontaktní měření pomocí odporového snímače teploty (ROSEMOUNT MR, Fischer-Rosemount Ltd., West Sussex, Velká Británie) s rozsahem měření 0°C až 100°C a přesností 0,1°C s časovou konstantou ustálení 30 s.

Výkon byl prováděn standardní technikou užívanou při rigidní bronchoskopii. V průběhu bronchoskopického vyšetření byla změřena teplota v průduškách, nejdříve na straně zdravé (B), dále v oblasti nádoru (pod přímou optickou kontrolou rigidní optikou, C), mimo nádor (A) a nad nádorově postiženou uzlinou (D) identifikovanou na předchozím CT vyšetření. Teplota byla zaznamenávána po jejím ustálení, po cca 30 s.

Pro porovnání měřených teplot jsme použili párový Studentův t-test (Excel, Microsoft Corp.). Hodnota  $p < 0,05$  byla považována za významnou.

### **2.1.3 Výsledky**

V místě nádoru byla průměrná teplota  $31,5 \pm 0,9^\circ\text{C}$ , nad infiltrovanou uzlinou  $31,3 \pm 0,7^\circ\text{C}$  v porovnání s místem mimo nádor, kde byla teplota  $30,7 \pm 0,9^\circ\text{C}$  ( $p = 0,004$ )

resp.  $p=0,008$ ). Rozdíl mezi teplotou nad nepostiženou sliznicí mezi ipsilaterální ( $30,7\pm 0,9^{\circ}\text{C}$ ) a kontralaterální ( $30,5\pm 0,8^{\circ}\text{C}$ ) stranou významný nebyl.

#### 2.1.4 Diskuse

V této studii jsme na malém souboru pacientů prokázali statisticky významný rozdíl teplot mezi zdravou bronchiální sliznicí, nádorově změněnou sliznicí nebo sliznicí nad nádorově postiženou lymfatickou uzlinou měřené kontaktní metodou.

Měření teploty biologických tkání lze obecně rozdělit na invazivní a neinvazivní. Mezi invazivní (kontaktní) patří měření pomocí termočlánků, termistorů, nebo využívají optické senzory. Optické senzory využívají teplotní závislosti koeficientu odrazu, nebo fotoluminiscenčního jevu (měření je založené na teplotní závislosti času mezi emisí a excitací, nebo na teplotní závislosti intenzity emisního světla). Obecně lze říct, že tyto metody jsou bodové a nehodí se k měření teplotních map slizničního povrchu.

Bezkontaktní měření využívají na jedné straně teplotní závislost některých parametrů standardních zobrazovacích technik, jako je počítačová tomografie (CT), nukleární magnetická rezonance (NMR), částečně i ultrazvuk. Do této skupiny patří také méně rozpracované techniky založené na teplotní změně dielektrických vlastností. A na druhé straně jsou techniky, které přímo měří aktivně vyzařovanou energii a pak zobrazují teplotní mapu. Každé těleso o teplotě vyšší než 0 K vyzařuje energii, kdy pro rozsah fyziologických teplot je tato energie vyzařována elektromagnetickými vlnami v mikrovlnném a infračerveném pásmu. Toto determinuje i způsob měření pomocí tak zvané termokamery a mikrovlnné radiometrie.

Zhodnotíme-li použitelnost jednotlivých metod pro screeningovou diagnostiku bronchogenního nádoru, je zřejmé, že kontaktní (bodové) metody jsou sice laciné, ale nevhodné, neboť je zapotřebí měřit teplotní mapu. Měření pomocí CT a NMR jsou rozpracované, ale pořizovací náklady (např. pro NMR, které je schopno měřit teplotu, to je cca 2 miliony USD), i cena jednoho vyšetření hovoří proti jejich aplikaci. Z tohoto

důvodu jsme v tomto prvotním experimentu zvolili povrchové měření teploty pomocí dotykového snímače. Nicméně lze předpokládat, že v klinické praxi bude nutné použít např. miniaturní termokamery s plošným měřením teploty a jejím vykreslováním na obrazovce v reálném čase. To umožní i fakt, že citlivost termovizních zařízení se dostává pod 0,1 K, což vzhledem k výsledkům našich měření ukazuje na dobrou aplikovatelnost endobronchiálního termovizního zobrazení. Dalším krokem by pak mohla být duální kamera registrující infračervené vlny a červené světlo kolem 630 nm. Tím by ideálně vynikl kontrast mezi nádorovou a nenádorovou tkání. Aditivní informací, pro kliniku však často klíčovou, může být i to, že nad zcela normální sliznicí, pod kterou je uložena postižená lymfatická uzlina, je teplota oproti okolí až o 0,8 K vyšší. Tím by se výrazně usnadnilo cílení transbronchiální biopsie a nebyla by nutnost využívání interpretačně náročné endobronchiální ultrasonografie.

### **2.1.5 Závěr**

V této studii jsme prokázali statisticky významný rozdíl teploty na endoluminálním povrchu bronchu jak v oblasti nádoru, tak i nad nádorově infiltrovanými uzlinami v porovnání se zdravou sliznicí jak ipsilaterálně tak i kontralaterálně měřené kontaktní metodou. Předpokládáme, že rozdíly teplot lze využít k usnadnění vyhledávání nádorových lézí bronchiálního stromu a oblastí nad patologicky infiltrovanými uzlinami ke snadnějšímu cílení bioptického vyšetření. Bude však nutné zdokonalit techniku měření, tak aby byla k dispozici za dostupnou cenou, měření bylo prováděno bezkontaktně s vytvářením barevné mapy superponované s nativním endobronchiálním obrazem (Votruba & Brůha, 2005).

## **2.2 Spektroskopie v blízkém infračerveném pásmu (NIR) v jako vodičko pro biopsii v diagnostice periferních plicních tumorů**

### **2.2.1 Úvod**

Další metodou hodnocení optických vlastností tkáně je spektroskopie v blízkém infračerveném pásmu („near infra-red“, NIR). V zásadě se jedná o hodnocení propustnosti tkáně pro záření s vlnovými délkami na rozhraní viditelného a infračerveného záření, které je do určité míry schopno rozlišit nádorovou tkáň od normální tkáně (Holt et al., 2014). Průchod světla tkání je ovlivňován tkáňovou nehomogenitou způsobenou například buněčnými membránami, či intracelulárními strukturami. Rozptyl je pak zapříčiněn rozdílem v relativním refraktivním indexu na rozhraních mezi médii, či strukturami, například mezi extracelulární tekutinou a buněčnou membránou. Rozptyl světla a jeho absorpce může tedy poskytovat bohatý zdroj informací o tkáňové struktuře a koncentraci chromoforů v tkáni. To pak může vést k možnosti rozlišení mezi maligní a benigní tkání na podkladě spektroskopického monitorování prošlého světla.

Vzhledem k rozšíření screeningu plicních uzlů pomocí CT dochází k nárůstu počtu pacientů, u kterých nález plicního uzle vyžaduje další vyšetření včetně bronchoskopie, jejímž cílem je bioptická verifikace nálezu. Plicní uzle jsou však nalézány i jako vedlejší nález u dalších vyšetření včetně CT koronarografie (Burt et al., 2008; Lambert et al., 2014). Prevalence u screeningové populace činí 8 až 51% přičemž 1-12% těchto uzlů má pokročilou histologii. Podle praktických vodiček medicíny založené na důkazech vydaných ACCP (American College of Chest Physicians) bohužel neplatí ani jedno ze dvou „zlatých“ pravidel k rozlišení mezi maligní a benigní lézí: tedy pravidlo 2leté stability a pravidlo typických radiologických charakteristik svědčících pro malignitu (Wahidi et al., 2007). Navíc zobrazovací metody mají pro rozlišení mezi maligním a benigním plicním uzlem velmi podobné výsledky. Metody jako dynamické CT, dynamické NMR,  $^{18}\text{F}$ -FDG-PET/CT a  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DP SPECT mají zcela nedostatečnou specifitu mezi 76-82% (Cronin et al., 2008).

Přítom je prokázané, že rychlá a přesná diagnostika plicních uzlů je pro řadu pacientů život zachraňující. U pacientů, kteří absolvovali resekci periferních maligních uzlů je přežití 5 let nad 80%. Stejně důležité je ale vyhnout se chirurgickému zákroku v případě nezhoubného onemocnění. Optimální strategie přístupu k diagnostice periferních plicních uzlů ale zůstává dosud neobjasněna a z větší části staví na velikosti léze a její změně v čase.

K tomu, abychom získali histologický, či cytologický průkaz etiologie solitárního uzle máme již dnes k dispozici několik bronchologických metod a jednu metodu invazivně radiologickou. Transparietální punkce uzlu pod CT kontrolou je dobře popsaná a ověřená metoda, která má diagnostickou úspěšnost kolem 90% u plicní uzlů větších než 2 cm. Riziko pneumotoraxu je však u této metody vysoké a vylučuje její použití u osob s těžším preexistujícím plicním onemocněním. Na druhou stranu měla ještě nedávno bronchoskopie u pacientů s periferními plicními uzly jen velmi limitované použití. Pro uzle, které nebyly dosažitelné endobronchiální cestou, byla úspěšnost bronchoskopie kolem 60%, která dále klesala na 25-30% v případě periferních uzlů menších než 2 cm (Ost, Fein & Feinsilver, 2003).

Seznam bronchologických metod, sloužících ke zpřesnění diagnostiky periferních plicních uzlů se v posledních letech naštěstí rozšířil. Můžeme použít ultratenký bronchoskop, endobronchiální ultrasonografii (EBUS), elektromagnetickou navigaci a zcela recentně i virtuální bronchoskopickou navigaci. EBUS má v diagnostice periferních plicních uzlů menších než 2 cm úspěšnost dosahující jen 67% (Prosch et al., 2013). V naší práci jsme se proto pokusili zjistit, zda NIR spektroskopie zvýší diagnostickou úspěšnost transbronchiální biopsie pod skiaskopickou kontrolou. Pro potřeby navigace biopsie ale nebylo nutné rozlišovat mezi nádorovou na nenádorovou tkání, ale pouze predikovat, zda se sonda nachází blíže či dále od tkáně solitárního plicního uzle.

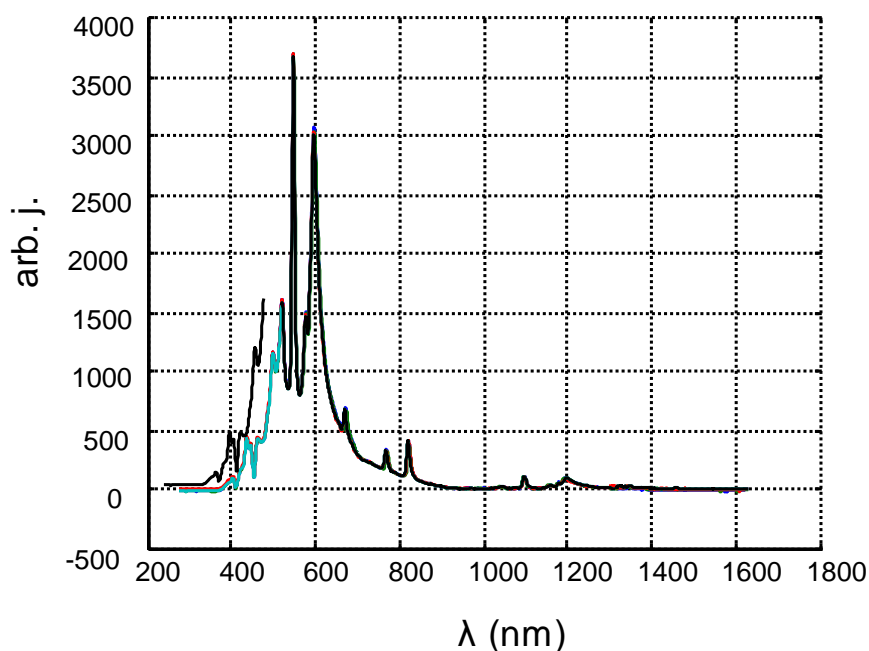


### 2.2.2 Metodika

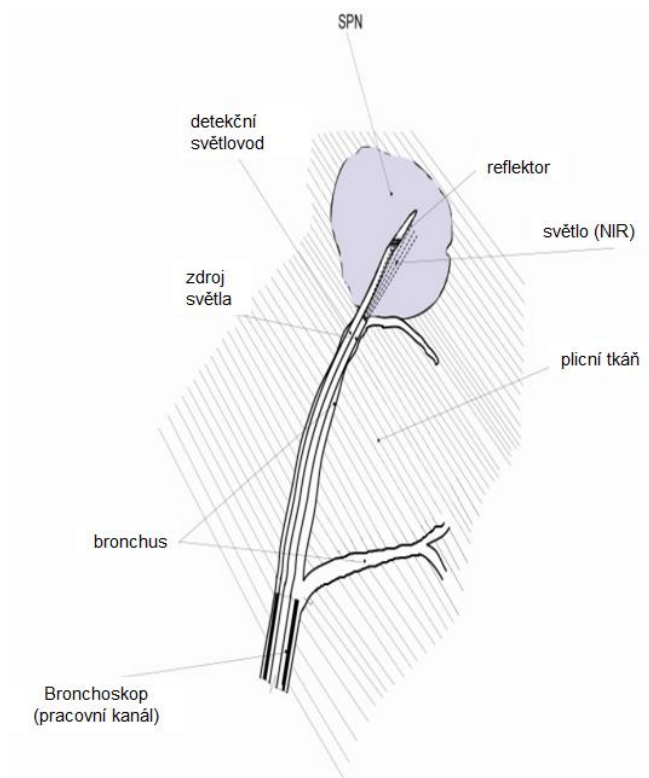
Tato prospektivní studie byla schválena Etickou komisí Nemocnice Na Homolce. Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas. Do studie bylo zahrnuto 210 pacientů (71 žen) s nálezem metabolicky aktivního plicního uzle velikosti 11 až 30mm dle PET-CT, kteří byli indikováni k bronchoskopii a transbronchiální biopsii. Pacienti byli randomizováni v poměru 1:1 do dvou skupin: ve skupině A byla navigace biopsie provedena pomocí skioskopie a EBUS a ve skupině B pomocí skioskopie a NIR spektroskopie.

Experimentální sestava je schématicky zobrazena na obrázku (Obrázek 2). Spektrální měření bylo prováděno na spektroskopu AVANTES AVS – PC 2000 Plug – in spectrometer PC2E1260 Master (Avantes, Nizozemí). Spektroskop má lineární CCD detektor s 2048 pixely, který snímá pásmo od 200 do 1110 nm. Integrační čas celého spektra je mezi 3 ms a 60s. Spektrální mřížka UV/VIS/NIR13 pracuje v pásmu 300 – 1100 nm v milimetrových grafických odstupech. Spektrum zdrojového světla pro NIR je zobrazeno na obrázku (

### Spektrum zdrojového záření NIR

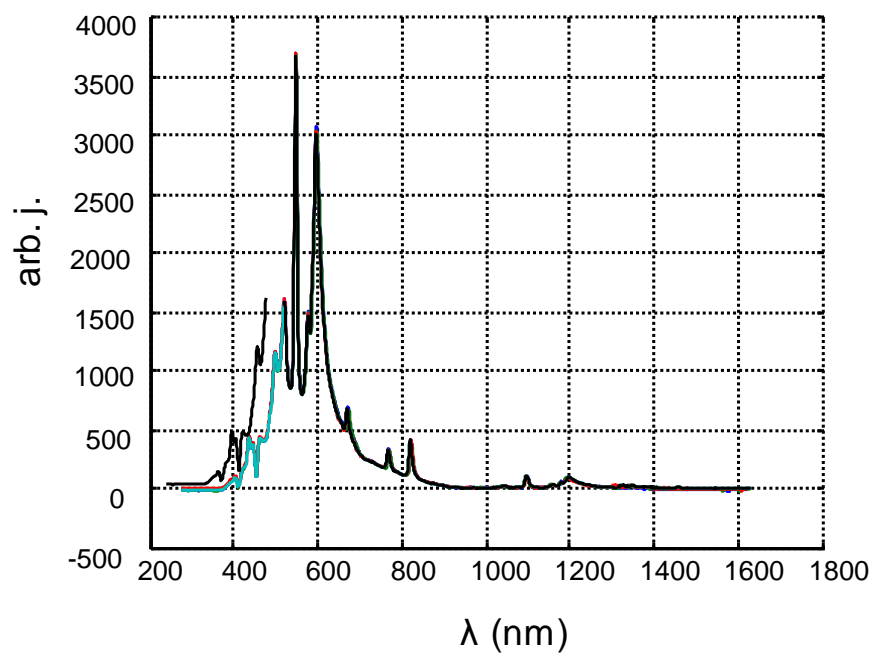


Obrázek 3).



**Obrázek 2:** Experimentální sestava pro NIR spektroskopii.

### Spektrum zdrojového záření NIR



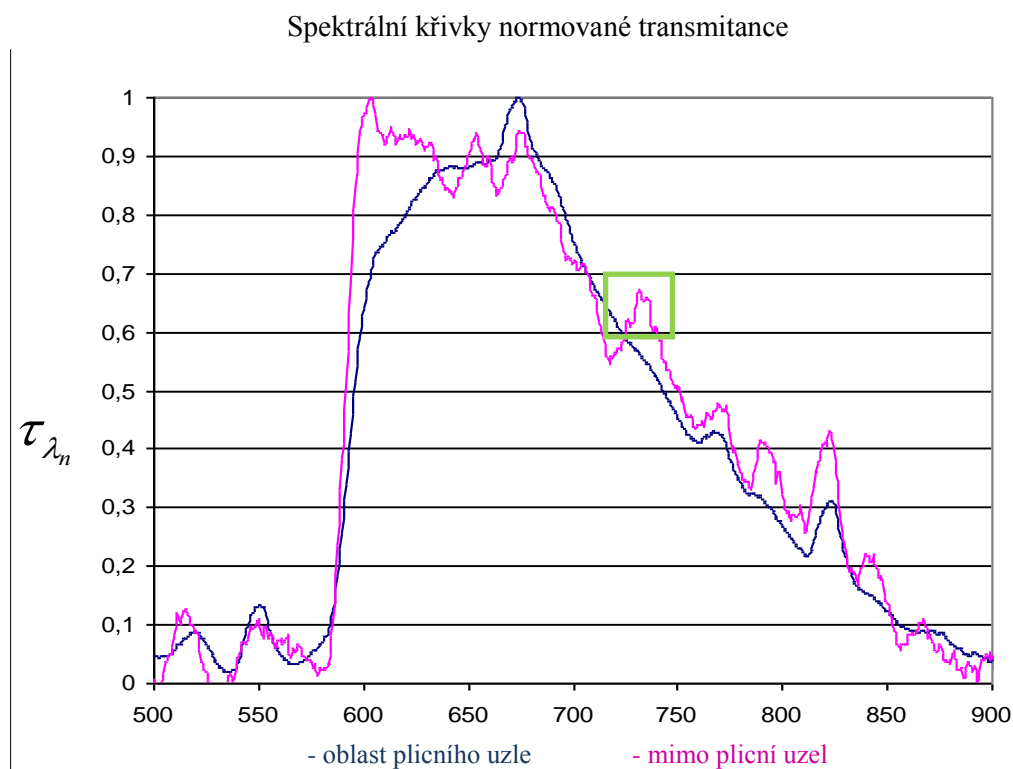
**Obrázek 3:** Spektrum zdrojového světla v blízkém infračerveném pásmu (NIR).

Pro měření NIR záření penetrujícího tkáně jsme vyvinuli jednoduchou sondu. Zařízení se sestává ze dvou vláken o průměru 1 mm spojených v jednom svazku, oddělených izolací. Jedno z vláken je detektor, druhé vlákno je zdroj NIR záření. Vlákno zdrojové je o 1 cm delší, než vlákno indikátorové. Na konci zdrojového vlákna je pak zkosení 60 stupňů a titanové zrcátko ke směrování NIR záření směrem k detekční sondě. Detektorové vlákno je pak napojeno na NIR spektroskop a zdrojové vlákno na NIR zdroj.

Pro porovnání obou metod (NIR a EBUS) stran úspěšnosti transbronchiální biopsie jsme použili  $\chi^2$  test. Poměry transmittance při vybraných vlnových délkách jsme porovnali pomocí Mann-Whitney U testu.

### **2.2.1 Výsledky**

Měření v oblasti normálního plicního parenchymu na různých místech ukázalo charakteristické maximum na vlnové délce 735 nm, které nebylo přítomno při měřeních v oblasti periferních uzlů (Obrázek 4).



**Obrázek 4:** Spektrální křivky normované transmitance ( $\tau$ ) v oblasti solitárního plicního uzle (modrá) a v normální oblasti (červená). Zelený čtverec označuje maximum na 735 nm, které je charakteristické pro normální plicní tkáň.

V patologické tkáni měla všechna spektra pevný poměr dvou standardizovaných hodnot transmittance na vlnových délkách 773 a 823 nm, s minimální modifikací tkáňovou autofluorescencí. Tyto charakteristiky spektra (přítomnost maxima na 735 nm a poměr standardizovaných hodnot transmittance) rozlišovaly pozitivní nebo negativní nález.

Histologie pomocí obou lokalizačních metod byla výtěžná u 156 pacientů (**Chyba! Nenalezen zdroj odkazů.**). Rozdíl v úspěšnosti provedení transbronchiální iopsie při použití NIR (77%) a EBUS (71%) dosahoval statistické významnosti ( $p=0,034$ , **Tabulka 2**).

<b>Nález</b>	<b>počet</b>
Adenokarcinom	55
Epidermoidní karcinom	15
Bronchioloalveolární karcinom	6
Karcinom z velkých buněk	7
Malobuněčný karcinom	16
Sarkoidóza	21
Tuberkulom	13
Plicní embolie	2
Zánětlivé změny	14
Generalizace mimoplicního nádoru	7
<b>Celkový počet pozitivních nálezů</b>	<b>156</b>

**Tabulka 1** - Pozitivní histologické nálezy z transbronchiální biopsie solitárního plicního uzle.

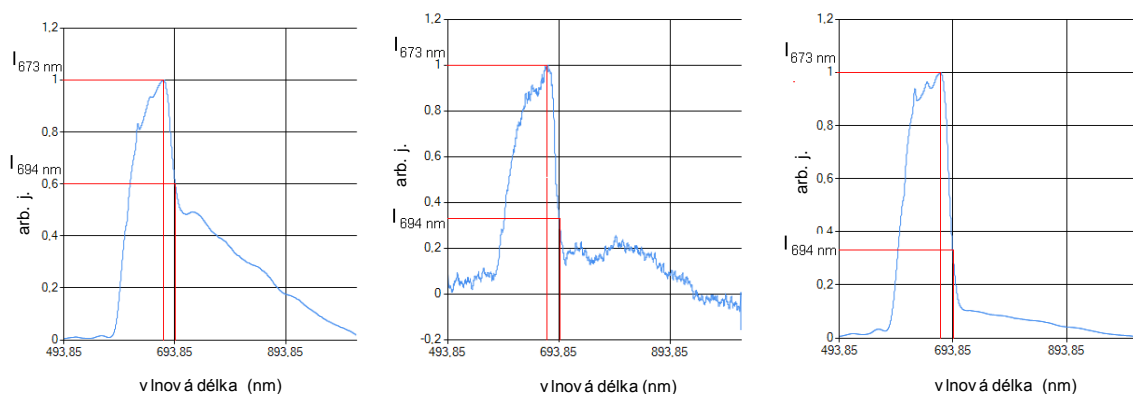
<b>Metoda</b>	<b>Počet lézí</b>	<b>Pozitivní histologie</b>	<b>Negativní histologie</b>	<b>Úspěšnost (%)</b>
skia + NIR	106	82	24	77
skia + EBUS	104	74	30	71

NIR: spektroskopie v blízkém infračerveném pásmu (near-infrared spectroscopy),  
EBUS: endobronchiální ultrazvuk

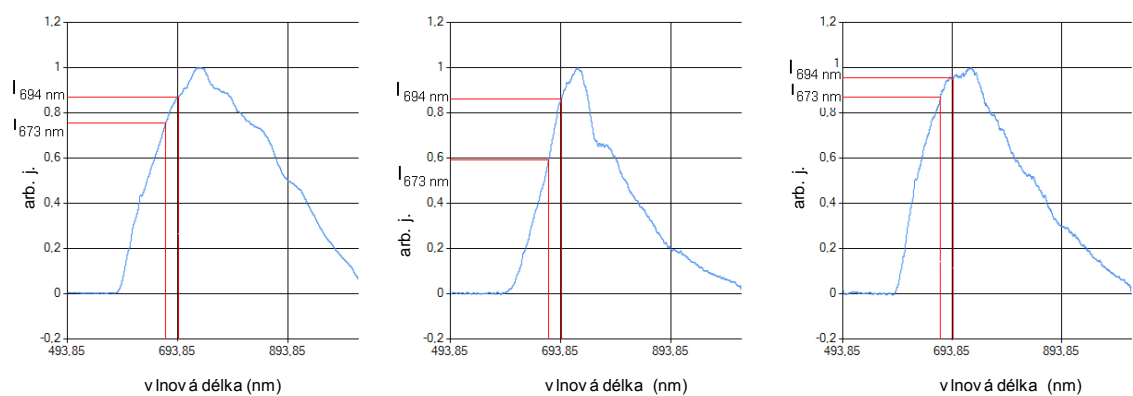
**Tabulka 2:** Srovnání výtěžnosti NIR a EBUS v kombinaci se skiaskopií při provádění transbronchiální biopsie

Dalším studiem spektrálních změn nad zdravou tkání a v oblasti solitárního plicního uzle jsme našli další porovnávací statistiku, kterou byl poměr transmitance při vlnové délce  $\lambda=673\text{nm}$  a  $\lambda=694\text{nm}$  (**Obrázek 5**).

## Oblast solitárního plicního uzle



## Mimo solitární plicní uzel



**Obrázek 5:** Příklady spektrálních charakteristik transmittance při spektroskopii v blízkém infračerveném pásmu (NIR) v místě solitárního plicního uzle (horní řada) a mimo (dolní řada).

	<b>počet měření</b>	<b>poměr</b>	<b>95% CI</b>
$I_{673\text{ nm}} / I_{694\text{ nm}}$ v oblasti plicního uzle	82	2,29±1,11	1,31 - 3,05
$I_{673\text{ nm}} / I_{694\text{ nm}}$ mimo plicní uzle	24	0,78±0,28	0,64 - 0,91
rozdíl hodnot (plicní uzle – mimo plicní uzle)		1,51±0,82	0,59 - 2,08

95% CI: 95% interval spolehlivosti

**Tabulka 3:** Spektrální charakteristika NIR spektroskopie v oblasti plicního uzle a mimo něj jako poměr intenzity ve vlnové délce 673nm a 694nm.

### 2.2.2 Diskuse

NIR spektroskopie pronikla do řady oblastí medicíny včetně hodnocení tkáňové perfúze (Wolf, Ferrari & Quaresima, 2007). V naší studii jsme ukázali, že tato metoda je vhodná i pro lokalizaci místa k provedení transbronchiální biopsie s tím, že zvyšuje její výtěžnost oproti použití endobronchiálního ultrazvuku. Jednoduché zařízení, které jsme zkonstruovali, či jeho modifikace by se dala snadno začlenit do vyšetřovacích algoritmů transbronchiálních biopsií, či do průběhu vyšetření elektromagnetickou navigací. Metoda je nyní patentována a hledáme strategického partnera pro její rozšíření do klinické praxe.

Ačkoliv hlavním využitím NIR spektroskopie v medicíně je měření redoxního stavu tkáně, v hodnoceném rozmezí 670 – 750nm jsou rozdíly v absorpci mezi oxygenovanou a deoxygenovanou krví malé, a proto lze předpokládat, že budou mít i malý vliv na námi použitou metodiku (Friebel et al., 2009). Cílem této práce ale nebylo identifikovat cílovou molekulu, která je za změny transmitance v tomto spektru zodpovědná.

Hlavní výhodou námi navrženého systému jsou nízké pořizovací náklady v porovnání s endobronchiálním ultrazvukem a možnost jeho miniaturizace do jednorázového instrumentu, protože systém vyžaduje pouze dva světlovodné vodiče. Hlavní nevýhodou NIR spektroskopie našem systému je fakt, že lze měřit pouze jedno

místo, se kterým je sonda v kontaktu, podobně jako tomu je u endobronchiálního ultrazvuku. Domníváme se však, že námi navrhovaný systém nalezne uplatnění při použití společně se skioskopii a elektromagnetickou navigací transbronchiální biopsie, zejména díky pořizovacím nákladům v porovnání s endobronchiálním ultrazvukem, možnosti použití dále do periferie s cílem zvýšit její výtěžnost v histologické verifikaci periferních plicních uzlů (Votruba, Brůha & Baláž, 2015).

### **2.2.3 Závěr**

V této práci jsme zkonstruovali jednoduché zařízení pro spektroskopii bronchiální sliznice v blízkém infračerveném pásmu a identifikovali charakteristiky pro lokalizaci solitárního plicního uzle za účelem provedení jeho transbronchiální biopsie. Prokázali jsme, že použití tohoto systému a daných charakteristik zvyšuje počet pozitivních biopsických nálezů v porovnání s použitím endobronchiálního ultrazvuku. Jednoduché zařízení, které jsme zkonstruovali, či jeho modifikace by se dala snadno začlenit do vyšetřovacích algoritmů transbronchiálních biopsií.



## **2.3 Další techniky časně diagnostiky bronchogenního karcinomu**

### **2.3.1 Endobronchiální ultrasonografie**

Endobronchiální ultrasonografie (EBUS) není v principu odlišná od běžných sonografických metod. Metoda využívá různé odrazivosti tkání a tkáňových rozhraní pro ultrazvukové vlny. Bronchoskopem se k místu, které chceme vyšetřovat, zavede tenká radiální sonografická sonda. Těsného kontaktu mezi sondou a stěnou průdušky dosáhneme tím, že naplníme vodou balónek, který sondu obaluje. Tekutina vzhledem k dobré vodivosti ultrazvukových vln vytváří akustické okno a podstatně vylepšuje obraz. Výsledkem je potom po dostatečném zaškolení interpretujícího lékaře:

1. Zobrazení struktury stěny dýchacích cest
2. Zobrazení mediastina
3. Zobrazení uzlin k cílené transbronchiální a transtracheální punkční biopsii
4. Zobrazení plicního parenchymu a lokalizace plicních uzlů

Jedním z cílů optimalizace bronchoskopického vyšetření je maximalizovat procento souhlasného klinického a patologického stagingu. Často používaná mediastinoskopie má svoje nevýhody v invazivitě a nepřístupnosti některých uzlinových lokalit. Zpřesnění rozsahu nádorového postižení uzlin klíčové pro další osud pacienta (Herth & Becker, 2001).

EBUS rovněž slouží jako vodítko k transbronchiální punkční biopsii. Zobrazeny mohou být uzliny již od velikosti 2-3 mm. V poslední době je již komerčně dostupný i bronchoskopický zobrazovací systém s integrovanou endosonografickou sondou, či se dvěma pracovními kanály tak, abychom mohli provádět biopsii patologií, které se na endobronchiálním ultrazvuku zobrazí, pod přímou ultrasonografickou kontrolou. Tenká ultrasonografická sonda zavedená do pracovního kanálu bronchoskopu (radiální

sonda) je nově také používána k cílení transbronchiální klíčkové biopsie. Diagnostická výtěžnost u této metody je u lézí do 1,5 cm kolem 40%, u lézí mezi 1,5 a 3 cm 76%. Je tedy shodná s výtěžností elektromagneticky navigované bronchoskopie (Gildea et al., 2006; Yamada et al., 2007).

Užitečná je i další možnost rozšíření navigace pod skiaskopickou kontrolou říditelným dvoukloubovým systémem zavedeným v teflonovém katetru. Po správném navedení teflonového katetru k místu patologie provedeme potvrzení správné polohy pomocí tenké EBUS radiální sondy a následně provedeme biopsii. Takto prováděná biopsie má o další 3-8% vyšší šanci na úspěch oproti prosté navigaci pomocí radiálního EBUS (Votruba et al., 2015).

### **2.3.2 Optická koherenční tomografie**

Optická koherenční tomografie je technika využívající různé odrazivosti záření v blízkém infračerveném spektru (NIR) pro různé vrstvy bronchiální sliznice. Z naměřených NIR reflektančních odezev se pak skládá pseudoobraz ve škále šedi, který velmi dobře koresponduje s mikrostrukturou bronchiální sliznice. Systém je stále ve vývoji, k běžnému klinickému užití byl recentně uvolněn po 10 letech vývoje. Práce, které by prokázaly jeho klinickou úspěšnost a diagnostický přínos v bronchologii (na rozdíl od očního lékařství) však zatím chybí.

### **2.3.3 Konfokální fluorescenční mikroendoskopie**

Konfokální fluorescenční mikroendoskopie je metoda, jejíž pomocí můžeme získat podrobnější informace o sliznici až do hloubky 100-300  $\mu\text{m}$ . Zařízení detekuje informaci z odraženého světla, autofluorescence a exogenních agens, jako intravenózní fluorescein, či topicky podaný roztok acriflavinu. Výsledkem je zobrazení podobné histologickému obrazu. Zařízení má ale některé klíčové limitace. Jsou to nutnost podání

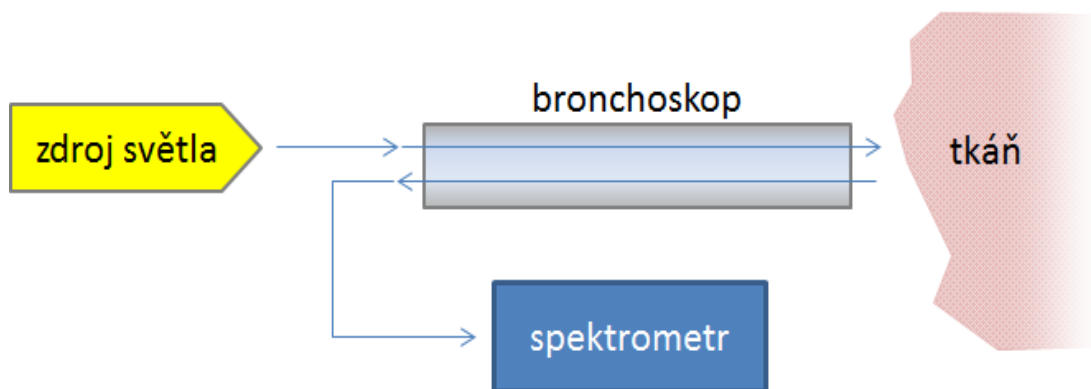
exogenních léků, nemožnost dostatečné kontroly umístění sondy a tedy nejistou orientaci na vyšetřovaném místě (Kiesslich & Canto, 2009).

### 2.3.4 Reflektanční spektroskopie

Využití světla jako diagnostické pomůcky v medicíně vyžaduje znalosti o interakci světla s biologickými tkáněmi a strukturami. Nejdůležitější efekty, které interferují s propagací světla hmotou, jsou reflexe, refrakce, absorpce a rozptyl. Způsob, jakým je průchod světla ovlivňován, závisí na optických charakteristikách vyšetřované tkáně. Pro průchod tkání je pak podstatný koeficient celkové extinkce, který je dán inverzí průměrné volné optické dráhy fotonu v turbidním prostředí. Zeslabení (atenuace) světla je pak závislé čistě na absorpci; platí, že v případě, kdy se atenuace rovná 1, dochází pouze k rozptylu.

Absorpce hraje v biologických systémech, kde využíváme fotofyzikální jevy, důležitou roli. Hlavními molekulami absorbujícími světlo jsou oxy- a deoxyhemoglobin, melanin, myoglobin a voda. Sníženou absorpci pak pozorujeme mezi 600-1000 nm. Tuto spektrální oblast nazýváme terapeutickým oknem. V této oblasti převažuje rozptyl nad absorpcí a světelná penetrace tkání je vysoká.

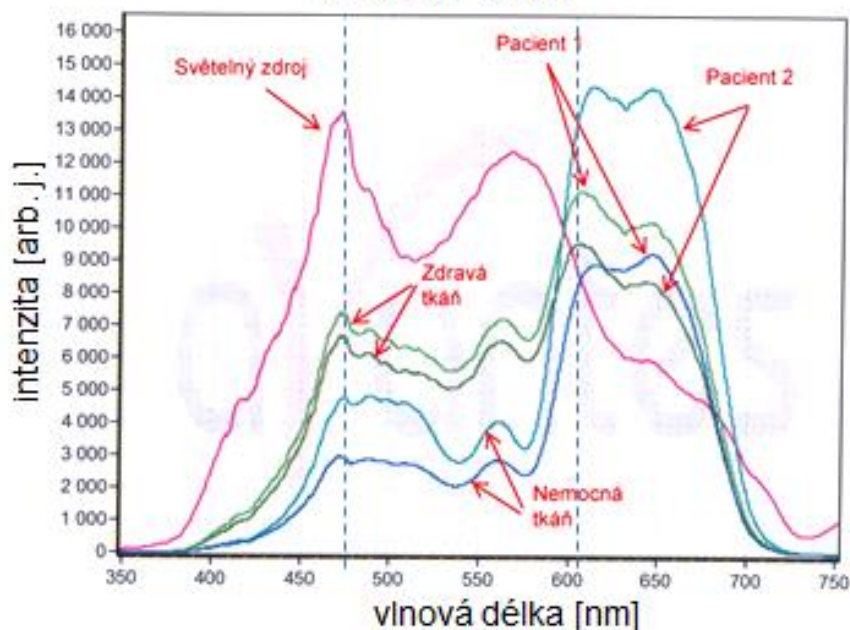
Reflektanční spektroskopii se naše centrum zabývá již od roku 2006 ve spolupráci s Ústavem fotoniky a elektroniky AV ČR. Společným úsilím jsme vyvinuli diagnostický systém reflektanční spektroskopie pro *in vivo* vyšetřování tkáně bílým světlem (**Obrázek 6**), pomocí kterého jsme porovnávali spektrální křivky v pásmu bílého světla pro šest kategorií stavu tkáně: I - zdravá tkáň, II - lehčí zánět, III - těžší zánět nebo dysplázie, IV - epidermoidní karcinom, V - malobuněčný karcinom, VI - adenokarcinom.



**Obrázek 6:** Schématické znázornění diagnostického systému reflektanční spektroskopie při in vivo vyšetřování tkáně bílým světlem.

V pilotním projektu jsme pro třídění nálezů dle závažnosti onemocnění v nádorové sekvenci identifikovali dva významné body při vlnové délce 604 nm a 472 nm, kde byly rozdíly nejvýraznější (**Obrázek 7**). Ve studiu změn spektrálních křivek naše skupina pokračuje tak, aby na dostatečném vzorku pacientů bylo možné jejich statistické zpracování a bližší odhad charakteru vyšetřované tkáně a kalkulace nejistoty stanovené diagnózy. Dalším krokem pak je zjednodušení analýzy pro hodnocení pouze těchto významných bodů a vývoj indikačního systému s akustickou a vizuální signalizací, který by byl komerčně dostupný (Votruba et al., 2007).

## Reflektanční spektroskopické křivky nemocné a zdravé tkáně



**Obrázek 7:** Příklad reflektanční spektroskopické analýzy u dvou pacientů s vyznačením vlnových délek 472 nm a 604 nm (přerušovaná čára), kde byly rozdíly mezi zdravou a nemocnou tkání nejvýraznější.

### 2.3.1 Autofluorescenční bronchoskopie

Dalším fotochemickým jevem je luminiscence či autofluorescence. Luminiscence je emise elektromagnetického záření, nejčastěji světla ze systému elektronem v excitovaném stavu. Luminiscenci můžeme považovat za zdroj studeného světla. Dochází k ní při přechodu fyzikálního systému atomu, či molekuly z excitovaného stavu do stavu klidového při doprovodné emisi světla. V závislosti na ději, který dovedl systém do excitovaného stavu, je pak světelná emise nazývána chemiluminiscencí, bioluminiscencí (většinou enzymaticky indukovaná – luciferin u světlušek, či planktonu), elektroluminiscencí (LED diody, nověji OLED diody, blesky) a fotoluminiscencí (excitace UV, viditelným, či infračerveným zářením). Fotoluminiscence může být rozdělena na dvě kategorie v závislosti na době trvání

excitovaného stavu systému - fluorescence a fosforescence. Molekuly schopné fluorescence a fosforescence jsou pak nazývány fluorochromy resp. fluorophory. Jsou ale i jiné formy luminiscence jako katodoluminiscence, či termoluminiscence.

Dominantními fluorofory, které způsobují autofluorescenci zdravé bronchiální tkáně, jsou elastin, kolagen, flavin, porfyrin, nikotinamidadeninukleotid (NAD) a jeho redukovaná forma (NADH). Hung ve své práci ukázal různá autofluorescenční spektra prekancerózní, kancerózní a normální bronchiální tkáně při excitačních vlnových délkách 405, 442 a 488 nm (Hung et al., 1991). Protoporfyrin IX, který se vyskytuje jak v nádoru, tak i jeho metastázách je diagnosticky významný zejména tím, že fluoreskuje červeně se dvěma charakteristickými maximy a měření lze zpřesnit pomocí dvoufotonové nebo vícefotonové emisní spektroskopické analýzy.

Autofluorescence je založena na schopnosti různých tkání spontánně emitovat světlo o jiných vlnových délkách, než je vlnová délka světla, které tyto buňky osvětluje. Tyto vlastnosti jsou různé pro normální a transformovanou tkáň. Po osvětlení monochromatickým modrým světlem o vlnové délce 442 nm emituje bronchiální sliznice světlo s převažující vlnovou délkou 520 nm (zelená) a nižším maximem kolem 630 nm (červená). V oblastech dysplastické sliznice nebo carcinoma *in situ* je fluorescence snížena až desetinásobně a pozorujeme posun v intenzitě od zeleného k červenému pásmu.

Zdrojem tkáňové autofluorescence jsou zejména subepiteliální vrstvy. Odhaduje se, že autofluorescence epitelu přispívá k celkové autofluorescenci pouze asi 5%. Při excitaci UV nebo modrým světlem v pásmu 400-450 nm vykazuje zdravá tkáň autofluorescenci v pásmu 500 - 520 nm (zelené světlo), zatímco autofluorescence kancerózní tkáně mění intenzitu a barvu podle charakteru a stupně onemocnění od zelené až po červenou. Snížení intenzity autofluorescence může být způsobeno poklesem koncentrace některých fluoroforů jako např. flavinů, zvětšením tloušťky bronchiálního epitelu nebo angiogenezí premaligní či maligní tkáně. *In vivo* optická detekce těchto změn je možná pouze při použití bronchoskopického vyšetření

doplněného o spektroskopii, která umožní na základě spektrální analýzy přiřadit k jednotlivým histologickým nálezům adekvátní nálezy spektroskopické.

Autofluorescenční bronchoskopický zobrazovací systém může být používán v průběhu rutinní flexibilní bronchoskopie. Klasický zdroj bílého světla je v průběhu vyšetření zaměněn za zdroj nízkoenergetického světla helium-kadmiového laseru a na optiku fibroskopu je napojena kamera. Tato obraz je zesílen kamerou s červeným a zeleným pásmovým filtrem, která zachycuje fluorescenční světlo. Zobrazovací konzole pak transformuje světelnou intenzitu a proporcí zeleného k červenému světlu na pseudoobraz zobrazený na monitoru v průběhu vyšetření v reálném čase (Votruba & Šťastný, 2000). Další možností je použití silného xenonového světla a filtrů na cílovou vlnovou délku mezi 400-440 nm (systémy Pentax, Storz, Wolf), kdy buzení fluoroforů je mnohem méně specifické, ale výsledný autofluorescenční signál je u vhodně nastaveného systému silnější, nežli signál monochromatického zdroje (Häussinger et al., 2005). Zařízení je pak schopno rozlišit normální bronchiální sliznici i od středně těžké dysplázie.

Pomocí tohoto zařízení je tak možné diagnostikovat nejen již rostoucí plicní karcinom, ale také časně prekancerózní změny ve sliznici průdušky, protože klasická fibrobronchoskopie („white-light bronchoscopy“, WLB) má pro časně neoplastické změny bronchiální sliznice velmi nízkou sensitivitu. Pro carcinoma in situ je uváděna citlivost WLB kolem 30%. Důvodem je převážně intraepiteliální způsob růstu většiny časných nádorů. Autofluorescenční bronchoskopie je ale schopna zvýšit detekční schopnost bronchoskopie vzhledem k časným změnám dva- až třikrát. Lékař vybavený autofluorescenčním bronchoskopem je často schopen diagnostikovat změny na sliznici velikosti již od několika milimetrů. Nevýhodou je nízká specifická metoda, senzitivita je však vzhledem k jednoznačné nutnosti spojení metody s morfologickou diagnostikou pro screeningové vyšetření mnohem lepší (Herth & Becker, 2001; Lam et al., 2007).

### 2.3.2 Fluorescenční bronchoskopie

Fluorescenční bronchoskopie využívá k diagnostice porfyriny, či jejich prekursory. Nejčastěji je používána kyselina 5-aminolevulová jako mediátor selektivní změny fluorescenčního stavu buňky. Hydrochlorid-5-aminolevulové kyseliny (ALA), prekuzor přirozených porfyrinů, je látka fyziologicky syntetizovaná lidskými játry, která je netoxická a ve své chemicky čisté formě neindukuje žádné alergické reakce. ALA je po inkorporaci do buněk metabolizována na protoporfyrin IX, který se akumuluje v rychle rostoucích tkáních v 17x vyšší koncentraci, než v tkáních normálních. Oblasti časných nádorových změn (carcinoma in situ, mini-invazivní karcinom) fotosenzibilizované tkáně pak po osvětlení modrým světlem (vlnová délka = 420 nm) vydávají jasně červené fluorescenční světlo.

V naší republice zatím tato metoda využívaná není. V roce 2002 se naši skupině podařilo ve spolupráci s firmou Science for Life a prof. Jirsou získat schválení SÚKL pro provedení srovnávací studie citlivosti autofluorescenční bronchoskopie a fluorescenční bronchoskopie s inhalačním preparátem ALA. Pro objektivizaci měřený byl využit tzv. „point monitoring“ - detailní zkoumání jednoho velmi drobného úseku patologické a nepatologické sliznice pomocí citlivého detektoru červeného světla vyvinutého ve spolupráci s Akademií věd ČR. Do této nepublikované studie bylo zahrnuto 40 pacientů, u kterých byla indikována diagnostická bronchoskopie z důvodu podezření na bronchogenní karcinom. Pacienti podepsali informovaný souhlas s inhalačním podáním ALA a samotným bronchoskopickým výkonem. Inhalátorem pak bylo podáno celkově 1 g ALA ve 2 ml pufovaného ½ Rigerova roztoku 60 min před bronchoskopickým výkonem. Bronchoskopické zobrazení bylo prováděno s přídatným zeleným filtrem pro zvýšení kontrastu mezi fluorescenčně pozitivní a negativní bronchiální sliznicí a s použitím výše zmíněného „point-monitoračního“ zařízení, sestávajícího se z jednoduchého systému světlovodných katetrů, z nichž jeden je zdrojový a jeden indikační. Indikační katetr pak byl připojen k detektoru záření v oblasti 550-600 nm. Hodnocen byl počet diskrepantních nálezů v bílém světle



a s pomocí indukované fluorescenční bronchoskopie – tedy v jakém počtu případů přináší fluorescenční bronchoskopie aditivní informaci.

Statistické hodnocení ukázalo velmi nekonzistentní výsledky. U některých pacientů se neprojevovala fluorescence ani při jasně přítomném tumoru v bronchiálních cestách, u jiných byla metoda naopak přínosná. Ve výzkumu jsme plánovali pokračovat, neboť jsme předpokládali, že nekonzistentní výsledky budou způsobeny nevhodnou distribucí inhalované ALA, či nesprávnou inhalací, avšak práce byla nuceně zastavena z důvodu ukončení činnosti společnosti Science for Life, která byla dodavatelem ALA. Výsledky nebyly publikovány vzhledem k dohodě o prioritním právu publikace pro firmu. Obecně metoda indukované fluorescence v současné době nemá v bronchologii klinické uplatnění.

### **2.3.3 Zobrazení v úzkém pásmu - narrow band imaging**

Konvenční bronchoskopie bílým světlem užívá k vytvoření obrazu plný rozsah vlnové délky viditelného světla o vlnové délce 400 - 700 nm. Zobrazení v úzkém pásmu („narrow band imaging“, NBI) v kombinaci se zvětšující endoskopií osvětluje slizniční povrch filtrovaným světlem, u kterého jsou potlačeny vyšší vlnové délky a díky tomu zlepšuje zobrazení slizniční mikrovaskulatury. Pro časnou diagnostiku bronchogenního karcinomu je tato metoda založena na pozorování, že absorpce světla hemoglobinem je u počínajících dysplazií větší. Metoda NBI se ukázala přínosná i v klinických studiích (Shibuya et al., 2003; Zaric et al., 2011). Rutinnímu použití NBI v klinické praxi pomáhá i fakt, že tato metoda je poměrně jednoduchá (Zaric et al., 2013).

### **3 Vyšetření dechového kondenzátu u pacientů s gastroezofageálním refluxem**

#### **3.1 Úvod**

Úmrtnost na plicní rakovinu přesahuje úmrtnost na jakýkoliv jiný solidní nádor. Proto se v posledních letech intenzivně věnujeme skrínigovým metodám bronchogenního karcinomu. Důvod je zjevný. V současnosti u nás není zaveden žádný systematický skrínigový algoritmus pro plicní rakovinu a 5 leté přežití symptomatických pacientů je uváděno kolem 15%. Operabilita je u této skupiny pacientů je nižší než 25%. V roce 2011 byla ukončena studie NLST (National Lung Screening Trial - USA), která na celkově 53 456 probandech s vysokou zátěží kouřením (aktivní a bývalí kuřáci 55 až 74 let, 30 pack/years) srovnávala efektivitu skrínigu pomocí nízkodávkovaného CT hrudníku proti skiagramu hrudníku v 0, 1 a 2 letech od randomizace (Jaklitsch et al., 2012). Výsledkem bylo snížení mortality na bronchogenní karcinom u skupiny skrínované pomocí CT o 20% (354 úmrtí vs. 442 úmrtí). Ještě významnější však bylo snížení celkové mortality o 7% u skupiny pacientů skrínovaných pomocí CT hrudníku. Na základě výsledků této studie byl ve Spojených státech zaveden a pojišťovny proplácen plošný skrínig rizikových pacientů od konce roku 2014.

Mimo jasně pozitivních nálezů však skrínig výsledků přináší i řadu problémů. Tím nejvýznamnějším je nepochybně obrovské množství falešně pozitivních nálezů na CT tvořící u této populace takzvaný „overdiagnosis bias“. Tato systematická skrínigová chyba hrozí zbytečným léčením a s tím spojenou morbiditou a mortalitou u nálezů, které by jinak nevedly ke snížení přežití pacientů. V NLST byla „overdiagnosis“ 19%. Z toho vyplývá řada medicínských i etických problémů. Nejjednodušeji se dají vyjádřit následující kalkulací. Na každou nádorovou smrt, které zabráníme časným diagnostikáním plicní rakoviny, vytvoříme 320 případů „overdiagnozy“. Zbytečné vyšetřování těchto případů vytváří etický, ekonomický i medicínský problém velkého rozsahu. Zkoumáme tedy nové metody zužování

skriningové skupiny a evaluace CT zobrazení, které nežádoucí efekty skriningu sníží. Jako nejnadějnější z nich se jeví zužování skriningové skupiny pomocí analýzy vydechovaného vzduchu, či spirometrického vyšetření. Chronická obstrukční plicní nemoc je totiž asociována se zvýšeným rizikem rozvoje plicní rakoviny. FEV-1 pod 70% je spojeno s 2,2násobným rizikem u mužů a 3,9násobným rizikem u žen (Wasswa-Kintu et al., 2005).

V rámci snahy o maximální zúžení skrínované skupiny se v poslední době uplatňují zejména vyšetření spirometrické a vyšetření vydechovaného vzduchu. Další vyšetřovací metody, zejména vyšetření krve a plazmy pomocí proteomiky a genomiky, jsou zatím ve výzkumném stádiu a pro jejich využití nejsou dostupná validní data (Spira et al., 2007; Salaün et al., 2008). Vyšetření dechového kondenzátu je velmi jednoduché a pro pacienta nezatěžující. Základy práce s přístrojem na jímání kondenzátu vydechovaného vzduchu jsme získali již v roce 2013 u pacientů s podezřením na gastroezofageální reflux a v následující studii jsme porovnali koncentrace kyseliny octové ve vydechovaném vzduchu pacientů s a bez gastroezofageálního refluxu.

### **3.2 Metodika**

Studijní protokol bych schválen Etickou komisí Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a všichni pacienti podepsali informovaný souhlas. Do studie jsme zařadili 22 pacientů (12 mužů, 12 žen) ve věkovém rozmezí 5 až 71 let. U těchto pacientů byla prokázána refluxní choroba jícnu a všichni splňovali alespoň 2 z následujících 3 kritérií:

I) pozitivní nález na 24hodinové pH metrii jícnu

II) výrazné klinické obtíže spojené s gastroezofageálním refluxem

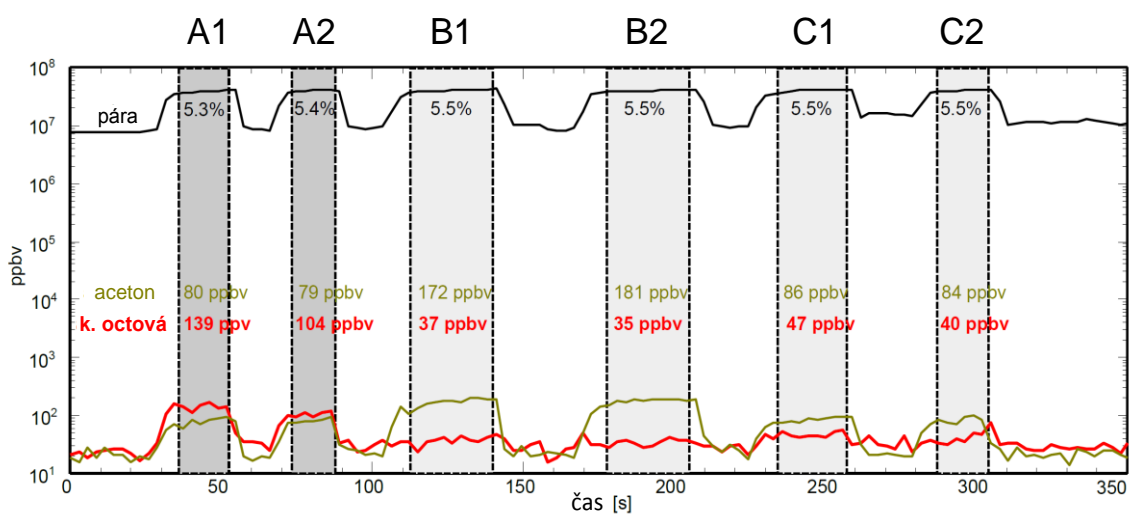
III) pozitivní nález na gastrokopii jak makroskopicky tak v bioptickém materiálu.

Kontrolní skupinu tvořilo 24 zdravých dobrovolníků (14 mužů, 10 žen) ve věkovém rozmezí 21 až 52 let.

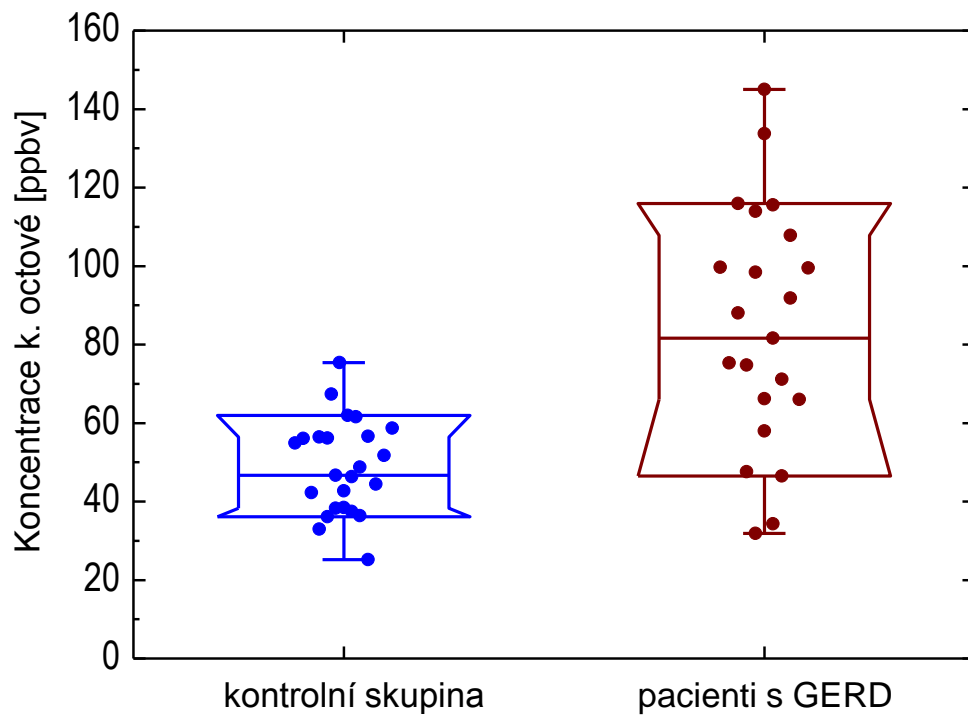
Každý účastník studie byl požádán, aby provedl minimálně dva výdechy do jednorázového náustku (Micor Medical, Kent, Velká Británie). Samotnou analýzu vydechaného vzduchu jsme provedli pomocí analyzátoru SIFT-MS (Profile 3, Instrument Science Ltd., Crewe, Velká Británie), jak bylo popsáno dříve (Pysanenko, Španěl & Smith, 2009; Španěl & Smith, 2013). Průměrné koncentrace vydechané kyseliny octové byly stanoveny v end-expiriu, byla-li koncentrace vodních par alepoň 5%. Ke statistickému zhodnocení výsledků jsme použili Mannův-Whitneyův U test. Hodnota  $p < 0,05$  byla považována za významnou.

### 3.3 Výsledky

Záznam změn koncentrace vodní páry, acetonu a kyseliny octové v reálném čase během výdechu je zobrazen na obrázku (Obrázek 8). Střední hodnoty koncentrace kyseliny octové ve vydechaném vzduchu jsou vyobrazeny v grafu (Obrázek 9). Střední hodnota u kontrolní skupiny byla 48 ppbv a u pacientů s gastroezofageální refluxní chorobou 85 ppbv ( $p < 0,0001$ ).



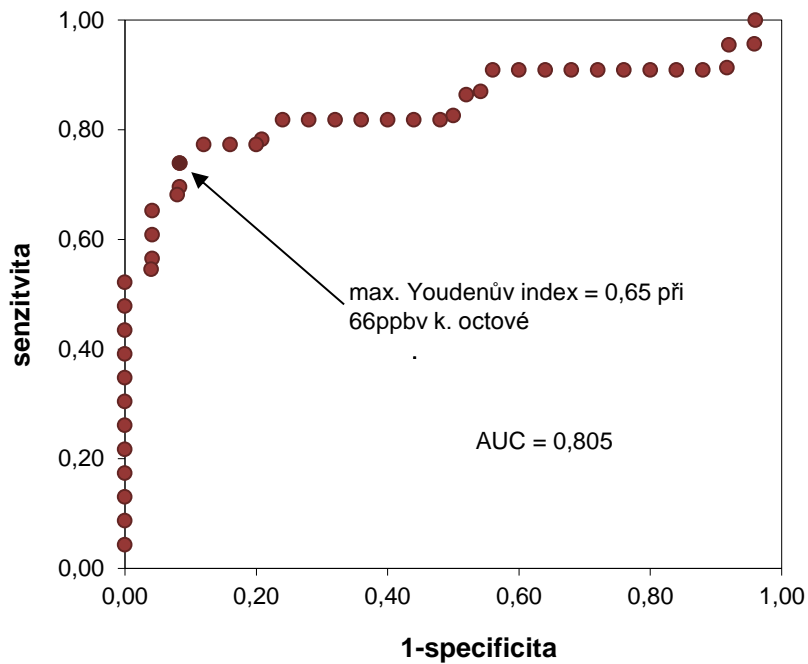
**Obrázek 8:** Koncentrace vodní páry, acetonu a kyseliny octové ve vydechaném vzduchu (osa y) u pacienta s gastroezofageálním refluxem (A1-A2) a dvou pacientů z kontrolní skupiny (B1-B2 a C1-C2).



**Obrázek 9:** Koncentrace kyseliny octové ve vydechaném vzduchu zdravých pacientů (modrá) a pacientů s gastroezofageální refluxní chorobou (hnědá).

Receiver operating characteristics (ROC) křivka (Obrázek 10) ukázala plochu pod křivkou  $AUC = 0,805$  a hodnotu koncentrace kyseliny octové 66 ppbv při maximálním Youdenovu indexu (0,65).

## ROC křivka – k. octová ve vydechovaném vzduchu



**Obrázek 10:** ROC křivka koncentrace kyseliny octové ve vydechovaném vzduchu pro rozdělení mezi zdravé jedince a pacienty s gastroezofageální refluxní chorobou.

### 3.4 Diskuse

Výsledky provedené studie ukazují, že koncentrace kyseliny octové ve vydechovaném vzduchu je vhodný biomarker k rozlišení zdravých kontrol od pacientů s gastroezofageální refluxní chorobou. Předchozí studie ukázaly přítomnost kyseliny octové ve vydechovaném vzduchu zdravých jedinců a v menším množství i u pacientů s karcinomem plic (Pysanenko, Španěl & Smith, 2009). Koncentrace kyseliny octové vydechované ústy se u zdravých dobrovolníků pohybují v rozmezí 30 až 60 ppbv. Koncentrace vydechované nosem jsou o dva řády nižší (Pysanenko, Španěl & Smith, 2009). Rovněž i po vypláchnutí úst vodou se koncentrace snižují na zhruba 10 ppbv a vyšší koncentrace kyseliny octové lze nalézt i v samotných slinách (Effros et al., 2006).

Acetát je fyziologický metabolit vznikající v Krebsově cyklu nebo při metabolismu pyruvátu. Plazmatické hodnoty u zdravých jedinců kolísají mezi 50 and 100  $\mu\text{mol/l}$  (Tollinger, Vreman & Weiner, 1979). Rozdělení koncentrace acetátu (plynné složky) a kyseliny octové (tekuté složky) v roztoku je do značné míry určeno pH roztoku. Lze proto předpokládat, že zvýšení koncentrace acetátu může být u pacientů s gastroezofageální refluxní chorobou podmíněno lokálním snížením pH v dýchacích cestách. Koncentrace acetátu jsou více závislé na rovnovážném stavu v bronchiálních cestách než na samotné koncentraci v alveolech (Anderson, Babb & Hlastala, 2003; Španěl, Dryahina & Smith, 2013).

Jak vyplývá z této práce, hlavní výhodou stanovení acetátu ve vydechovaném vzduchu je neinvazivnost vyšetření a také to, že hodnotí vliv kyselého gastroezofageálního refluxu na dýchací cesty. Řada pacientů s gastroezofageální refluxní chorobou nemá kašel a naopak část pacientů s kyselým refluxem může mít normální endoskopický nález na sliznici jícnu.

### **3.5 Závěr**

V této práci jsme porovnali koncentrace kyseliny octové ve vydechovaném vzduchu u pacientů s prokázaným gastroezofageální refluxní chorobou a u zdravých dobrovolníků. Výsledky této studie ukazují, že koncentrace kyseliny octové ve vydechovaném vzduchu je slibným biomarkerem k neinvazivní identifikaci pacientů se symptomatickým kyselým gastroezofageálním refluxem.

## 4 Radiační zátěž a obrazová kvalita při HRCT plic

### 4.1 Úvod

Vyšetření plic s vysokým rozlišením (HRCT) patří po skiagrafickém snímku hrudníku k základním vyšetřovacím metodám i v bronchologii. Průměrná radiační zátěž z HRCT plic se mezi jednotlivými pracovišti vyšší až 13 násobně a v průměru je kolem 4 mSv (van der Molen et al., 2013). Ve velkých multicentrických studiích zaměřených pouze na detekci a sledování plicních uzlů, nikoliv hodnocení plicního parenchymu, se pohybovala radiační zátěž z tzv. nízkodávkového CT hrudníku kolem 1,5mSv (National Lung Screening Trial Research Team et al., 2011; Oudkerk & Heuvelmans, 2013). Snižování radiační zátěže u HRCT plic má své opodstatnění. Vyšetření nezhřídky podstupují mladí pacienti a to opakovaně (např. u plicní sarkoidózy). V této studii jsme se proto rozhodli porovnat radiační zátěž a obrazovou kvalitu HRCT vyšetření plic mezi třemi CT přístroji na Radiodiagnostické klinice VFN a 1. LF UK.

### 4.2 Metodika

Z každého ze tří pracovišť bylo náhodně vybráno po padesáti pacientech, kteří podstoupili HRCT plic. Vyšetření byla provedena na následujících třech přístrojích: 16-řadý přístroj Somatom Emotion 16 (Siemens, Forchheim, Německo; SE), 64-řadý přístroj Somatom Definition AS (Siemens, Forchheim, Německo; SD), a 256-řadý přístroj Brilliance iCT (Philips Healthcare, Best, Nizozemí; iCT). Parametry přístrojů jsou přehledně uvedeny v tabulce (**Tabulka 4**).



Přístroj	Kolimace	Napětí na rentgence	Referenční součin proudu a času	Rekonstrukční algoritmus	
				Mediastinum	HRCT
Somatom Emotion (SE)	16x1,5mm	130kV	45mAs	B41s medium +, 5mm	B70s sharp, 1,5mm
Somatom Definition AS (SD)	64x0,6mm	120kV	141mAs	B31f medium smooth +, 5mm	B60f sharp, 1,5mm
Brilliance iCT (iCT)	256x0,625mm	120kV	50mAs	B, iDOSE4, 5mm	Lung enhanced, iDOSE4, 1,5mm

**Tabulka 4:** Parametry a nastavení použitých CT přístrojů, použité rekonstrukční algoritmy.

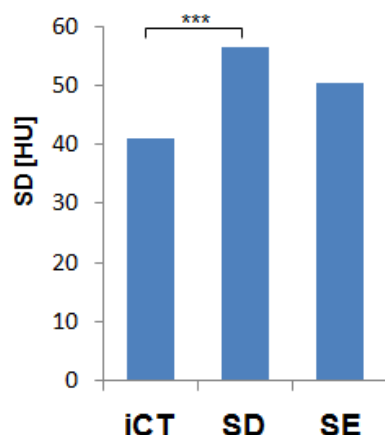
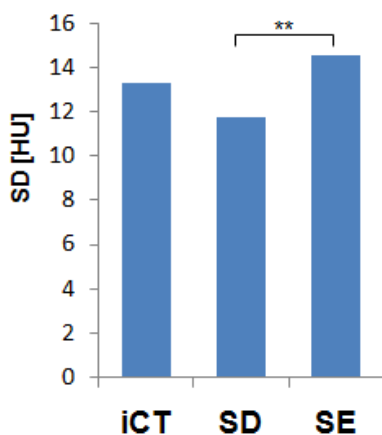
Obrazovou kvalitu jsme hodnotili jak v HRCT tak i mediastinální rekonstrukci na čtyřstupňové Likertově škále (1 = nedignostické, 2 = horší kvalita, 3 = přiměřená kvalita, 4 = nadprůměrná kvalita). Obrazový šum byl měřen jako směrodatná odchylka denzity v trachee v úrovni horní hrudní apertury, nad karinou, v levé síni a v oblouku aorty. Pro odhad radiační zátěže jsme použili dávkový lineární produkt (DLP) a konverzní koeficient  $0,0145 \text{ mSv}\cdot\text{mGy}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  ("The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. ICRP publication 103," 2007).

Statistické porovnání jsme provedli v programu GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, USA) pomocí ANOVA s Bonferroni post hoc testy. Hodnotu  $p < 0.05$  jsme považovali za významnou.

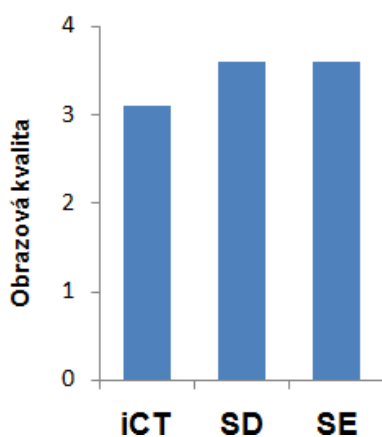
### 4.3 Výsledky

Radiační zátěž při vyšetření byla u iCT  $1,8 \pm 0,6 \text{ mSv}$ , u SD  $4,6 \pm 1,7 \text{ mSv}$  a u SE  $3,5 \pm 1,0 \text{ mSv}$  ( $p < 0,0001$ ). Navzdory tomu, objektivní i subjektivní hodnocení obrazové kvality v mediastinální a HRCT rekonstrukci, které jsou graficky znázorněny na obrázku (Obrázek 11) ukázalo pouze minimální rozdíly mezi SD a iCT při objektivním hodnocení parenchymu a dokonce vyšší obrazový šum u SD, u kterého byla radiační zátěž nejvyšší. Rozdíly obrazové kvality mezi SE a iCT nebyly významné (Obrázek 12).

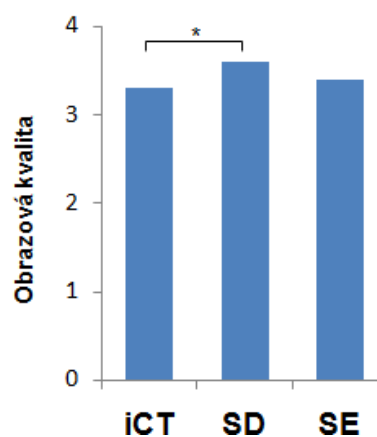
**Obr. kvalita - SD HU mediastinum    Obr. kvalita - SD HU trachea**



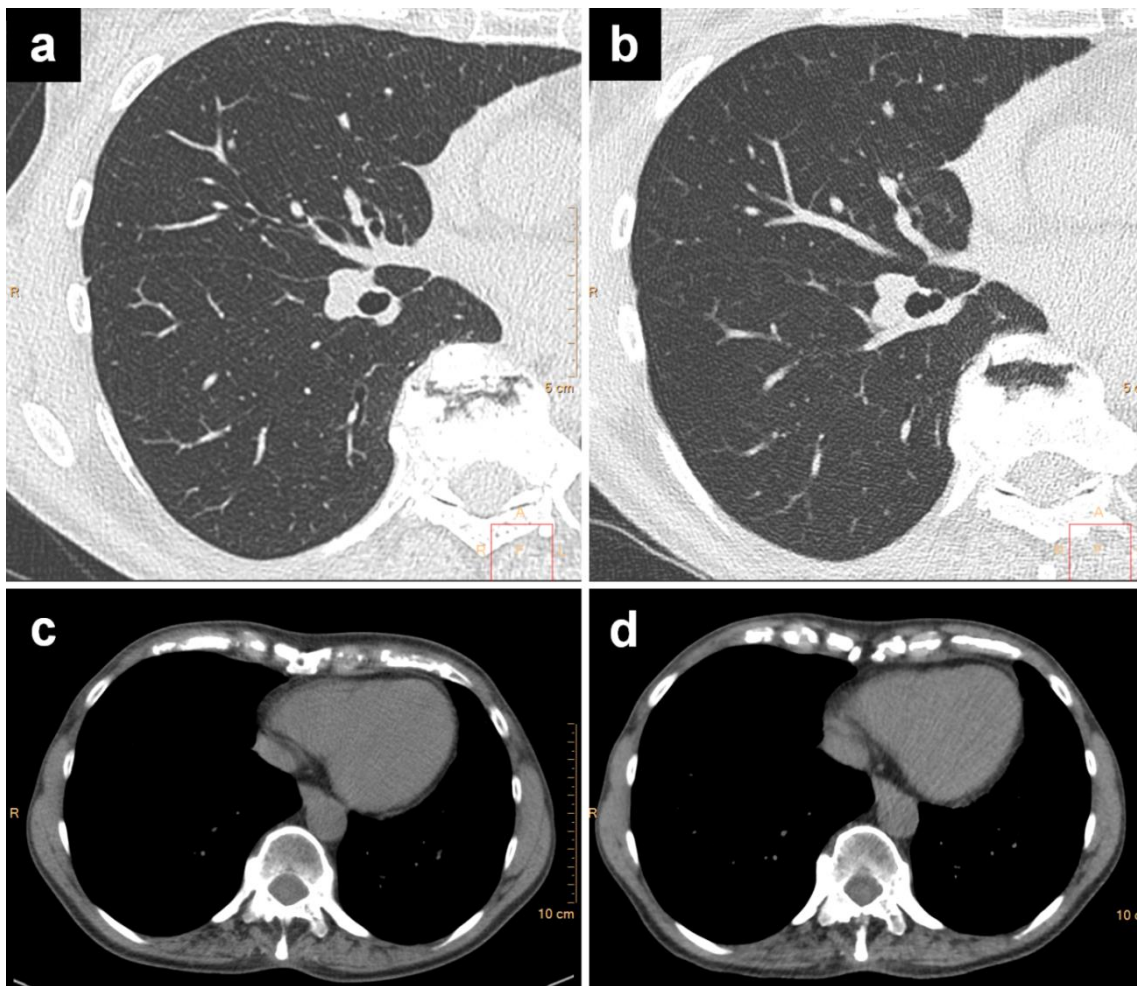
**Obr. kvalita - mediastinum**



**Obr. kvalita - parenchym**



**Obrázek 11:** Objektivní (horní řada) a subjektivní (dolní řada) hodnocení obrazové kvality v mediastinální (levý sloupec) a HRCT rekonstrukci (pravý sloupec) (Lambert et al., 2015).



**Obrázek 12:** Srovnání obrazové kvality v HRCT rekonstrukci (nahore) a mediastinální rekonstrukce (dole) u téhož pacienta v rozmezí 3,5 měsíce provedené na přístroji SE (vlevo) a iCT (vpravo) ukazuje minimální rozdíly ačkoliv radiační zátěž byla u vyšetření na SE 1,75 krát vyšší (Lambert et al., 2015).

#### 4.4 Diskuse

Hlavním zjištěním této práce bylo, že rozdíl v radiační zátěži při stejném vyšetření na různých přístrojích v rámci jedné kliniky může být až 2,6 násobný při zachování obrazové kvality. Radiační zátěž u iCT se svou hodnotou blížila radiační zátěži, kterou uváděly multicentrické studie zaměřené pouze na detekci plicních uzlů (National Lung Screening Trial Research Team et al., 2011; Oudkerk & Heuvelmans, 2013).

Rozdíly však nejsou dány pouze technickými možnostmi přístrojů, ale optimalizací vyšetření a pravděpodobně i místními zvyklostmi. Standardní protokoly dodávané s CT přístrojem jsou z principu nastaveny tak, aby obrazová kvalita byla nadstandardní, lepší než je potřeba. Iterativní rekonstrukce, která vylepšuje kvalitu obrazu při zachování jeho rozlišení, byla dostupná na přístrojích iCT i SD, nicméně používaná pouze na prvním z nich. Obrazy vytvořené pomocí iterativní rekonstrukce však mohou mít lehce pozměněnou texturu a působit tak „nepřirozeným“ dojmem, a proto jsou zpočátku subjektivně hodnoceny hůře, ačkoliv mají objektivně lepší parametry (Pickhardt et al., 2012).

Jak se ukazuje, radiační zátěž u CT hrudníku určeného ke screeningu plicní rakoviny a vyhledávání plicních uzlů lze řádově snížit až na hodnoty skiagrafického (rentgenového) vyšetření ve dvou projekcích při použití speciálních technologií, jako je iterativní rekonstrukce a přídatná cínová filtrace primárního svazku (McCollough et al., 2009; Gordic et al., 2014).

Je překvapivé, že ačkoliv se radiační hygieně věnuje značná pozornost, nejsou rozdíly v radiační zátěži u srovnatelných vyšetření mezi jednotlivými pracovišti běžně dostupné tak, aby si pacient mohl informovaně vybrat. Zařízení, která by investovala do redukce radiační zátěže, by tak mohla svou investici zhodnotit (Lambert et al., 2015).

#### **4.5 Závěr**

V této práci jsme ukázali, že rozdíl v radiační zátěži při stejném vyšetření na různých přístrojích v rámci jedné kliniky může být až 2,6 násobný při zachování obrazové kvality. Radiační zátěž u iCT se svou hodnotou blížila radiační zátěži, kterou uváděly multicentrické studie zaměřené pouze na detekci plicních uzlů. V současné době však informace o rozdílech v radiační zátěži u srovnatelných vyšetření mezi jednotlivými pracovišti nejsou běžně dostupné tak, aby si pacient mohl informovaně vybrat.

## 5 Závěr

V předkládané práci se zabýváme moderními postupy a novými diagnostickými metodami v bronchologii a časné diagnostice bronchogenního karcinomu a prekancerózních lézí.

První část práce se zabývá hodnocením lokálních změn teploty na bronchiální sliznici pomocí termobronchoskopie. V prezentované pilotní studii jsme prokázali statisticky významný rozdíl teploty na endoluminálním povrchu bronchu jak v oblasti nádoru, tak i nad nádorově infiltrovanými uzlinami v porovnání se zdravou sliznicí jak ipsilaterálně tak i kontralaterálně měřené kontaktní metodou. Předpokládáme, že rozdíly teplot lze využít k usnadnění vyhledávání nádorových lézí bronchiálního stromu a oblastí nad patologicky infiltrovanými uzlinami ke snadnějšímu cílení bioptického vyšetření. Bude však nutné zdokonalit techniku měření, tak aby byla k dispozici za dostupnou cenou, měření bylo prováděno bezkontaktně s vytvářením barevné mapy superponované s nativním endobronchiálním obrazem.

V druhé části práce jsme zkonstruovali jednoduché zařízení pro spektroskopii bronchiální sliznice v blízkém infračerveném pásmu a identifikovali charakteristiky pro lokalizaci solitárního plicního uzle za účelem provedení jeho transbronchiální biopsie. Prokázali jsme, že použití tohoto systému a daných charakteristik zvyšuje počet pozitivních bioptických nálezů v porovnání s použitím endobronchiálního ultrazvuku. Jednoduché zařízení, které jsme zkonstruovali, či jeho modifikace by se dala snadno začlenit do vyšetřovacích algoritmů transbronchiálních biopsií.

V třetí části práce diskutujeme další techniky časné diagnostiky bronchogenního karcinomu, jako je endobronchiální ultrasonografie, optická koherenční tomografie, konfokální fluorescenční mikroendoskopie, reflektanční spektroskopie, autofluorescenční bronchoskopie, fluorescenční bronchoskopie a zobrazení v úzkém pásmu (narrow band imaging), a stručně uvádíme naše zkušenosti s některými z nich v rámci provedených pilotních projektů.

Ve čtvrté části práce jsme porovnali koncentrace kyseliny octové ve vydechovaném vzduchu u pacientů s prokázaným gastroezofageální refluxní chorobou a u zdravých dobrovolníků. Výsledky této práce ukazují, že koncentrace kyseliny octové ve vydechovaném vzduchu je slibným biomarkerem k neinvazivní identifikaci pacientů se symptomatickým kyselým gastroezofageálním refluxem.

Poslední část práce se věnuje srovnání radiační zátěže a obrazové kvality při HRCT plic, které je nedílnou součástí metod používaných v bronchologii, mezi přístroji v rámci jednoho zdravotnického zařízení. Ukázali jsme, že rozdíl v radiační zátěži při stejném vyšetření na různých přístrojích v rámci jedné kliniky může být až 2,6 násobný při zachování obrazové kvality. U přístroje s nejnižší radiační zátěží se její úroveň blížila hodnotám, které uváděly multicentrické studie zaměřené pouze na detekci plicních uzlů. V současné době však informace o rozdílech v radiační zátěži u srovnatelných vyšetření mezi jednotlivými pracovišti nejsou běžně dostupné tak, aby si pacient mohl informovaně vybrat.

## **6 Poděkování**

Děkuji školiteli a recenzentům za jejich trpělivost a vlídné rady.

Doc. P. Dundrovi děkuji za pomoc s dodáním histologické dokumentace.

MUDr. L. Lambertovi za pomoc s utříděním práce a velkou řadu faktických korekcí.

## 7 Literatura

- Anderson JC., Babb AL., Hlastala MP. 2003. Modeling Soluble Gas Exchange in the Airways and Alveoli. *Annals of Biomedical Engineering* 31:1402–1422. DOI: 10.1114/1.1630600.
- Beamis JF. 2005. Interventional pulmonology techniques for treating malignant large airway obstruction: an update. *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 11:292–295.
- Bewig B., Haacke TC., Tiroke A., Bastian A., Böttcher H., Hirt SW., Rautenberg P., Haverich A. 2000. Detection of CMV pneumonitis after lung transplantation using PCR of DNA from bronchoalveolar lavage cells. *Respiration; International Review of Thoracic Diseases* 67:166–172. DOI: 29481.
- Brambilla E., Travis WD., Colby TV., Corrin B., Shimosato Y. 2001. The new World Health Organization classification of lung tumours. *The European Respiratory Journal* 18:1059–1068.
- Burt JR., Iribarren C., Fair JM., Norton LC., Mahboubia M., Rubin GD., Hlatky MA., Go AS., Fortmann SP., Atherosclerotic Disease, Vascular Function, and Genetic Epidemiology (ADVANCE) Study 2008. Incidental findings on cardiac multidetector row computed tomography among healthy older adults: prevalence and clinical correlates. *Archives of Internal Medicine* 168:756–761. DOI: 10.1001/archinte.168.7.756.
- Cronin P., Dwamena BA., Kelly AM., Carlos RC. 2008. Solitary pulmonary nodules: meta-analytic comparison of cross-sectional imaging modalities for diagnosis of malignancy. *Radiology* 246:772–782. DOI: 10.1148/radiol.2463062148.
- van der Drift MA., van der Wilt G-J., Thunnissen FBJM., Janssen JP. 2005. A prospective study of the timing and cost-effectiveness of bronchial washing during bronchoscopy for pulmonary malignant tumors. *Chest* 128:394–400. DOI: 10.1378/chest.128.1.394.
- Effros RM., Casaburi R., Su J., Dunning M., Torday J., Biller J., Shaker R. 2006. The effects of volatile salivary acids and bases on exhaled breath condensate pH.



- American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 173:386–392.  
DOI: 10.1164/rccm.200507-1059OC.
- Franklin WA. 2004. Premalignant evolution of lung cancer\*: Gilles f. filley lecture.  
*Chest* 125:90S–94S. DOI: 10.1378/chest.125.5\_suppl.90S.
- Friebel M., Helfmann J., Netz U., Meinke M. 2009. Influence of oxygen saturation on the optical scattering properties of human red blood cells in the spectral range 250to2000nm. *Journal of Biomedical Optics* 14:34001-34001–6. DOI: 10.1117/1.3127200.
- Fritscher-Ravens A., Soehendra N., Schirrow L., Sriram PV., Meyer A., Hauber HP., Pforte A. 2000. Role of transesophageal endosonography-guided fine-needle aspiration in the diagnosis of lung cancer. *Chest* 117:339–345.
- Gildea TR., Mazzone PJ., Karnak D., Meziane M., Mehta AC. 2006. Electromagnetic navigation diagnostic bronchoscopy: a prospective study. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 174:982–989. DOI: 10.1164/rccm.200603-344OC.
- Gordic S., Morsbach F., Schmidt B., Allmendinger T., Flohr T., Husarik D., Baumüller S., Raupach R., Stolzmann P., Leschka S., Frauenfelder T., Alkadhi H. 2014. Ultralow-dose chest computed tomography for pulmonary nodule detection: first performance evaluation of single energy scanning with spectral shaping. *Investigative Radiology* 49:465–473. DOI: 10.1097/RLI.0000000000000037.
- Harrow EM., Abi-Saleh W., Blum J., Harkin T., Gasparini S., Addrizzo-Harris DJ., Arroliga AC., Wight G., Mehta AC. 2000. The utility of transbronchial needle aspiration in the staging of bronchogenic carcinoma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 161:601–607. DOI: 10.1164/ajrccm.161.2.9902040.
- Häussinger K., Becker H., Stanzel F., Kreuzer A., Schmidt B., Strausz J., Cavaliere S., Herth F., Kohlhäufel M., Müller K-M., Huber R-M., Pichlmeier U., Bolliger CT. 2005. Autofluorescence bronchoscopy with white light bronchoscopy compared with white light bronchoscopy alone for the detection of precancerous lesions: a

- European randomised controlled multicentre trial. *Thorax* 60:496–503. DOI: 10.1136/thx.2005.041475.
- Herth F., Becker HD. 2001. New aspects in early detection and local staging of early lung cancer. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)* 34 Suppl 3:S7-11.
- Hirsch FR., Franklin WA., Gazdar AF., Bunn PA. 2001. Early Detection of Lung Cancer: Clinical Perspectives of Recent Advances in Biology and Radiology. *Clinical Cancer Research* 7:5–22.
- Holt D., Okusanya O., Judy R., Venegas O., Jiang J., DeJesus E., Eruslanov E., Quatromoni J., Bhojnarwala P., Deshpande C., Albelda S., Nie S., Singhal S. 2014. Intraoperative Near-Infrared Imaging Can Distinguish Cancer from Normal Tissue but Not Inflammation. *PLOS ONE* 9:e103342. DOI: 10.1371/journal.pone.0103342.
- Hung J., Lam S., Leriche JC., Palcic B. 1991. Autofluorescence of normal and malignant bronchial tissue. *Lasers in Surgery and Medicine* 11:99–105. DOI: 10.1002/lsm.1900110203.
- Hung RJ., McKay JD., Gaborieau V., Boffetta P., Hashibe M., Zaridze D., Mukeria A., Szeszenia-Dabrowska N., Lissowska J., Rudnai P., Fabianova E., Mates D., Bencko V., Foretova L., Janout V., Chen C., Goodman G., Field JK., Liloglou T., Xinarianos G., Cassidy A., McLaughlin J., Liu G., Narod S., Krokan HE., Skorpen F., Elvestad MB., Hveem K., Vatten L., Linseisen J., Clavel-Chapelon F., Vineis P., Bueno-de-Mesquita HB., Lund E., Martinez C., Bingham S., Rasmuson T., Hainaut P., Riboli E., Ahrens W., Benhamou S., Lagiou P., Trichopoulos D., Holcátová I., Merletti F., Kjaerheim K., Agudo A., Macfarlane G., Talamini R., Simonato L., Lowry R., Conway DI., Znaor A., Healy C., Zelenika D., Boland A., Delepine M., Foglio M., Lechner D., Matsuda F., Blanche H., Gut I., Heath S., Lathrop M., Brennan P. 2008. A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25. *Nature* 452:633–637. DOI: 10.1038/nature06885.
- Jaklitsch MT., Jacobson FL., Austin JHM., Field JK., Jett JR., Keshavjee S., MacMahon H., Mulshine JL., Munden RF., Salgia R., Strauss GM., Swanson

- SJ., Travis WD., Sugarbaker DJ. 2012. The American Association for Thoracic Surgery guidelines for lung cancer screening using low-dose computed tomography scans for lung cancer survivors and other high-risk groups. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 144:33–38. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2012.05.060.
- Kiesslich R., Canto MI. 2009. Confocal laser endomicroscopy. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America* 19:261–272. DOI: 10.1016/j.giec.2009.02.007.
- Killian G. 1898. Ueber directe bronchoskopie. *MMW* 27:844–847.
- Lam DC-L., Girard L., Ramirez R., Chau W-S., Suen W., Sheridan S., Tin VPC., Chung L., Wong MP., Shay JW., Gazdar AF., Lam W., Minna JD. 2007. Expression of nicotinic acetylcholine receptor subunit genes in non-small-cell lung cancer reveals differences between smokers and nonsmokers. *Cancer Research* 67:4638–4647. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4628.
- Lambert L., Šimáková L., Kuchyňka P., Daneš J. 2014. Extrakardiální nálezy u CT srdce. *Česká radiologie : časopis Radiologické společnosti = Czech radiology* 68:191–194.
- Lambert L., Šimáková L., Lambertová A., Matras P., Vobruba J., Hořejš J. 2015. Srovnání radiační zátěže a obrazové kvality při HRCT vyšetření plic mezi přístroji na jednom pracovišti. *Česká radiologie : časopis Radiologické společnosti = Czech radiology* 69:187–193.
- Manser R., Lethaby A., Irving LB., Stone C., Byrnes G., Abramson MJ., Campbell D. 2013. Screening for lung cancer. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 6:CD001991. DOI: 10.1002/14651858.CD001991.pub3.
- McCullough CH., Primak AN., Braun N., Kofler J., Yu L., Christner J. 2009. Strategies for Reducing Radiation Dose in CT. *Radiologic clinics of North America* 47:27–40. DOI: 10.1016/j.rcl.2008.10.006.
- van der Molen AJ., Schilham A., Stoop P., Prokop M., Geleijns J. 2013. A national survey on radiation dose in CT in The Netherlands. *Insights into Imaging* 4:383–390. DOI: 10.1007/s13244-013-0253-9.

- National Lung Screening Trial Research Team, Aberle DR., Adams AM., Berg CD., Black WC., Clapp JD., Fagerstrom RM., Gareen IF., Gatsonis C., Marcus PM., Sicks JD. 2011. Reduced lung-cancer mortality with low-dose computed tomographic screening. *The New England Journal of Medicine* 365:395–409. DOI: 10.1056/NEJMoa1102873.
- Ng EY-K. 2009. A review of thermography as promising non-invasive detection modality for breast tumor. *International Journal of Thermal Sciences* 48:849–859. DOI: 10.1016/j.ijthermalsci.2008.06.015.
- Ost D., Fein AM., Feinsilver SH. 2003. Clinical practice. The solitary pulmonary nodule. *The New England Journal of Medicine* 348:2535–2542. DOI: 10.1056/NEJMcp012290.
- Oudkerk M., Heuvelmans MA. 2013. Screening for lung cancer by imaging: the Nelson study. *JBR-BTR: organe de la Société royale belge de radiologie (SRBR) = orgaan van de Koninklijke Belgische Vereniging voor Radiologie (KBVR)* 96:163–166.
- Pickhardt PJ., Lubner MG., Kim DH., Tang J., Ruma JA., del Rio AM., Chen G-H. 2012. Abdominal CT with model-based iterative reconstruction (MBIR): initial results of a prospective trial comparing ultralow-dose with standard-dose imaging. *AJR. American journal of roentgenology* 199:1266–1274. DOI: 10.2214/AJR.12.9382.
- Prosch H., Studnicka M., Eisenhuber E., Olschewski H., Stiefsohn E., Hartl S., Herold C., Burghuber O., Mostbeck G., Vorstände der Österreichischen Röntgengesellschaft, Gesellschaft für Medizinische Radiologie und Nuklearmedizin und der Österreichischen Gesellschaft für Pneumologie, Austrian Society of Radiology, Austrian Society of Pneumology 2013. [Opinion of the Austrian Society of Radiology and the Austrian Society of Pneumology]. *Wiener Klinische Wochenschrift* 125:339–345. DOI: 10.1007/s00508-013-0356-9.
- Pysanencko A., Španěl P., Smith D. 2009. Analysis of the isobaric compounds propanol, acetic acid and methyl formate in humid air and breath by selected ion flow tube

- mass spectrometry, SIFT-MS. *International Journal of Mass Spectrometry* 285:42–48. DOI: 10.1016/j.ijms.2009.04.002.
- Salaün M., Sesboüé R., Moreno-Swirc S., Metayer J., Bota S., Bourguignon J., Thiberville L. 2008. Molecular predictive factors for progression of high-grade preinvasive bronchial lesions. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 177:880–886. DOI: 10.1164/rccm.200704-598OC.
- Shibuya K., Hoshino H., Chiyo M., Iyoda A., Yoshida S., Sekine Y., Iizasa T., Saitoh Y., Baba M., Hiroshima K., Ohwada H., Fujisawa T. 2003. High magnification bronchovideoscopy combined with narrow band imaging could detect capillary loops of angiogenic squamous dysplasia in heavy smokers at high risk for lung cancer. *Thorax* 58:989–995.
- Simone CB., Friedberg JS., Glatstein E., Stevenson JP., Sterman DH., Hahn SM., Cengel KA. 2012. Photodynamic therapy for the treatment of non-small cell lung cancer. *Journal of Thoracic Disease* 4:63–75. DOI: 10.3978/j.issn.2072-1439.2011.11.05.
- Smith GD. 2009. Smoking and lung cancer: causality, Cornfield and an early observational meta-analysis. *International Journal of Epidemiology* 38:1169–1171. DOI: 10.1093/ije/dyp317.
- Španěl P., Dryahina K., Smith D. 2013. A quantitative study of the influence of inhaled compounds on their concentrations in exhaled breath. *Journal of Breath Research* 7:17106. DOI: 10.1088/1752-7155/7/1/017106.
- Spanel P., Smith D. 2013. Advances in On-line Absolute Trace Gas Analysis by SIFT-MS. *Current Analytical Chemistry* 9:525–539.
- Spira A., Beane JE., Shah V., Steiling K., Liu G., Schembri F., Gilman S., Dumas Y-M., Calner P., Sebastiani P., Sridhar S., Beamis J., Lamb C., Anderson T., Gerry N., Keane J., Lenburg ME., Brody JS. 2007. Airway epithelial gene expression in the diagnostic evaluation of smokers with suspect lung cancer. *Nature Medicine* 13:361–366. DOI: 10.1038/nm1556.

- The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection. ICRP publication 103 2007. *Annals of the ICRP* 37:1–332. DOI: 10.1016/j.icrp.2007.10.003.
- Tollinger CD., Vreman HJ., Weiner MW. 1979. Measurement of acetate in human blood by gas chromatography: effects of sample preparation, feeding, and various diseases. *Clinical Chemistry* 25:1787–1790.
- Votruba J., Bruha T., Javorsky S., Zavadil J., Kostka F. 2007. Discriminating value of three bronchoscopic techniques-autofluorescence bronchoscopy, autofluorescence spectroscopy and narrow band imaging: C4-04. *Journal of Thoracic Oncology* 2:S369–S370.
- Votruba J., Zemanov&#xe1., Petra., Lambert L., Vesela MM., Votruba J., Zemanov&#xe1., Petra., Lambert L., Vesela MM. 2015. The Role of Airway and Endobronchial Ultrasound in Perioperative Medicine, The Role of Airway and Endobronchial Ultrasound in Perioperative Medicine. *BioMed Research International*, *BioMed Research International* 2015, 2015:e754626. DOI: 10.1155/2015/754626, 10.1155/2015/754626.
- Votruba J., Brůha T. 2005. Measurement of Endobronchial Temperature in the Diagnosis of... : *Journal of Bronchology & Interventional Pulmonology*. *Journal of Bronchology and Interventional Pulmonology* 12:6–8.
- Votruba J., Brůha T., Baláž T. 2015. Bronchoscopic Diagnosis of Solitary Pulmonary Nodules with the Use of NIR Spectroscopy. *Advances in Chemical Engineering and Science* 5:490. DOI: 10.4236/aces.2015.54051.
- Votruba J., Šťastný B. 2000. Autofluorescenční bronchoskopie a časná diagnostika bronchogenního karcinomu. *Endoskopie* 9:47–51.
- Wahidi MM., Govert JA., Goudar RK., Gould MK., McCrory DC., American College of Chest Physicians 2007. Evidence for the treatment of patients with pulmonary nodules: when is it lung cancer?: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* 132:94S–107S. DOI: 10.1378/chest.07-1352.
- Wasswa-Kintu S., Gan WQ., Man SFP., Pare PD., Sin DD. 2005. Relationship between reduced forced expiratory volume in one second and the risk of lung cancer: a

- systematic review and meta-analysis. *Thorax* 60:570–575. DOI: 10.1136/thx.2004.037135.
- Wolf M., Ferrari M., Quaresima V. 2007. Progress of near-infrared spectroscopy and topography for brain and muscle clinical applications. *Journal of Biomedical Optics* 12:62104. DOI: 10.1117/1.2804899.
- Yamada N., Yamazaki K., Kurimoto N., Asahina H., Kikuchi E., Shinagawa N., Oizumi S., Nishimura M. 2007. Factors related to diagnostic yield of transbronchial biopsy using endobronchial ultrasonography with a guide sheath in small peripheral pulmonary lesions. *Chest* 132:603–608. DOI: 10.1378/chest.07-0637.
- Zaric B., Perin B., Becker HD., Herth FF., Eberhardt R., Jovanovic S., Orlic T., Panjkovic M., Zvezdin B., Jovelic A., Bijelovic M., Jurisic V., Antonic M. 2011. Combination of narrow band imaging (NBI) and autofluorescence imaging (AFI) videobronchoscopy in endoscopic assessment of lung cancer extension. *Medical Oncology* 29:1638–1642. DOI: 10.1007/s12032-011-0038-2.
- Zaric B., Perin B., Stojic V., Carapic V., Matijasevic J., Andrijevic I., Eri Z. 2013. Detection of premalignant bronchial lesions can be significantly improved by combination of advanced bronchoscopic imaging techniques. *Annals of Thoracic Medicine* 8:93–98. DOI: 10.4103/1817-1737.109820.
- Zöchbauer-Müller S., Lam S., Toyooka S., Virmani AK., Toyooka KO., Seidl S., Minna JD., Gazdar AF. 2003. Aberrant methylation of multiple genes in the upper aerodigestive tract epithelium of heavy smokers. *International Journal of Cancer* 107:612–616. DOI: 10.1002/ijc.11458.