

**Univerzita Karlova**  
**1. lékařská fakulta**

Autoreferát disertační práce



**UNIVERZITA KARLOVA**  
**1. lékařská fakulta**

Imunohistochemické a molekulárně-genetické markery  
v predikci progresu neoplazií jícnu v korelaci s patofyziologií

Immunohistochemical and molecular-genetic markers  
in predicting the progression of esophageal neoplasia  
in correlation with pathophysiology

Marek Kollár

2022

**Doktorské studijní programy v biomedicině**  
*Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky*

Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

Předseda oborové rady: prof. MUDr. Otomar Kittnar, CSc., MBA

Školící pracoviště: Institut klinické a experimentální medicíny, Praha

Školitel: prof. MUDr. Jan Martínek, Ph.D., AGAF

Konzultant: -

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

## Obsah

<b>Abstrakt .....</b>	<b>4</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>5</b>
<b>Zkratky .....</b>	<b>6</b>
<b>1 Úvod.....</b>	<b>7</b>
<b>2 Hypotézy .....</b>	<b>8</b>
<b>Cíle práce.....</b>	<b>8</b>
<b>3 Materiál a metodika .....</b>	<b>9</b>
3.1 1. PROJEKT - SROVNÁNÍ ENDOSKOPICKÉ A CHIRURGICKÉ LEČBY PACIENTŮ S „HIGH-RISK“ ČASNÝM KARCINOMEM JÍCNU A DETAILNÍ ANALÝZA UZLINOVÝCH METASTÁZ A MIKROMETASTÁZ.....	9
3.2 2. PROJEKT - VÝZNAM IMUNOHISTOCHEMIE P53 V DIAGNOSTICE LÉZÍ JÍCNU .....	9
3.3 3. PROJEKT - KONFOKÁLNÍ LASEROVÁ ENDOMIKROSKOPIE V DIAGNOSTICE LÉZÍ JÍCNU A ŽALUDKU10	
3.4 4. PROJEKT - KONFOKÁLNÍ LASEROVÁ ENDOMIKROSKOPIE VS. BIOPSIE V DIAGNOSTICE PERZISTENTNÍ / REKURENTNÍ INTESTINÁLNÍ METAPLAZIE U PACIENTŮ PO LÉČBĚ BARRETT'S OESOPHAGUS RELATED NEOPLASIA .....	10
<b>4 Výsledky.....</b>	<b>11</b>
4.1 1. PROJEKT.....	11
4.2 2. PROJEKT.....	13
4.3 3. PROJEKT.....	14
4.4 4. PROJEKT.....	15
<b>5 Diskuse.....</b>	<b>15</b>
5.1 1. PROJEKT.....	15
5.2 2. PROJEKT.....	18
5.3 3. PROJEKT.....	19
5.4 4. PROJEKT.....	20
<b>6 Závěry .....</b>	<b>21</b>
6.1 1. PROJEKT.....	21
6.2 2. PROJEKT.....	21
6.3 3. PROJEKT.....	21
6.4 4. PROJEKT.....	21
<b>7 Použitá literatura.....</b>	<b>22</b>
<b>8 Seznam publikací.....</b>	<b>24</b>

## Abstrakt

**Úvod:** Karcinom jícnu představuje celosvětově osmou nejčastější malignitu. Dva nejčastější typy jsou adenokarcinom a spinocelulární karcinom. Správná histopatologická diagnóza, staging a určení prediktivních rizikových markerů v progresi jsou klíčové pro vývoj nemoci, osud a management pacienta. Endoskopickou resekci lze považovat za kurativní léčbu v případech R0 resekce karcinomu se slizniční invazí nebo s invazí do horní třetiny submukózy. Pacienti s pokročilejšími karcinomy jsou referováni k chirurgické, případně onkologické terapii. Zlatým standardem v diagnostice je histopatologie, častokrát s využitím imunohistochemie, například s průkazem mutace genu p53, který hraje důležitou roli v patogenezi progresse lézí jícnu. Velký význam mají také nové diagnostické metody, mezi které například patří konfokální laserová endomikroskopie (CLE). Neméně důležité je sledování pacientů i po endoskopické léčbě s cílem včasného a spolehlivého odhalení perzistentní/rekurentní léze.

**Cíle, metody a pacienti:** V práci jsou celkově zpracovány čtyři samostatné, na sebe částečně navazující projekty, s parciálním překryvem pacientů. Cíle jednotlivých projektů byly: 1) Stanovit prediktivní markery progresse karcinomu jícnu, riziko metastázování a generalizace a porovnat efektivitu endoskopické a chirurgické terapie u 65 pacientů s „vysoce rizikovým“ časným karcinomem jícnu. 2) U 87 pacientů s lézí jícnu zkoumat imunohistochemický marker p53 a jeho význam v diagnostice. 3) U 65 pacientů se 74 viditelnými lézemi jícnu/žaludku srovnat diagnostickou přesnost standardních biopsií a nového principu diagnostiky („virtuální histologie“ – konfokální laserová endomikroskopie). 4) Porovnat CLE s biopsiemi v detekci perzistentní/rekurentní intestinální metaplázie a neoplazie sliznice jícnu u 56 pacientů.

**Výsledky:** 1) Jediným statisticky významným prognostickým faktorem generalizace a postižení lymfatických uzlin byla pozitivní invaze do krevních či lymfatických cév. Celkem 80 % endoskopicky léčených pacientů dosáhlo kompletní remise. Dlouhodobé remise bylo dosaženo u 62,9 % pacientů léčených endoskopicky. 2) Imunohistochemický průkaz p53 byl diagnostický v 73 % v diagnostice dysplastických lézí a 100 % adenokarcinomů mělo mutovaný fenotyp. 3) Diagnostická přesnost k potvrzení nebo vyloučení maligní léze byla 85 % u biopsií a 89 % u CLE. 4) Biopsie detekovaly intestinální metaplazii po endoskopické terapii v 94,6 % a u CLE ve 100 %. Diagnostická shoda mezi CLE a biopsiemi byla 94,6 %.

**Závěry:** 1) Invaze karcinomu do lymfatických a krevních cév se jeví jako nejvýznamnější rizikový faktor v predikci progresse karcinomu jícnu. Endoskopická terapie by mohla být vhodnou alternativou k ezofagektomii i u pacientů s pokročilejšími časnými neoplazemi jícnu. 2) Imunohistochemický průkaz p53 je vhodnou pomocnou metodou v odlišení dysplastických lézí od nedysplastických. 3) CLE je porovnatelná s biopsiemi v diagnostice lézí jícnu a žaludku a mohla by být uznána jako standardní metoda v této indikaci. 4) CLE je srovnatelně přesná jako standardní biopsie v diagnostice perzistující/recidivující intestinální metaplázie a při vyloučení recidivující neoplazie. Výhodou CLE ve

všech indikacích (3., 4.) oproti biopsiím je možnost vyšetření podstatně větší plochy a hodnocení v reálném čase v průběhu endoskopie i vyškoleným gastroenterologem bez účasti patologa.

## Abstract

**Introduction:** Esophageal cancer ranks eighth among the most common malignancies worldwide. The two most common types are adenocarcinoma and spinocellular carcinoma. Correct histopathological diagnosis, cancer staging and identification of predictive risk factors of progression are important in terms of further disease course and management. While patients with mucosal carcinoma without risk factors are treated endoscopically, those with submucosal invasion or mucosal carcinoma with risk factors are referred for surgical therapy according to current recommendations. Histopathology is still considered the gold standard in diagnosis, often used in conjunction with immunohistochemistry, e.g., to document a *TP53* gene mutation, which plays an important role in the pathogenesis and progression of esophageal dysplasia. New diagnostic methods, such as confocal laser endomicroscopy (CLE), also play an important role. Other crucial factors include patient follow-up, early and reliable detection of persistent or recurrent lesions.

**Aims, methods and patients:** In the thesis, 4 separate, partly connected projects are assessed together, with a partial overlap of patients. The aims of the individual projects were as follows: 1) To identify predictive factors of esophageal cancer progression, risk of metastasis and generalization, and to compare the effectiveness of endoscopic and surgical therapies in 65 patients with "high-risk" early esophageal cancer. 2) p53 as an immunohistochemical marker and its significance were investigated in 87 patients with esophageal lesions. 3) The diagnostic accuracy of standard biopsies and CLE was compared in 65 patients with 74 visible esophageal/gastric lesions. 4) To compare CLE with biopsies in the detection of persistent/recurrent intestinal metaplasia and neoplasia in 56 patients.

**Results:** 1) The only statistically significant prognostic factor of generalization and lymph node metastasis was documented blood or lymphatic vessel invasion. A total of 80 % of endoscopically treated patients achieved complete endoluminal remission. Long-term remission was achieved in 62.9 % of patients. 2) p53 immunohistochemistry was diagnostic in 73 % of dysplastic lesions and 100 % of adenocarcinoma showed an abnormal phenotype. 3) Diagnostic accuracy to confirm or exclude a malignant lesion was 85 % for biopsies and 89 % for CLE. 4) Biopsies detected intestinal metaplasia after endoscopic therapy in 94.6 % and CLE in 100 %. Diagnostic agreement between CLE and biopsies was 94.6 %.

**Conclusions:** 1) Cancer invasion into lymphatic and blood vessels appears to be the most significant risk factor predicting esophageal cancer progression. Patients with mucosal carcinoma without risk factors or with carcinoma invading the upper third of the submucosa could be treated endoscopically, and the criteria limit could be shifted in these indications. 2) Immunohistochemical detection of p53 is

a suitable auxiliary method, especially in differentiating dysplastic and nondysplastic esophageal lesions. 3) CLE is comparable to standard biopsies in overall diagnostic accuracy in esophageal and gastric lesions and could be recognized as a standard method in this indication. 4) The accuracy of CLE in diagnosing persistent/recurrent intestinal metaplasia and in excluding recurrent neoplasia is comparable to that of standard biopsy. Compared to biopsy, the advantage of CLE in both indications (3rd, 4th) is examination of a significantly larger area and real-time evaluation during endoscopy even by a trained gastroenterologist without the participation of a pathologist.

## Zkratky

A+	angioinvaze, invaze do lymfatických cév
AC	adenokarcinom
BJ	Barrettův jícen
BORN	Barrett's Oesophagus Related Neoplasia
CER	complete endoscopic remission, kompletní endoskopická remise
CRN	complete remission of neoplasia, kompletní remise neoplazie
ER	endoskopická resekce
ESD	endoskopická submukózní disekce
HGD	high-grade dysplazie, dysplazie vysokého stupně
IHC	imunohistochemie
IM	intestinální metaplazie
L+	lymfangioinvaze, invaze do lymfatických cév
LGD	low-grade dysplazie, dysplazie nízkého stupně
LU	lymfatická uzlina, lymfatické uzliny
pCLE	probe-based konfokální laserová endomikroskopie
SCC	spinocelulární karcinom
sm	submukóza
TCD	tumor cell dissociation, disociace nádorových buněk

# 1 Úvod

Karcinom jícnu představuje v současnosti celosvětově osmou nejčastější malignitu (2020). V Evropě je jeho roční incidence 4,5 případů/100 000 obyvatel/rok (Zhang Y., 2013). Dvě nejčastější jednotky jsou adenokarcinom (AC) a dlaždicobuněčný (spinocelulární) karcinom jícnu (SCC), které dohromady tvoří více než 95 % všech malignit jícnu.

Prekancerózou adenokarcinomu je Barrettův jícen (BJ), který definujeme jako náhradu dlaždicového epitelu jícnu epitelem cylindrickým s intestinální metaplazií (IM) v endoskopicky viditelném segmentu v minimální délce 1 cm v oblasti nad gastroezofageální junkcí (Martinek J. et al., 2013). Ke vzniku BJ dochází v důsledku gastroezofageálního refluxu v distální části jícnu, což má za následek vznik chronického zánětu a metaplastických změn. a lze jej detekovat u 10-15 % pacientů s refluxní chorobou jícnu (Bhat S. et al., 2011). BJ je asociovaný se zvýšeným rizikem vzniku AC jícnu s roční incidencí 0,12–0,2 % u pacientů bez průkazu dysplastických změn (Martinek J. et al., 2008) (Bhat S. et al., 2011). U pacientů s potvrzenou low-grade dysplazií (LGD) je riziko progresu do high-grade dysplazie (HGD) nebo do AC 10–15 % ročně. Pacienti s HGD mají riziko progresu do AC cca 13–25 % ročně. Dysplazie vznikající v terénu BJ se označuje jako „Barrett’s Oesophagus Related Neoplasia (BORN)“. Vzhledem k výše uvedenému jsou pacienti s BJ pravidelně sledováni s cílem časné detekce preneoplastických či neoplastických lézí.

Etiologie SCC je multifaktoriální. Nejčastější rizikové faktory vzniku SCC jsou faktory zevního prostředí, jako abúzus nikotinu a alkoholu, nízký socioekonomický status, konzumace malého množství zeleniny a ovoce, pití horkých nápojů, špatná ústní hygiena či asociace s jinými nemocemi, jako jsou tyloza či achalasia (Engel LS. et al., 2003) (Zendehdel K. et al., 2008) (Salaspuro MP., 2003) (Abnet CC. et al., 2018) (Prabhu A. et al., 2014). SCC může vznikat sekvencí skvamózní LGD → skvamózní HGD → spinocelulární karcinom.

Karcinomy jícnu podle pokročilosti dělíme na časné a pokročilé. Časný karcinom jícnu je definovaný jako karcinom, který prorůstá maximálně do submukózy. Přibližně 20 % všech diagnostikovaných karcinomů jícnu jsou časné karcinomy. K jejich charakteristice patří i absence lymfadenopatie či vzdálených metastáz.

Časný karcinom jícnu se na základě hloubky invaze v histopatologii dále dělí. V případě AC rozdělujeme 4 stupně slizniční invaze: m1 – m4. Invazi AC do submukózy (sm) dělíme na sm1 – sm3. U SCC je situace odlišná, jelikož u SCC nedochází k duplikaci svaloviny jako v případě AC. Slizniční invaze je tedy rozdělena do tří vrstev, m1 – m3. Definice invaze karcinomů do submukózy je v podstatě stejná jako u AC. Hloubka invaze nádoru a pozitivita či negativita regionálních lymfatických uzlin (LU) jsou dva nejdůležitější prognostické faktory. Důležitým faktorem je, že časné karcinomy jícnu lze často léčit i zcela vyléčit endoskopicky, tj. bez nutnosti operace. Endoskopická léčba pro slizniční AC se slizniční a se submukózní (sm1) invazí je uznávanou metodou první volby.

## 2 Hypotézy

1. Riziko metastáz či mikrometastáz do lymfatických uzlin je u pacientů s “high-risk” časným karcinomem jícnu nižší, než se předpokládá, a tudíž by bylo možné rozšířit kritéria indikace endoskopické léčby ve smyslu její kurability.
2. Protein p53 je v určitých indikacích významným imunohistochemickým markerem v diagnostice LGD a v predikci progresu dysplastických změn (= intraepitelových neoplazií) jícnu.
3. Konfokální laserová endomikroskopie může být srovnatelná s tradiční histopatologií v hodnocení (diagnostice) mikroskopické povahy viditelných časných lézí jícnu a žaludku.
4. Konfokální laserová endomikroskopie může být srovnatelná s biopsiemi v diagnostice perzistentní/rekurentní intestinální metaplázie sliznice jícnu a rekurentní neoplázie po předchozí endoskopické léčbě časně neoplázie.

## Cíle práce

1. Hlavním cílem práce je analýza histopatologických rizikových faktorů pokročilosti „high-risk“ časného karcinomu jícnu ve smyslu rizika metastatického i mikrometastatického postižení lymfatických uzlin a rizika generalizace a dále srovnání výsledků endoskopické a chirurgické léčby u těchto pacientů.
2. Stanovit význam imunohistochemického průkazu p53 produktu tumor supresorového genu *TP53* v diagnostice lézí jícnu a stanovení rizika progresu dysplastických změn jícnu.
3. Zhodnotit přínos konfokální laserové endomikroskopie v mikroskopické diagnostice viditelných lézí jícnu a žaludku.
4. Porovnat konfokální laserovou endomikroskopii s biopsiemi v detekci perzistentní/rekurentní intestinální metaplázie sliznice jícnu a rekurentní neoplázie po endoskopické léčbě BORN.



### 3 Materiál a metodika

#### 3.1 1. PROJEKT - SROVNÁNÍ ENDOSKOPICKÉ A CHIRURGICKÉ LEČBY PACIENTŮ S „HIGH-RISK“ ČASNÝM KARCINOMEM JÍCNU A DETAILNÍ ANALÝZA UZLINOVÝCH METASTÁZ A MIKROMETASTÁZ

Monocentrická, retrospektivní analýza prospektivně sbíraných dat. Cílem studie bylo 1) zhodnotit a porovnat dlouhodobé výsledky endoskopické a chirurgické léčby u pacientů s „high-risk“ časnými karcinomy jícnu; 2) zhodnotit riziko generalizace u těchto pacientů; 3) posoudit možné histopatologické prediktory nepříznivého průběhu onemocnění ve snaze o optimalizaci léčebné strategie.

„High-risk“ časný karcinom jícnu byl definován jako adenokarcinom či dlaždicobuněčný karcinom jícnu se submukózní (T1b) invazí nebo se slizniční (T1a) invazí s minimálně jedním rizikovým faktorem. Mezi rizikové faktory patřily nízká diferenciacie nádoru (G3-G4), invaze do krevních (A+) či lymfatických cév (L+) a vysoký stupeň disociace nádorových buněk – TCD3 (nejvyšší stupeň ztráty kohezivity představující izolované nádorové buňky ve stromatu).

Při histopatologickém vyšetření byly karcinomy se submukózní invazí rozděleny podle hloubky invaze do 3 podskupin: sm1, sm2, sm3.

Kompletní endoskopická remise (complete endoscopic remission, CER) byla definována: 1) resekční okraje (horizontální i vertikální) endoskopického resektátu byly bez nádorových struktur (R0 resekce) a během dvou po sobě jdoucích kontrol po výkonu nebyla přítomna žádná reziduální neoplazie makroskopicky a nebyla zastižena ani mikroskopicky po provedení náhodných biopsií; 2) pacienti s pozitivním horizontálním a/nebo vertikálním resekčním okrajem (R1 resekce) po dalším ošetření (endoskopická resekce (ER), endoskopická submukózní disekce (ESD), radiofrekvenční ablace či onkologická léčba) s minimálně 2 po sobě následujícími kontrolami bez makroskopického či histologického průkazu rezidua tumoru. Dlouhodobá remise byla definovaná jako CER trvající alespoň 24 měsíců sledování.

Metastázy v lymfatických uzlinách (LU) byly definovány jako přítomnost maligních struktur > 2 mm; mikrometastázy jako kolekce maligních buněk 0,2-2 mm a izolované nádorové buňky ≤ 0,2 mm.

#### 3.2 2. PROJEKT - VÝZNAM IMUNOHISTOCHEMIE P53 V DIAGNOSTICE LÉZÍ JÍCNU

Prospektivní studie s prospektivním i retrospektivním sběrem dat. Cílem bylo 1) stanovení typu exprese imunohistochemického průkazu (IHC) p53 u benigních, dysplastických i maligních lézí jícnu; 2) význam IHC průkazu p53 v diagnostice lézí jícnu v terénu Barrettova jícnu; 3) stanovení rizika progresu léze v sekvenci nedysplastická sliznice – dysplazie – karcinom.

Do studie byli zařazeni pacienti, u kterých byla na úrovni hematoxylin eosinu nezávisle dvěma patologi jednoznačně potvrzena diagnóza zcela benigní (= bez dysplázie), LGD, HGD či adenokarcinomu. Vyřazovací kritéria byla stanovena takto: nejednoznačná shoda v diagnóze mezi dvěma patologi; známá diagnóza z předchozích biopsií; nedostatečná velikost léze definována nepřítomností stejných struktur v průkazu p53 jako v barvení hematoxylin eosin (léze se “vykrájela”).

U všech lézí (benigní, dysplastické či karcinom) bylo v první linii provedeno standardní histopatologické barvení hematoxylinem eosinem a Alcianovou modří s PAS reakcí, poté byl u nich proveden imunohistochemický průkaz p53 s hnědou koncovkou (Monoclonal Mouse, Anti-Human p53 Protein, Clone DO-7; ředění 400x; DAKO; Santa Clara, CA, USA) za použití imunohistochemického barvicího automatu (Ventana BenchMark ULTRA; Ventana Medical Systems, Inc.; Tucson, AZ, USA). Definitivní diagnóza byla stanovena z hematoxylin eosinu nezávisle dvěma patologi a poté byla provedena, vyhodnocena a korelována imunohistochemie s definitivní diagnózou z hematoxylin eosinu.

### **3.3 3. PROJEKT - KONFOKÁLNÍ LASEROVÁ ENDOMIKROSKOPIE V DIAGNOSTICE LÉZÍ JÍCNU A ŽALUDKU**

Jednalo o monocentrickou, prospektivní, patologem zaslepenou studii porovnávající diagnózu stanovenou z probe-based konfokální laserové endomikroskopie (pCLE) vs. diagnózu na základě standardních biopsií; definitivní diagnóza byla pak stanovena z endoskopického nebo chirurgického resektátu. Studie byla registrována na [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov) pod číslem NCT02922049 (společně s projektem č. 4) a byla schválena Etickou komisí IKEM a Fakultní Thomayerovy nemocnice (FTN). Pacienti zařazení do studie byli vyšetřeni vysoko rozlišovací endoskopií (s narrow band imaging), poté byla u nich provedena pCLE a následoval odběr standardních biopsií. Poté pacienti podstoupili endoskopickou terapii (ER či ESD), chirurgickou terapii, onkologickou terapii nebo nebyli dále léčeni.

K hodnocení všech lézí byly použity validované Miami a Mainz klasifikace. Miami klasifikace byla vyvinuta speciálně pro pCLE k odlišení normálních a patologických stavů v gastrointestinální problematice (Wallace M. et al., 2011). Mainz klasifikace byla sice původně vyvinuta pro starší systém endoscope-based CLE, její klasifikace a znaky je možné použít i pro pCLE (Kiesslich R. et al., 2004).

Primárními výstupy byly celková diagnostická přesnost, senzitivita, specificita, pozitivní a negativní prediktivní hodnota biopsií a pCLE v diagnostice malignity, dysplazie a/nebo benigní léze.

### **3.4 4. PROJEKT - KONFOKÁLNÍ LASEROVÁ ENDOMIKROSKOPIE VS. BIOPSIE V DIAGNOSTICE PERZISTENTNÍ / REKURENTNÍ INTESTINÁLNÍ METAPLAZIE U PACIENTŮ PO LÉČBĚ BARRETT'S OESOPHAGUS RELATED NEOPLASIA**

Monocentrická, prospektivní, patologem zaslepená studie, schválená Etickou komisí IKEM a FTN v červnu 2015 a byla rovněž registrována na [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov) pod číslem NCT02922049

(společně s projektem/studií č. 3). Do studie byli zařazeni pacienti po ukončení úspěšné endoskopické terapie BORN. Endoskopická terapie zahrnovala endoskopické resekční metody (ER či ESD) a ablační metody (RFA), event. jejich kombinaci. Úspěšná léčba BORN byla definovaná jako kompletní makroskopická i mikroskopická eradikace neoplázie (bez viditelného segmentu BJ).

Hlavní sledované parametry studie byly: 1. Porovnat pCLE a biopsie v diagnostice perzistující/recidivující IM a recidivující neoplazie u pacientů po endoskopické léčbě BORN. 2. Posoudit senzitivitu, specifitu, pozitivní a negativní prediktivní hodnotu pCLE při detekci perzistentní/rekurentní IM a neoplazie s ohledem na definitivní diagnózu IM nebo neoplazie před léčbou pacientů. 3. Určit počet žlázek a pohárkových buněk detekovaných pomocí pCLE a standardních biopsií, jelikož pCLE teoreticky disponuje výhodou vyšetření větší oblasti sliznice jícnu v porovnání s odběrem biopsií.

## 4 Výsledky

### 4.1 1. PROJEKT

#### *Výsledky chirurgické léčby*

Celkem 30/65 (46 %) pacientů podstoupilo ezofagektomii s lymfadenektomií. Medián doby od endoskopické resekce do ezofagektomie byl 2 měsíce (rozsah 0–9). Delší interval byl v několika případech způsoben potřebou zlepšit klinický či nutriční stav pacientů před náročným operačním výkonem. Žádnému pacientovi nebyla před operací podána neoadjuvantní terapie.

Komplikace spojené s operací byly pozorovány u 43,3 % (13/30) operovaných pacientů. Tzv. 30denní mortalita související s výkonem představovala 6,7 % (2/30). Jeden z těchto pacientů trpěl syndromem septické zánětlivé odpovědi (SIRS) a druhý pacient zemřel po dehiscenci anastomózy. U dalšího pacienta byl problémem leak v anastomóze, pro který byl několikrát reoperován a zemřel 2 roky po výkonu na komplikace dalších operací. Jeden z pacientů byl reoperován několik dní po ezofagektomii pro chylothorax způsobený iatrogenním poraněním ductus thoracicus. Nejčastější pozdní komplikací po ezofagektomii byla postchirurgická gastroparéza, která se vyskytla u 5 pacientů (16,5 %). Stenóza reziduálního jícnu se vyvinula u dvou pacientů (6,7 %). Dva pacienti byli později odesláni na plastickou chirurgii kvůli rozvoji kýly v jizvě.

Histopatologické vyšetření vzorků z chirurgického resekátu jícnu odhalilo lokální reziduální malignity u 33,3 % (10/30) operovaných pacientů, z toho v pěti případech byla invaze tumoru hlubší než invaze popsána v endoskopickém resekátu. HGD byla popsána u 20 % (6/30) pacientů a LGD u 3,3

% (1/30). Ve 43,3 % (13/30) vzorků nebyla zastižena ložiska karcinomu ani dysplazie, tudíž předchozí endoskopickou resekci/disekci lze považovat za radikální.

Celkem bylo resekováno, kompletně zpracováno a vyhodnoceno 622 LU (obecně platný protokol na vyšetřování sentinelových LU pro jiné orgány). Průměrně bylo vyšetřeno 21 LU/1 pacienta (rozmezí 2–42 LU). Dva pacienti měli metastázy na úrovni světelné mikroskopie ve 2/10 LU respektive v 16/42 LU. Po podrobné analýze mikrometastáz a izolovaných nádorových buněk byli identifikováni další 4 pacienti s pozitivními LU.

#### *Výsledky endoskopické léčby*

U 35 pacientů s “high-risk” časným karcinomem jícnu (35/60) byla operace kontraindikována nebo radikální chirurgický výkon pacienti odmítli. Celkem 12 z 35 pacientů (34 %) léčených endoskopicky zemřelo během sledování. Mortalita související s nádorem byla pozorována u 7 z nich (20 %) a byla přímo spojena s progresí základního onemocnění.

Ve srovnání s chirurgickou terapií nesouviselo žádné z úmrtí pacientů s endoskopickým výkonem. Téměř u poloviny pacientů došlo k mírnému periprocedurálnímu krvácení, u každého z nich však bylo pomocí dostupných endoskopických metod úspěšně dosaženo hemostázy. U jednoho z pacientů se krvácení objevilo několik hodin po výkonu a bylo nutné provádět endoskopickou hemostázu. U jiného pacienta došlo při provádění cirkulární ESD k drobné perforaci, která byla ošetřena klipem.

Počet post-procedurálních komplikací byl u pacientů léčených pouze endoskopickými modalitami relativně nízký. Rozvoj stenózy jícnu jsme zaznamenali u dvou pacientů.

Medián sledování byl 38,5 měsíce (4–88). U 28/35 (80 %) pacientů bylo dosaženo CER. K dosažení CER bylo potřeba průměrně 2,2 sezení (1–7) endoskopické léčby. U 14 (50 %) z těchto pacientů byla radiofrekvenční ablace použita k eradikaci reziduální dysplastické nebo metaplastické sliznice. Čtyři pacienti (14,3 %) podstoupili adjuvantní onkologickou léčbu. U dvou z pacientů s CER byla později diagnostikována lokální recidiva následovaná generalizací onemocnění. U dalších 3 pacientů byla generalizace diagnostikována několik měsíců po dosažení CER. Průměrná doba do recidivy/ generalizace byla 23,5 měsíce (5–38).

Několik pacientů, kteří nedosáhli CER (7/35; 20 %), pokračovalo v paliativní léčbě – především argon-plasma koagulací (2/7; 28,6 %), nebo byli léčeni onkologicky (3/7; 42,9 %). K metastatickému rozsevu došlo v průběhu sledování u 4/7 (57,1 %) těchto pacientů.

Odhadovaná míra 5letého přežití v endoskopické skupině byla 53,1 % (95 % CI: 35,6–79,3), nicméně přežití specifické pro onemocnění bylo 70,8 % (95 % CI: 52,5–95,6).

## *Celkové hodnocení endoskopické a chirurgické léčby*

U pacientů s AC došlo ke generalizaci nebo postižení LU v 18,6 % (9/48) případů, zatímco v případě SCC byla generalizace či postižení uzlin v 35,3 % (6/17) případů;  $p = 0,171$ . Disociace nádorových buněk a grading nádoru nesouvisely s agresivitou nádoru (TCD3:  $p = 0,292$ ; G3-4:  $p = 0,991$ ), stejně jako endoskopické charakteristiky použité v této studii – ložisko nádoru ( $p = 0,65$ ), jeho lokalizaci a velikost ( $p = 0,568$ ). Naopak, invaze do krevních či lymfatických cév vykazovaly statistickou významnost z hlediska možné souvislosti s výskytem generalizace onemocnění (A+:  $p = 0,034$ ; L+:  $p = 0,007$ ).

U jednoho pacienta s T1a invazí u AC došlo k postižení LU zjištěného při analýze mikrometastáz. U dalších 16 pacientů s T1a karcinomem nebyla nalezena generalizace ani postižení LU. Mezi 16 pacienty s invazí sm1 (15x AC, 1x SCC) došlo u 4 pacientů (25 %, všichni s přítomnými dalšími rizikovými faktory) ke generalizaci/postižení LU. Další postižení LU/vzdálené metastázy byly pozorovány u pacientů s touto charakteristikou: 2/10 (20 %) u sm2 invaze (oba SCC), 4/15 (26,7 %) u sm3 AC a 4/7 (57,1 %) u sm3 SCC.

## **4.2 2. PROJEKT**

Celkově bylo vyšetřeno 87 lézí (57 mužů, 30 žen), z toho 43 (49 %) s benigní lézí či BJ (25 mužů, 18 žen), 12 (14 %) s low-grade dysplazií (8 mužů, 4 ženy), 14 (16 %) s high-grade dysplazií (9 mužů, 5 žen) a 18 (21 %) s adenokarcinomem jícnu (15 mužů, 3 ženy).

U 43 benigních lézí bez dysplazie a s BJ byl průkaz p53 u většiny z nich normální, tj. byla prokázána tzv. wild-type exprese v IHC u 40 lézí, (93 %; 40/43). Abnormální/mutovaný obraz byl zastižen u tří lézí (3/43; 7 %), z toho u 1 léze bylo p53 IHC pozitivní a dvě léze byly negativní. U těchto tří pacientů byly léze hodnoceny na základě nálezu v hematoxylin eosinu jako léze bez dysplázie. U 12 lézí s LGD mělo 6 (50 %) wild-type obraz a 6 (50 %) lézí bylo p53 fokálně pozitivní (slaběji ve srovnání s HGD). Žádná léze nebyla negativní.

U 14 lézí s HGD měla 1 (7 %) wild-type obraz a 14 (93 %) lézí mělo mutovaný obraz, všechny byly difúzně blokově silně pozitivní. Žádná léze nebyla negativní.

Adenokarcinom: celkem bylo vyšetřeno 18 AC, všechny měly abnormální obraz, z toho 9 (50 %) bylo negativních a dalších 9 (50 %) bylo pozitivních (2 byly pozitivní ve většině léze a 7 bylo difúzně pozitivních). U žádného AC nebyl nalezen wild-type obraz.

Normální/nemutovaný, tzv. wild-type obraz IHC průkazu p53 byl přítomen celkově u 47 lézí (40x BJ, 6x LGD, 1x HGD, žádná u AC). Abnormální/mutovaný, pozitivní exprese byla u 28 lézí (1x BJ, 6x LGD, 13x HGD a 9x AC), negativní u 11 lézí (2x BJ, 9x AC). Dysplastické léze vykazovaly diagnostický mutovaný obraz v 73 % případů. Přítomnost normálního nemutovaného, wild-type obrazu

se liší mezi jednotlivými lézemi,  $p < 0,0001$ . Výsledky korelace IHC průkazu p53 s definitivní diagnózou stanovenou z hematoxylin eosinu nám ukazují, že průkaz p53 nám může pomoci v odlišení benigních lézí (zánětlivých, regenerativních atypií a jiných) od dysplastických změn, včetně LGD. Benigní léze bez dysplazie se lišily od LGD ( $p = 0,0114$ ), od HGD ( $p < 0,0001$ ) i od AC ( $p < 0,0001$ ). Normální/nemutovaný, wild-type fenotyp mají následovné intervaly spolehlivosti: BJ a nedysplastické léze (95% CI 85–100 %), LGD (95% CI 21–79 %), HGD (95% CI 0–21 %) a AC (95% CI 0–17 %). U lézí BJ, HGD i AC procento abnormálního/mutovaného obrazu nekoreluje s rozmezím intervalem spolehlivosti nemutovaného obrazu, tudíž můžeme říci, že u těchto lézí se liší abnormální od normálního wild-type obrazu.

### 4.3 3. PROJEKT

Celkově bylo do studie zařazeno 67 pacientů, medián 65,4 let (rozmezí 35–84 let), s převahou mužů 77,6 % (52/67). Vyšetřili jsme 74 lézí (53 lézí jícnu a 21 lézí žaludku). Definitivní diagnóza byla stanovena z endoskopického resektátu v 70,2 % případů (52/74 lézí) a z biopsie na základě konsenzu více specializovaných patologů v 28,4 % případů (21/74 lézí). U jednoho pacienta (1,3 %) byla definitivní diagnóza stanovena na základě pCLE (pacient s pokročilým SCC, přičemž ve standardní biopsii byla zachycena pouze nekrotická tkáň).

pCLE diagnóza byla správná v 89,2 % (66/74) a nesprávná v 10,8 % případů (8/74), zatímco diagnóza stanovená na základě klešťové biopsie byla správná v 85 % (57/67) a nesprávná v 15 % případů (10/67);  $p = 0,6$ . Detailní analýza neshod mezi biopsiemi a pCLE je znázorněna v tabulce 14. pCLE potvrdila maligní diagnózu v 88,2 % (30/34), zatímco biopsie ji potvrdily v 75,9 % případů (22/29);  $p = 0,3$ . Dysplastické léze byly správně diagnostikovány pomocí pCLE v 83 % (10/12) a v biopsiích ve 100 % případů (10/10);  $p = 0,48$ . Diagnóza benigních lézí byla správná v 92,8 % (26/28), zatímco v biopsiích v 89,2 % případů (25/28);  $p = 1$ . pCLE umožnila stanovit “správnou” specifickou histopatologickou diagnózu v 90,9 % případů (60/66).

Celková diagnostická přesnost biopsií byla 85 % (95% CI 76–94 %) a pCLE 89 % (95% CI 79–96 %;  $p = 0,9$ ). Senzitivita a specifita v diagnostice maligních lézí byla 88,2 % (95% CI 72–97 %) a 92 % (95% CI 79–98 %) pro pCLE a 75,9 % (95% CI 56–89 %) a 100 % (95% CI 90–100 %) pro biopsie ( $p > 0,3$ ). Pozitivní prediktivní hodnota a negativní prediktivní hodnota k diagnostice (nebo k vyloučení) malignity byly 90,9 % (95% CI 77–97 %) a 90 % (95% CI 78–96 %) pro pCLE a 100 % (95% CI 90–100 %) a 83,3 % (95% CI 72–90 %) pro biopsie ( $p > 0,1$ ). Senzitivita a specifita v diagnostice dysplazie byla 83,3 % (95% CI 81–98 %) a 93,5 % (95% CI 89–100 %) pro pCLE a 100 % (95% CI 91–100 %) a 88,7 % (95% CI 73–93 %) pro biopsie ( $p > 0,2$ ). Definitivně, senzitivita a specifita pro diagnostiku benigní léze byla 92,9 % (95% CI 76,5–99,1 %) a 97,8 % (95% CI 88,5–99,9 %) pro pCLE a 89,3 % (95% CI 72–97,7 %) a 94,9 % (95% CI 83–99,4 %) u biopsií ( $p > 0,2$ ).

#### 4.4 4. PROJEKT

Celkově bylo do studie zařazeno 56 pacientů (8 žen, 48 mužů), z toho u 36 pacientů (64,3 %) nebyla IM detekována v pCLE ani v biopsiích, zatímco 20 pacientů (35,7 %) mělo perzistující či rekurentní IM. pCLE detekovala IM u všech 20 pacientů (100 %), zatímco biopsie u 17 pacientů (85 %). IM nebyla odhalena pomocí biopsií u žádného pacienta, u kterého byla pCLE v hodnocení IM negativní. IM se ve všech případech vyskytla na makroskopicky normální neo-Z linii.

Pouze u jednoho pacienta (1/56; 1,8 %) byla diagnostikována recidivující LGD pomocí pCLE, zatímco histologicky nebyla zastižena. Tento pacient podstoupil úspěšnou terapii re-radiofrekvenční ablací (HALO 60). Porovnat účinnost biopsií a pCLE v diagnostice rekurentní neoplázie nebylo možné, jelikož se nevyskytly další případy recidivy BORN.

Senzitivita, specifická, pozitivní a negativní prediktivní hodnota pCLE a biopsií se významně nelišily. Shoda mezi pCLE a histopatologickou detekcí IM byla 94,6 %. Cohens kappa statistika ukázala téměř dokonalou shodu mezi dvěma testy (0,88; 95% CI 0,747 – 1,000).

Celkově bylo odebráno 639 biopsických vzorků (8–12 vzorků na pacienta), z toho 195 biopsií 17 pacientům, u kterých byla IM detekována biopsicky. U těchto pacientů byla IM zachycena v 26 biopsiích (13 %), zatímco 169 biopsií (87 %) IM nezachytilo. Navíc u těchto 17 pacientů biopsie detekovaly 250 žlázek a 1407 pohárkových buněk, na druhou stranu pCLE 278 žlázek obsahujících 1784 pohárkových buněk. Pomocí pCLE bylo detekováno významně více pohárkových buněk (medián 43 na pacienta, rozmezí 7-676) v porovnání se standardními biopsiemi (medián 12 na pacienta, rozmezí 3–659),  $p = 0,01$ .

## 5 Diskuse

### 5.1 1. PROJEKT

V naší studii jsme provedli u pacientů s “high-risk” časným karcinomem jícnu porovnání endoskopické a chirurgické léčby a stanovili jsme rizikové faktory generalizace a postižení lymfatických uzlin.

Zjistili jsme, že endoskopická terapie poskytuje slibné výsledky i v léčbě pacientů s “high-risk” časným karcinomem jícnu, který je v současnosti považován za jednoznačnou indikaci k chirurgické léčbě, je-li tato možná. Celkem 80 % pacientů léčených endoskopicky dosáhlo kompletní endoskopické remise. Za vyléčené pacienty můžeme považovat ty, kteří dosáhli dlouhodobé remise, což bylo 62,9 % pacientů léčených pouze endoskopicky a 86,7 % léčených chirurgicky. Nutno dodat, že ve skupině pacientů léčených pouze endoskopicky byli i jednoznační kandidáti k ezofagektomii, kterou kvůli

závažným komorbiditám nebo odmítavému postoji k chirurgii nepodstoupili. Tento fakt je zodpovědný za „horší“ výsledky endoskopické léčby ve smyslu kratšího přežití, a tudíž vyšší mortality. Důležité je se na tyto výsledky podívat z jiné stránky - až u 43,3 % pacientů, kteří podstoupili ezofagektomii, byla endoskopická léčba dostatečná a kurativní, jelikož detailní histopatologické vyšetření resektátu nezastihlo rezidua malignity v jícnu a v LU nebyly detekovány metastázy, mikrometastázy či izolované nádorové buňky.

U pacientů, kteří podstoupili chirurgickou léčbu, byla v definitivním chirurgickém resektátu u 33,3 % zastižena lokální rezidua malignity. U většiny těchto pacientů jsme tento nález očekávali, jelikož léze nebyla endoskopicky vzhledem k pokročilosti odstraněna kompletně, tj. histopatologie endoskopického resektátu ukázala R1 resekci. Navíc v pěti případech byla skutečná invaze tumoru hlubší než invaze popsaná v endoskopickém resektátu. Tento fenomén lze vysvětlit několika způsoby: 1) mohlo jít o “podhodnocení” hloubky invaze; 2) skutečná hloubka invaze v definitivním chirurgickém resektátu nemusela být v endoskopickém resektátu přítomná a tudíž nebyla hodnocena; 3) vývojem dané léze v čase, zejména u pacientů, u kterých nebylo dosaženo R0 resekce nebo u kterých byl delší časový interval mezi endoskopií a ezofagektomií. Z uvedeného vyplývá, že pacienti, u kterých nebyl endoskopicky karcinom odstraněn kompletně (R1 resekce) a nemají kontraindikace k chirurgii, mají být indikováni k ezofagektomii.

Nevýhodou ezofagektomie je její relativně vysoká mortalita a morbidita. Finks JF a kol. provedli studii, kde stanovili mortalitu po ezofagektomii v průběhu 10 let ve dvouletých intervalech na 10 %, 10,8 %, 10 %, 9,2 % a 8,9 % (Finks JF. et al., 2011). Tato data jednoznačně poukazují na závažnost a míru rizika ezofagektomie. Mortalita navíc stoupá u pacientů s výraznějšími komorbiditami, což ukázali Asti E. a kol. v metaanalýze. Společná mortalita u pacientů se závažnějšími komorbiditami byla až 18 % (Asti E. et al., 2018). V našem souboru byla mortalita ve srovnání se zmíněnými studiemi nižší, 6,7 % (2/30). Nicméně celková mortalita v chirurgické skupině asociována s výkonem byla 11 %. Nutno dodat, že jeden pacient zemřel na dehiscenci anastomózy, přičemž v chirurgickém resektátu nebyla zastižena rezidua karcinomu a LU byly negativní včetně průkazu mikrometastáz a izolovaných nádorových buněk (endoskopická resekce byla tedy kurativní). Nižší mortalita ezofagektomie v našem souboru může být dána dvěma faktory. Za prvé, všichni pacienti byli operováni v centru s největší zkušeností s resekcemi jícnu v České republice, a za druhé, pacienti s významnými komorbiditami byli léčeni endoskopicky a chirurgickou léčbu nepodstoupili.

Dále jsme v naší studii provedli detailní analýzu postižení LU či generalizace u pacientů s “high-risk” karcinomy jícnu. Přesné výsledky jsou velmi cenné, jelikož hranice endoskopické léčby jsou určeny na základě rizika postižení lymfatických uzlin. Metastázy v LU či generalizace byly zastiženy u 25 % (4/16) pacientů s karcinodem s sm1 invazí. U všech těchto pacientů byl diagnostikován karcinom s rizikovými faktory. Na druhou stranu, žádný z pacientů s sm1 karcinodem bez rizikových faktorů neměl metastázy či mikrometastázy v LU ani generalizaci. Manner a kol. (Manner H. et al.,



2013) publikovali analýzu metastatického postižení LU u pacientů s karcinomem se submukózní invazí. Ukázali, že metastázy byly zastiženy ve 2 % LU s „low-risk“ sm1 AC, v 9 % LU s „high-risk“ sm1 AC a v 8,3 % u „low-risk“ sm2 AC. Na základě těchto výsledků usuzovali, že u pacientů s „low-risk“ sm1 karcinomy by mohla být endoskopická léčba vhodnou alternativou k ezofagektomii. Významný rozdíl v procentu postižení mezi našimi studii může být dán zejména rozdílnou metodikou. Za první, studie provedena Mannerem a kol. detekovala v LU „pouze“ přítomnost metastáz, zatímco naše studie hodnotila ve všech LU i mikrometastázy a izolované nádorové buňky včetně imunohistochemického průkazu, což umožňuje nepochybně přesnější záchyt maligních struktur. Za druhé, až 74 % pacientů v sérii publikované Mannerem podstoupilo ezofagektomii, takže riziko metastáz bylo nižší. Za třetí, orgánové a uzlinové metastázy detekovali pomocí endoskopické ultrasonografie (sami to považovali za nedostatek jejich studie), zatímco v naší studii bylo provedeno kontrolní vyšetření CT hrudníku i břicha, které má vyšší citlivost v detekci metastáz.

Metastázy v LU či generalizace byly v našem souboru zastiženy u karcinomů s sm2 invazí ve 20 % a u sm3 invaze ve 36,4 %. Vyšší procento pozitivních uzlin bylo pochopitelně očekáváno. Zajímavým faktem může být nepoměr u pacientů s sm1 invazí s rizikovými faktory, který představoval 57,1 %. To může být pravděpodobně způsobeno až 3x nižším počtem pacientů s sm1 karcinomem ve srovnání se skupinou s sm3 karcinomy. Vyšší procento postižení LU koreluje s invazí nádoru do hlubších partií submukózy. Teoreticky by se to dalo vysvětlit větším počtem lymfatických cév a/nebo větším průměrem jejich lumen v hlubších vrstvách submukózy, což by umožňovalo snadnější prorůstání nádorových elementů do stěny cév a pak následné metastazování do LU.

Otázkou je, jaký je skutečný prognostický význam mikrometastáz a izolovaných nádorových buněk. Žádný z pacientů, u nichž byly detekovány mikrometastázy, nezemřel. Na druhou stranu nemůžeme spolehlivě predikovat vývoj těchto ložisek v lymfatických uzlinách v čase. Teoreticky by velmi pravděpodobně došlo ke zvětšení ložisek z mikrometastatického na metastatický a tím by se zhoršovala i prognóza pacienta.

Na základě těchto výsledků jsme provedli detailní analýzu histopatologických prediktivních faktorů ve vztahu k metastázám do LU a generalizaci. Za jediný statisticky významný negativní prediktivní faktor lze považovat pouze angioinvazi a lymfangioinvazi. Tento fakt se pochopitelně nabízí jako logické vysvětlení progresu v sekvenci karcinom -> lymfangioinvaze a/nebo angioinvaze -> metastatické postižení LU a/nebo orgánů. Je zajímavé, že s angio/lymfangioinvazí nekoreloval např. horší grading tumoru či vyšší disociace nádorových buněk. Na druhou stranu, absence lymfangioinvaze či angioinvaze zcela neeliminuje riziko metastatického postižení. V našem souboru tomu nasvědčuje fakt prokázané mikrometastázy u pacienta, kde nebyla lymfangioinvaze detekována. Tato situace může být zdůvodněna následovně. Na prvním místě se nabízí vysvětlení, že každá metoda má určité limity a ani v případě kompletního zpracování vzorku by nebyla vyšetřena celá tkáň. Dalším vysvětlením by mohla být situace, že angioinvaze nebyla zastižena, ale není možné vyloučit přítomnost cirkulujících nádorových buněk, ze kterých mohou vznikat metastázy. Obdobné závěry publikovali také Boys a kol.

a Nentwich a kol. (Boys JA. et al., 2016) (Nentwich MF. et al., 2014). V jejich souborech představovala lymfangioinvaze nejdůležitější rizikový faktor metastázování do LU. Boys a kol. také naznačili, že metastatický potenciál může záviset na množství rizikových faktorů. V případě koincidence 3 rizikových faktorů (G3-4, L+ a hloubka invaze > 500 µm) mělo 50 % pacientů metastázy v LU. Tento fakt jsme retrospektivně analyzovali v našem souboru a došli jsme ke stejnému výsledku, a to i v případě, že jsme rizikové faktory definovali odlišně (G3-4, L+, A+, TCD3). Pokud byly u pacienta přítomny všechny čtyři rizikové faktory, až u 57,1 % byla zastižena generalizace nebo metastázy do LU.

**Závěrem lze shrnout, že endoskopická terapie může být vhodnou alternativou léčby “high-risk” karcinomů jícnu u pacientů, a to nejenom u těch, kteří nemohou podstoupit ezofagektomii. Pacienti s R1 resekcí by měli být referováni k chirurgii. Angioinvaze a lymfangioinvaze jsou statisticky významnými rizikovými faktory v progresi časných karcinomů jícnu.**

## **5.2 2. PROJEKT**

V naší studii jsme porovnávali a korelovali nálezy imunohistochemického průkazu p53 s definitivní diagnózou stanovenou z hematoxylin eosinu v diagnostice benigních, dysplastických i maligních lézí sliznice jícnu. Zjistili jsme, že použití IHC průkazu p53 může být v určitých indikacích spolehlivou pomocnou metodou v diagnostice lézí jícnu. p53 je vhodným pomocným imunohistochemickým markerem k odlišení benigních (např. reaktivních) a dysplastických lézí, a to jak u LGD ( $p = 0,0114$ ), tak i HGD ( $p < 0,0001$ ). Průkaz p53 ale není spolehlivý v odlišení stupně dysplazie.

Kaye PV a kol. provedli studii, kde ukázali, že p53 je vhodným pomocným markerem pro rutinní použití v diagnostice dysplastických lézí a jejich odlišení od nedysplastických. Nicméně, uvedli, že p53 spolehlivě nedokázala odlišit LGD léze od HGD lézí, a proto doporučují zjednodušení diagnózy týkající se dysplastických změn na „přítomnou“, „neurčitou“ a „nepřítomnou“ (Kaye PV. et al., 2016). V podstatě k stejným výsledkům jsme dospěli také. Naše analýza ukázala, že průkaz p53 je vhodným pomocným imunohistochemickým markerem k odlišení benigních/nedysplastických a dysplastických lézí a to jak u LGD ( $p = 0,0114$ ), tak i HGD ( $p < 0,0001$ ). Odlišení HGD a nedysplastických, zejména reaktivních lézí obvykle v praxi nečiní potíže. Naopak odlišení LGD od reaktivních lézí jícnu je jednou z nejčastějších problémů v klinické praxi v oblasti onemocnění jícnu, jak ukázala například práce autorů z Nizozemska, kde pouze 27 % pacientů mělo ve druhém expertním čtení potvrzenou LGD v terénu BJ (Duits LC. et al., 2015). Právě v těchto indikacích je přínos stanovení p53. Naše výsledky potvrzují, že p53 nedokáže spolehlivě odlišit LGD a HGD.

**Imunohistochemický průkaz p53 je vhodnou pomocnou metodou v diagnostice lézí jícnu. Je vhodnou doplňkovou metodou v odlišení dysplastických a nedysplastických lézí. V případě silné blokové pozitivita průkazu p53 koreluje s nálezem HGD, nicméně odlišení LGD od HGD není přesvědčivé. Použití p53 by mělo předejít nesprávné diagnóze, zejména ve smyslu nadhodnocení**

**léze. Zcela klíčová je znalost odlišného přístupu hodnocení ve srovnání s jinými imunohistochemickými průkazy, který hodnotíme jako normální/nemutovaný, tzv. wild-type obraz a abnormální/mutovaný. Průkaz p53 je důležitý v stanovení rizika progresu lézí jícnu. Nespornou výhodou použití p53 je jeho dostupnost (nízká cena) a rychlost zhotovení.**

### 5.3 3. PROJEKT

V naší prospektivní studii jsme porovnávali diagnostickou přesnost pCLE vs. biopsie u pacientů s viditelnými lézemi sliznice jícnu a žaludku. Zjistili jsme, že obě metody mají vynikající diagnostickou přesnost (89 % pro pCLE vs. 85 % pro biopsie) s uspokojivou senzitivitou a specifitou diagnostikovat maligní, dysplastické a benigní léze. Biopsie je považována za zlatý standard v histopatologické diagnostice u pacientů s gastrointestinální patologií. Diagnóza založená na biopsiích je považována za spolehlivou, ale ne dokonalou. Například probíhají kontroverze o diagnostické přesnosti biopsií v detekci dysplazie nízkého stupně u pacientů s BJ (LGD je často nadhodnocena) (Duits LC. et al., 2015). Ani biopsie z viditelné léze nejsou dostatečně přesné, aby poskytly spolehlivou diagnózu. Dvě studie ukázaly, že definitivní diagnóza značného počtu viditelných neoplastických lézí musela být změněna po zhodnocení vzorků z ER (Stefanova M. et al., 2013) (Pailoor K. et al., 2013). Byly tedy vyvinuty a testovány nové diagnostické přístupy s cílem zlepšit detekci lézí i diagnostickou přesnost. pCLE představuje relativně novou metodu umožňující „virtuální“ mikroskopickou diagnostiku.

Sharma a kol. zjistili, že kombinace narrow band imaging s vysoko-rozlišovací endoskopií s bílým světlem a s pCLE vedla k vynikající senzitivitě (100 %) v diagnostice AC jícnu a/nebo HGD, a proto bylo možné vyhnout se biopsiím u 60 % pacientů, pokud byly všechny tři metody negativní (Sharma P. et al., 2011). Bertani a kol. prokázali senzitivitu, specifitu, pozitivní a negativní prediktivní hodnotu pCLE 100 %, 83 %, 67 % a 100 % pro detekci dysplazie u pacientů s BJ (Bertani H. et al., 2013).

Naše studie prokázala, že u pacientů s BJ a s viditelnou lézí poskytuje pCLE ve většině případů spolehlivou diagnózu HGD/AC. pCLE nediodagnostikovala správně AC jícnu u 2/20 pacientů, zatímco biopsie se zmýlily u 6/20 pacientů. U pacientů s BJ (bez viditelné léze) spočívá potenciální užitečnost pCLE ve zlepšení diagnostické výtěžnosti dysplazie a ve snížení celkového počtu biopsií. U pacientů s viditelnou lézí poskytuje pCLE srovnatelné výsledky s biopsií.

V naší studii jsme vyšetřili 9 pacientů se SCC a u všech byl správně diagnostikován pomocí pCLE, zatímco biopsie nedokázaly SCC diagnostikovat správně u jednoho pacienta, jelikož byla zachycena pouze nekrotická tkáň bez vitálních maligních nádorových buněk. Následující úspěšná chemoradioterapie byla podána pouze na základě výsledků pCLE. pCLE se zdá být spolehlivá v diagnostice SCC jícnu. Pech a kol. prokázali vynikající přesnost pCLE v diagnostice histologicky prokázaného SCC u 27 pacientů, jelikož všechny léze byly správně diagnostikovány dvěma

endoskopisty (Pech O. et al., 2008). V jiné studii byla senzitivita, specifická a diagnostická přesnost pCLE u pacientů se SCC > 90 % (Guo J. et al., 2015).

**pCLE je porovnatelná se standardními biopsiemi, pokud jde o celkovou diagnostickou přesnost pro správnou diagnostiku viditelných lézí jícnu/žaludku. Naše výsledky naznačují, že u pacientů s viditelnou jícnovou/žaludeční lézí by mohla být pCLE považována za standardní metodu.**

#### 5.4 4. PROJEKT

V naší studii jsme prokázali, že pCLE má srovnatelnou účinnost se standardními biopsiemi při detekci perzistující nebo recidivující IM u pacientů, kteří podstoupili endoskopickou léčbu Barrett's Oesophagus Related Neoplasia. Kromě toho byla pCLE stejně účinná jako biopsie při vyloučení rekurentní intestinální neoplazie a konečně pCLE detekovala významně více pohárkových buněk než biopsie u pacientů s IM.

V této studii jsme zkoumali, zda by pCLE mohla být také užitečná u pacientů po úspěšné endoskopické léčbě BORN. Prokázali jsme, že pCLE může být v této indikaci užitečná, protože byla přinejmenším stejně účinná jako biopsie v detekci perzistující/recidivující IM a při vyloučení neoplazie. Mezi 20 pacienty s IM pCLE diagnostikovala všechny, zatímco biopsie vynechaly IM u 3 pacientů. Dosud pouze jedna randomizovaná studie hodnotila roli pCLE při hodnocení reziduálního BJ po endoskopické léčbě BORN. Sledovali, jestli použití pCLE v kombinaci s endoskopií s vysokým rozlišením mohlo zlepšit diagnostiku zbytkového BJ ve srovnání s endoskopií bez pCLE. Hlavním cílem byl podíl optimálně vedených pacientů (správně indikovaná další léčba u pacientů s reziduální IM/neoplázií a žádná terapie u pacientů bez IM/neoplázie). Studie dospěla k závěru, že přidání pCLE k endoskopii s vysokým rozlišením nepřispělo k lepší detekci reziduálního BJ nebo neoplazie (26 % pro endoskopii vs. 27 % pro endoskopii + pCLE) (Wallace MB. et al., 2012).

Vzhledem k velmi nízkému počtu pacientů s recidivující neoplázií (1 pacient) jsme bohužel nemohli porovnat pCLE s biopsiemi při detekci recidivující neoplazie. Toto byl nejrelevantnější výstup z klinického hlediska. Nicméně s ohledem na velmi nízkou míru rekurentních neoplázií po ER či radiofrekvenční ablacii (2–7 %) je studie srovnávající pCLE a biopsie v detekci rekurentní neoplazie pravděpodobně nereálná, protože by vyžadovala zařazení vysokého počtu pacientů.

Naše studie hodnotila, kolik žlázek a pohárkových buněk bylo vyšetřeno pomocí pCLE ve srovnání s biopsiemi u pacientů s IM. pCLE detekovala více pohárkových buněk ve srovnání s biopsiemi. Tento výsledek není příliš překvapivý, vezmeme-li v úvahu, že biopsie byly odebrány ze 3-6 míst v rámci neo-Z-linie, ale obrazy pCLE byly zaznamenány z celého obvodu neo-Z-linie. Můžeme spekulovat, že pCLE by mohla mít vyšší pravděpodobnost detekce recidivujících neoplázií.

## **6 Závěry**

### **6.1 1. PROJEKT**

Endoskopická léčba se zdá být vhodnou alternativou k ezofagektomii i u pokročilejších karcinomů jícnu. Angioinvaze a lymfangioinvaze se jeví jako nejdůležitější prediktivní faktory postižení lymfatických uzlin a/nebo generalizace u časného karcinomu jícnu.

### **6.2 2. PROJEKT**

Imunohistochemický průkaz p53 je vhodným markerem k odlišení dysplastických změn od reaktivních, ale není spolehlivý v odlišení low-grade a high-grade dysplazie. p53 mutovaný fenotyp nacházíme u nedysplastických, dysplastických změn i u karcinomu, což potvrzuje molekulárně-genetický podklad vzniku adenokarcinomu v terénu Barrettova jícnu.

### **6.3 3. PROJEKT**

pCLE je srovnatelná se standardními biopsiemi z hlediska celkové diagnostické přesnosti v diagnostice lézí jícnu a žaludku. Na základě výsledků naší studie usuzujeme, že pCLE by mohla být uznána jako standardní metoda v diagnostice lézí jícnu a žaludku poskytující přesnou histopatologickou diagnostiku. pCLE navíc umožňuje pozorovat a hodnotit sliznici či léze i z dynamické stránky, jako je například rychlost proudění krve v cévách tumoru či ho porovnat s normální sliznicí.

### **6.4 4. PROJEKT**

pCLE může být užitečná u pacientů podstupujících endoskopické sledování po terapii BORN, jelikož je zcela srovnatelně přesná v diagnostice perzistující/recidivující IM a při vyloučení recidivující neoplazie jako standardní biopsie. Nespornou výhodou pCLE ve srovnání s biopsiemi je možnost vyšetření podstatně větší plochy.

## 7 Použitá literatura

Abnet CC, Arnold M, Wei WQ. 2018. Epidemiology of Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Gastroenterology*. 2018 Jan;154(2):360-373. doi: 10.1053/j.gastro.2017.08.023. Epub 2017 Aug 18. Erratum in: *Gastroenterology*. 155(4):1281. PMID: 28823862; PMCID: PMC5836473.

Asti E, Sozzi M, Bonitta G et al. 2018. Esophagectomy in patients with liver cirrhosis: a systematic review and Bayesian meta-analysis. *J Visc Surg*. 155(6):453-464. doi: 10.1016/j.jviscsurg.2018.03.014. Epub 2018 Apr 10. PMID: 29653854.

Bertani H, Frazzoni M, Dabizzi E et al. 2013. Improved detection of incident dysplasia by probe-based confocal laser endomicroscopy in a Barrett's esophagus surveillance program. *Dig Dis Sci*. 58(1):188-93. doi: 10.1007/s10620-012-2332-z. Epub 2012 Aug 9. PMID: 22875309.

Bhat S, Coleman HG, Yousef F et al. 2011. Risk of malignant progression in Barrett's esophagus patients: results from a large population-based study. *J Natl Cancer Inst*. 103(13):1049-57. doi: 10.1093/jnci/djr203. Epub 2011 Jun 16.

Boys JA, Worrell SG, Chandrasoma P et al. 2016. Can the Risk of Lymph Node Metastases Be Gauged in Endoscopically Resected Submucosal Esophageal Adenocarcinomas? A Multi-Center Study. *J Gastrointest Surg*. 20(1):6-12; discussion 12. doi: 10.1007/s11605-015-2950-9. Epub 2015 Sep 25. PMID: 26408330.

Duits LC, Phoa KN, Curvers WL et al. 2015. Barrett's oesophagus patients with low-grade dysplasia can be accurately risk-stratified after histological review by an expert pathology panel. *Gut*. 64(5):700-6. doi: 10.1136/gutjnl-2014-307278. Epub 2014 Jul 17. PMID: 25034523.

Engel LS, Chow WH, Vaughan TL et al. 2003. Population attributable risks of esophageal and gastric cancers. *J Natl Cancer Inst*. 95(18):1404-13. doi: 10.1093/jnci/djg047. PMID: 13130116.

Finks JF, Osborne NH, Birkmeyer JD. 2011. Trends in hospital volume and operative mortality for high-risk surgery. *N Engl J Med*. 364(22):2128-37. doi: 10.1056/NEJMsa1010705. PMID: 21631325; PMCID: PMC3150488.

Guo J, Li CQ, Li M et al. 2015. Diagnostic value of probe-based confocal laser endomicroscopy and high-definition virtual chromoendoscopy in early esophageal squamous neoplasia. *Gastrointest Endosc*. 81(6):1346-54. doi: 10.1016/j.gie.2014.10.041. Epub 2015 Feb 10. PMID: 25680899.

Kaye PV, Ilyas M, Soomro I et al. 2016. Dysplasia in Barrett's oesophagus: p53 immunostaining is more reproducible than haematoxylin and eosin diagnosis and improves overall reliability, while grading is poorly reproducible. *Histopathology*. 69(3):431-40. doi: 10.1111/his.12956. Epub 2016 Apr 6. PMID: 26918780.

Kiesslich R, Burg J, Vieth M et al. 2004. Confocal laser endoscopy for diagnosing intraepithelial neoplasias and colorectal cancer in vivo. *Gastroenterology*. 127(3):706-13. doi: 10.1053/j.gastro.2004.06.050. PMID: 15362025.

- Manner H, Pech O, Heldmann Y et al. 2013. Efficacy, safety, and long-term results of endoscopic treatment for early stage adenocarcinoma of the esophagus with low-risk sm1 invasion. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 11(6):630-5; quiz e45. doi: 10.1016/j.cgh.2012.12.040. Epub 2013 Jan 26. PMID: 23357492.
- Martinek J, Falt P, Gregar J et al. 2013. Guidelines of the Czech gastroenterological society - Endoscopic treatment of Barrett's esophagus and early esophageal neoplasia. *Gastroent Hepatol.* 67(6):479-489.
- Nentwich MF, von Loga K, Reeh M et al. 2014. Depth of submucosal tumor infiltration and its relevance in lymphatic metastasis formation for T1b squamous cell and adenocarcinomas of the esophagus. *J Gastrointest Surg.* 18(2):242-9; discussion 249. doi: 10.1007/s11605-013-2367-2. Epub 2013 Oct 4. PMID: 24091912.
- Pailoor K, Sarpangala M, Naik R. 2013. Histopathological diagnosis of gastric biopsies in correlation with endoscopy – a study in a tertiary care center. *Adv Lab Med Int.* 22-31.
- Pech O, Rabenstein T, Manner H et al. 2008. Confocal laser endomicroscopy for in vivo diagnosis of early squamous cell carcinoma in the esophagus. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 6(1):89-94. doi: 10.1016/j.cgh.2007.10.013. Epub 2007 Dec 11. PMID: 18063417.
- Prabhu A, Obi KO, Rubenstein JH. 2014. The synergistic effects of alcohol and tobacco consumption on the risk of esophageal squamous cell carcinoma: a meta-analysis. *Am J Gastroenterol.* 109(6):822-7. doi: 10.1038/ajg.2014.71. Epub 2014 Apr 15. PMID: 24751582.
- Salaspuro MP. Acetaldehyde, microbes, and cancer of the digestive tract. 2003. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 40(2):183-208. doi: 10.1080/713609333. PMID: 12755455.
- Sharma P, Meining AR, Coron E et al. 2011. Real-time increased detection of neoplastic tissue in Barrett's esophagus with probe-based confocal laser endomicroscopy: final results of an international multicenter, prospective, randomized, controlled trial. *Gastrointest Endosc.* 74(3):465-72. doi: 10.1016/j.gie.2011.04.004. Epub 2011 Jul 13. PMID: 21741642; PMCID: PMC3629729.
- Stefanova M, Tuckova I, Maluskova J et al. 2013. Biopsie nejsou dostatečné pro přesnou diagnostiku neoplazie u pacientů s Barrettovým jícnem. *Gastroenterol Hepatol.* 67(4):264-70.
- Wallace M, Lauwers GY, Chen Y et al. 2011. Miami classification for probe-based confocal laser endomicroscopy. *Endoscopy.* 43(10):882-91. doi: 10.1055/s-0030-1256632. Epub 2011 Aug 4. PMID: 21818734.
- Wallace MB, Crook JE, Saunders M et al. 2012. Multicenter, randomized, controlled trial of confocal laser endomicroscopy assessment of residual metaplasia after mucosal ablation or resection of GI neoplasia in Barrett's esophagus. *Gastrointest Endosc.* 76(3):539-47.e1. doi: 10.1016/j.gie.2012.05.004. Epub 2012 Jun 28. PMID: 22749368.
- Zendehdel K, Nyren O, Luo J et al. 2008. Risk of gastroesophageal cancer among smokers and users of Scandinavian moist snuff. *Int J Cancer.* 122(5):1095-9. doi: 10.1002/ijc.23076. PMID: 17973262.

Zhang Y. 2013. Epidemiology of esophageal cancer. *World J Gastroenterol.* 19(34):5598-606. doi: 10.3748/wjg.v19.i34.5598. PMID: 24039351; PMCID: PMC3769895.

## 8 Seznam publikací

Publikace prvního projektu je v přípravě a bude odeslána k recenznímu řízení v nejbližší době.

### První autor, periodikum s IF:

1. Kollar M, Krajciova J, Prefertusova L, Sticova E, Maluskova J, Vackova Z, Martinek J. Probe-based confocal laser endomicroscopy versus biopsies in the diagnostics of oesophageal and gastric lesions: A prospective, pathologist-blinded study. *United European Gastroenterol J.* 2020 May;8(4):436-443. doi: 10.1177/2050640620904865. Epub 2020 Jan 28. PMID: 32213027; PMCID: PMC7226690. **IF 4,623.**

2. Kollar M, Spicak J, Honsova E, Krajciova J, Vackova Z, Martinek J. Role of confocal laser endomicroscopy in patients with early esophageal neoplasia. *Minerva Chir.* 2018 Aug;73(4):417-427. doi: 10.23736/S0026-4733.18.07795-7. Epub 2018 May 25. PMID: 29806759. **IF 1,060.**

### První autor, periodikum bez IF:

3. Kollár M, Krajčiová J, Husták R, Malušková J, Kment M, Vacková Z, Špičák J, Martínek J. Confocal laser endomicroscopy in the diagnostics of gastrointestinal lesions literary review and personal experience. *Rozhl Chir.* 2018 Winter; 97(12):531-538. English. PMID: 30646731.

4. Kollár M, Malušková J, Krajčiová J et al. Kvalita biopsií u pacientů s Barrettovým jícnem – jumbo vs. large capacity kleště. *Gastroenterol Hepatol.* 2015; 69(5): 431-436. doi:10.14735/amgh2015431.

### Spoluautor, periodikum s IF:

5. Krajciova J, Kollar M, Maluskova J, Janicko M, Vackova Z, Spicak J, Martinek J. Confocal Laser Endomicroscopy vs Biopsies in the Assessment of Persistent or Recurrent Intestinal Metaplasia/Neoplasia after Endoscopic Treatment of Barrett's Esophagus related Neoplasia. *J Gastrointestin Liver Dis.* 2020 Sep 9;29(3):305-312. doi: 10.15403/jgld-2467. PMID: 32919414. **IF 2,142.**

6. Krajciova J, Janicko M, Falt P, Gregar J, Suchanek S, Ngo O, Kollar M, Urban O, Prochazka V, Zavoral M, Spicak J, Martinek J. Radiofrequency Ablation in Patients with Barrett's Esophagus-related Neoplasia - Long-Term Outcomes in the Czech National Database. *J Gastrointestin Liver Dis.* 2019 Jun 1;28:149-155. doi: 10.15403/jgld-174. PMID: 31204400. **IF 2,142.**

7. Martinek J, Maluskova J, Stefanova M, Tuckova I, Suchanek S, Vackova Z, Krajciova J, Kollar M, Zavoral M, Spicak J. Improved specimen adequacy using jumbo biopsy forceps in patients with Barrett's esophagus. *World J Gastroenterol.* 2015 May 7;21(17):5328-35. doi: 10.3748/wjg.v21.i17.5328. PMID: 25954107; PMCID: PMC4419074. **IF 5,28.**



8. Dolezel R, Ryska O, Kollar M, Juhasova J, Kalvach J, Ryska M, Martinek J. A comparison of two endoscopic closures: over-the-scope clip (OTSC) versus KING closure (endoloop + clips) in a randomized long-term experimental study. *Surg Endosc.* 2016 Nov;30(11):4910-4916. doi: 10.1007/s00464-016-4831-z. Epub 2016 Mar 8. PMID: 26956361. **IF 4,584.**

**Spoluautor, periodikum bez IF:**

9. Martinek J, Dolezel R, Walterova B, Kollar M, Juhas S, Juhasova J, Vackova Z, Hustak R, Erben J. Stenting to prevent esophageal stricture after circumferential endoscopic submucosal dissection: an experimental study. *Endosc Int Open.* 2020 Nov;8(11):E1698-E1706. doi: 10.1055/a-1261-3103. Epub 2020 Oct 22. PMID: 33140027; PMCID: PMC7581471.

10. Juhásová J, Klíma J, Martínek J, Walterová B, Dolezel R, Vacková Z, Kollár M, Juhas S. Two types of autologous cells in stricture development prevention after complete circular endoscopic dissection in minipig. *Rozhl Chir.* 2019 Winter;98(12):497-508. English. doi: 10.33699/PIS.2019.98.12.497-508. PMID: 31958964.