

**LÉKAŘSKÁ FAKULTA UNIVERZITY  
PALACKÉHO V OLMOUCI  
I. CHIRURGICKÁ KLINIKA**

**přednosta: Prof. MUDr. Čestmír Neoral, CSc.**

**Minimální reziduální choroba u karcinomu plic**

**disertační práce**

**MUDr. Josef Chudáček**

**Olomouc 2015**

Doktorand: MUDr. Josef Chudáček

Doktorský studijní program: Chirurgie

Školící pracoviště: I. chirurgická klinika Lékařské fakulty Univerzity Palackého a  
Fakultní nemocnice Olomouc

Školitel: MUDr. Tomáš Bohanes, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem disertační práci na téma Minimální reziduální choroba u karcinomu plic vypracoval samostatně a uvedl jsem veškerou použitou literaturu. Studie byla provedena na pracovišti I. chirurgické kliniky LF UP a FN v Olomouci pod odborným vedením MUDr. Tomáše Bohanese, Ph.D. v úzké spolupráci s kolegy z Ústavu experimentální medicíny BIOMEDREG.

## Poděkování

Na úvod bych chtěl poděkovat všem hrudním chirurgům z I. chirurgické klinika LF UP a FN Olomouc a kolegům z dalších pracovišť, zabývajících se problematikou karcinomu plic a minimální reziduální chorobou. Spojením těchto dvou skupin tak mohl vzniknout projekt pod názvem Minimální reziduální choroba u karcinomu plic.

Velký dík patří mému školiteli a zároveň dobrému příteli MUDr. Tomáši Bohanesovi, Ph.D. za odborné vedení a kritický přístup k mé práci během celého doktorandského studia, který mě neustále nutil na sobě pracovat a zlepšovat se. Velké poděkování patří mým přednostům prof. MUDr. Vladimíru Královi, CSc. a prof. MUDr. Čestmíru Neoralovi, CSc., zároveň nesmím opomenout ani své primáře prof. MUDr. Jiřího Kleina, Ph.D. a MUDr. Tomáše Malého, Ph.D. Tito všichni mi dali šanci, abych se stal platným členem kolektivu I. chirurgické kliniky LF UP a FN Olomouc. Na tuto šanci jsem náležitě hrdý a věřím, že je nikdy nezklamou.

Velký obdiv a díky musím také vyjádřit kolegům z Ústavu experimentální medicíny BIOMEDREG za jejich práci ve vyhodnocování odebraného materiálu a vytvoření vlastní metodiky hodnocení minimální reziduální choroby u karcinomu plic, která je součástí této práce, a to především Mgr. Andree Prokopové, MUDr. Josefovi Srovnalovi, Ph.D. a řediteli ústavu doc. MUDr. Mariánu Hajduchovi, Ph.D.

V neposlední řadě děkuji svým rodičům, kteří mně nasměrovali na správnou cestu života a ukázali mi, jak krásné je lékařské povolání. Nesmím opomenout v poděkování ani svou přítelkyni, která mě podpořila a velmi pomohla ve zdárném dokončení.

Práce na tomto projektu byla podpořena grantem IGA Význam stanovení minimální reziduální choroby u nemocných s operabilním karcinomem plic č. NS10285.

V Olomouci dne 3. 1. 2015

MUDr. Josef Chudáček

## Obsah

1.	Úvod.....	1
2.	Karcinom plic - přehled současné problematiky.....	3
2.1	Obecný úvod.....	3
2.2	Etiologie a molekulární genetiky u karcinomu plic.....	3
2.3	Diagnostické metody.....	5
2.4	Staging karcinomu plic.....	9
2.5	Možnosti léčby karcinomu plic.....	14
2.5.1	Chirurgická léčba.....	14
2.5.2	Typy anatomických resekcí.....	19
2.5.3	Indikační kritéria chirurgické léčby pro jednotlivá stádia.....	21
2.5.4	Chemoterapeutické režimy.....	25
2.5.5	Léčba u malobuněčného karcinomu plic.....	27
3.	Minimální reziduální choroba.....	28
3.1	Úvod.....	28
3.2	Detekce minimální reziduální choroby.....	29
3.3	Onkomarkery.....	30
3.4	Minimální reziduální choroba u karcinomu plic – její význam, diagnostika a specifické onkomarkery.....	31
4.	Vlastní práce.....	35
4.1	Základní cíle práce.....	35
4.2	Soubor pacientů.....	35
4.3	Materiál a jeho odběr.....	36
4.4	Zpracování a vyšetření materiálu v Ústavu molekulární a translační medicíny.....	38
4.4.1	Osmotická lýza se separací jaderných buněk.....	38
4.4.2	Vlastní izolace RNA.....	39

4.4.3	Stanovení cut-off hodnot pro jednotlivé markery CEA, EGFR, LunX a c-met a hodnocení výsledku vyšetření přítomnosti MRD .....	43
4.4.4	Statistická analýza .....	45
4.5	Výsledky .....	45
4.5.1	Kontrolní skupina .....	45
4.5.2	Vztah MRD k disease free intervalu a celkové doby přežívání u nemocných s NSCLC .....	48
4.5.3	Statisticky významné výsledky jednotlivých onkomarkerů .....	49
5.	Diskuze .....	59
6.	Závěr .....	65
7.	Souhrn .....	66
8.	Summary .....	68
9.	Seznam použitých zkratk .....	70
10.	Seznam použité literatury .....	72
11.	Seznam publikací a přednášek autora .....	82
11.1	Práce související s disertační prací .....	82
11.2	Ostatní práce .....	82
11.3	Přednášky .....	83

## 1. Úvod

Nejčastější příčinu úmrtí v západních zemích tvoří nádory a kardiovaskulární onemocnění, jejichž výskyt v poslední době nadále zásadně narůstá. Obě tyto diagnózy jsou spojeny se špatným životním stylem. Diagnostika a léčba je složitá a dlouhodobá prognóza je všeobecně závažná. Proto se maligní nádory stávají oprávněně významným bodem zájmu lékařské i nelékařské společnosti.

Je dokázáno, že nádorové onemocnění je nemocí genomu. Mutace, k nimž dochází na podkladě různých mechanismů, alterují geny kódující nejrůznější regulátory buněčného cyklu či růstové stimulatory. Absence či dysfunkce těchto genových produktů vede k vymknutí se buňky z procesu regulovaného buněčného cyklu a apoptózy a dochází tak ke vzniku nádorového klonu. Ten potřebuje pro buněčné dělení a svůj růst dostatečný přísun živin a kyslík. Proteolýzou extracelulární matrix nádorové buňky pronikají postupně k lymfatickým a krevním cévám, mohou do nich posléze vcestovat, jako nádorový embolus putovat cirkulací, z cévy vycestovat a usídlit se v jiné tkáni či orgánu. Takto vzniká sekundární nádor – metastáza. Ne však každá nádorová buňka je toho procesu ovšem schopna. Řada buněk, cirkulujících v oběhu, je ve skutečnosti apoptických, některé z nich jsou dormantní, další z nich nejsou schopny proliferace, proteosyntézy a indukce angiogeneze. Většina těchto nádorových buněk je nakonec zničena vlastním imunitním systémem organismu.

Lze si jistě položit otázku: Proč nenapravit genetickou chybu vnesením funkční kopie genu do organismu? Bohužel tato teorie naráží na řadu problémů, zejména v případě, kdy se toto poškození většinou netýká pouze jednoho genu, ale genů několika. Přes všechny experimenty na poli reparace poškozených genů je nadále chirurgická léčba u většiny malignit prakticky jedinou metodou skutečně kurativní. Alternativní možnost nabízí onkologická léčba. Počáteční nadšení, že moderní onkologická léčba plně nahradí chirurgickou léčbu, bylo ovšem následováno postupným vystřízlivěním. Nyní je možné říct, že je onkologická léčba pouze u určitých nádorových onemocnění základní léčebnou metodou, u ostatních je součástí léčebného protokolu jako neoadjuvantní či adjuvantní léčba. Nejnovější inovací na poli onkologie je biologická léčba, jejímž principem je cílené působení na jednotlivé molekuly buněčných signálních drah kancerogeneze. I přes veškerý rozvoj těchto všech nových moderních léčebných postupů zůstává však léčba nádorových onemocnění stále uspokojivá.

Karcinom plic byl poprvé patrně popsán Paracelsem v roce 1420, v současné době patří mezi jednu z nejčastějších malignit v lidské populaci. Je to vysoce agresivní nádor, jehož jedinou kurativní metodou zůstává stále chirurgická resekce plic doplněná o radikální lymfadenektomii.

I přes provedení radikálního výkonu ale nejsou dlouhodobé výsledky v době přežívání příliš uspokojivé.

V České republice je diagnostikováno ročně 6250-6550 případů rakoviny plic, v mužské populaci je incidence 91,1/100000 a u žen je to 33,3/100000, v r. 1980 byla incidence u žen 10/100000. U mužů dochází k mírnému poklesu, oproti tomu u žen je patrný pozvolný vzestup incidence. Celková incidence v roce 2007 v ČR dosahovala 61,1/100000. Bronchogenní karcinom bývá diagnostikován ve věkovém rozmezí 35-85 let s nejčastějším výskytem mezi 55 – 80 rokem [1]. U mužů je třetím nejčastějším zhoubným karcinomem za karcinomem prostaty a kolorektálním karcinomem. Má přitom ale výrazně vyšší mortalitu (81,5 na 100000 mužů) než nádory stojících v incidenci před ním. U žen je co do incidence až na čtvrtém místě až po zhoubném nádoru vaječníků, který ovšem také předčí v mortalitě [2]. Zlepšení výsledků léčby karcinomu plic je tedy zásadním cílem vzhledem k velkým počtům nemocných a jejich dosavadní prognóze.

Operační techniku a taktiku nelze v současné době již výrazněji zlepšit, proto jedinou cestou ke zlepšení se t. č. jeví dosažení pokroku na molekulárně biologické úrovni. Cílem je přesné pochopení jednotlivých stupňů kancerogeneze. Významné by bylo zjištění kdy, jak a za jakých podmínek se změní volně cirkulující nádorová buňka v metastázu. Nicméně již sám průkaz cirkulujících nádorových buněk se jeví být ukazatelem zvýšeného rizika relapsu onemocnění po chirurgické terapii. Pokud při použití molekulárně genetických metod získáme možnost tyto pacienty vyselektovat, bude je možné začít časně cíleně léčit i při stávajícím stavu onkologické léčby, z čehož budou tito nemocné jednoznačně profitovat. Z tohoto důvodu představuje detekce minimální reziduální choroby slibný ukazatel, využitelný jako faktor diagnostický a zároveň i prognostický faktor.

Minimální reziduální chorobou (minimal systematic/residual disease, MSD, MRD) rozumíme buňky volně cirkulující či obsažené v krvi, kostní dřeni, mízních uzlinách či jiných tělních dutinách, kdy musí být splněna základní podmínka předchozího radikálního odstranění primárního nádoru a nepřítomnost klinických známek nádorového onemocnění. Přítomnost MRD však ještě neznamená jednoznačně vznik a vývoj vzdálených metastáz. Klinický význam minimální reziduální choroby tedy není stále přesně jasný a nadále zůstává zdrojem celé řady sporů a odborných diskuzí.

Z těchto důvodů jsem se rozhodl věnovat v této práci problematice významu a využití minimální reziduální choroby u karcinomu plic, což by mohlo být nápomocné v dalším rozvoji léčebných postupů u karcinomu plic.



## 2. Karcinom plic - přehled současné problematiky

### 2.1 Obecný úvod

Plicní karcinom je velmi častým typem zhoubného nádoru v lidské populaci, přičemž jeho výskyt neustále stoupá a zároveň patří mezi nádory s nejvyšší letalitou.

Časná a dobře léčitelná stádia karcinomu plic jsou dlouho asymptomatická. Brzká diagnóza je skoro nemožná, neboť klinické symptomy jsou spojeny až s projevy lokálního růstu nádoru. Navíc lze časnou symptomatologii nádorového onemocnění obtížně odlišit od symptomatologie chronické kuřácké bronchitidy, která je u těchto pacientů pochopitelně vcelku běžná. Jedním z prvních příznaků bývá kašel. Vzniká nejčastěji invazí tumoru do bronchiální sliznice, nadprodukcí hlenu, pneumonií za stenózou nebo z rozpadu nádoru. Již od začátku minulého století je považován kašel trvající déle než dva týdny za varovný příznak [3]. Mezi další symptomy lokálního růstu nádoru patří hemoptýza. Příznaky signalizující pokročilost onemocnění jsou dysfagie, chrapot, pleurální výpotek s maligními buňkami, paréza bránice a syndrom horní duté žíly. Při přítomnosti těchto příznaků už velmi často nelze indikovat radikální chirurgický výkon. U karcinomu plic, stejně jako u některých jiných malignit, neexistuje standardně používaný screening. Byly provedeny studie, které zkoumaly například možnost použití rentgenu plic a cytologie sputa, avšak nebyly příliš výtěžné [4]. V současné době probíhají další studie se zaměřením na CT ve screeningu plicního karcinomu. Naproti tomu u karcinomu prsu je ve screeningu využívána například mamografie se sensitivitou až 88 % a specificitou až 98 % [5].

### 2.2 Etiologie a molekulární genetika u karcinomu plic

Důležitou úlohu při vzniku karcinomu plic představují onkogen supresorové geny (zvané také antionkogeny nebo recesivní onkogeny) a onkogeny. Jako onkogeny označujeme geny působící pomocí svých proteinových produktů na změnu buňky v nádorový genotyp. Opakem jsou onkogen supresorové geny, které mají protichůdné účinky. Jsou laicky řečeno „hodnými“ geny a jsou pro organismus velice důležitými, jelikož zabraňují buněčné transformaci a proliferaci. K poruše kontroly buněčného cyklu vede absence obou alel určitého supresorového genu, změna jejich struktury nebo inaktivace jimi kódovaného proteinu. Všechny tyto příčiny dávají možnost vzniku transformace v maligní buňku [6].

Prvním objeveným supresorovým genem byl retinoblastomový gen (Rb-gen) a jeho produkt Rb-protein, který s dalším proteinem p53 funguje jako „zpětná brzda“ buněčného dělení. Jestliže dojde ke změně molekuly Rb proteinu, dojde k uvolnění faktoru E2F, který adheruje na DNA a způsobí syntézu proteinů nutných pro vstup do S fáze (např. thymidinkinázy, thymidylátsyntázy,

DNA-polymerázy, cyklinu E nebo cyklinu A). Pokud dojde k poruše cyklu v tomto místě, přecházejí buňky samovolně do S fáze. Tento mechanismus byl zjištěn u téměř všech vzorků malobuněčného a u přibližně 30 – 40 % nemalobuněčného karcinomu [6].

Dalším supresorovým genem je p53 lokalizovaný na 17 chromosomu. Jeho protein p53 je klíčovým regulačním faktorem apoptózy a buněčného cyklu. Změněný gen p53 neumožňuje expresi proteinu p21, proto p21 působí negativně, tedy jako inhibitor komplexu cyklin E-cdk-2, čímž zamezí přechodu buňky do S fáze buněčného cyklu. Z fyziologických funkcí proteinu p53 je třeba zmínit zvýšení produkce reaktivních forem kyslíku a dusíku, mající za následek poškození mitochondrií. P 53 stimuluje expresi proteinu bax, velmi důležitého při apoptóze, pozitivně stimuluje transkripční faktor ERG-1, který je považován za významného činitele při diferenciačních procesech. Poškozením nebo mutací genu p53 dochází k přesně opačným procesům, tj. inhibici diferenciace, apoptózy a zrychlení proliferace. „Ruku v ruce“ s poškozením p53 přichází i defekt proteinu p21, tím pádem snížení exprese proteinu bax, jak již bylo zmíněno, odpovědného za apoptózu.

Protoonkogenem označujeme gen ve zdravých buňkách kódující protein, který reguluje buněčný růst nebo proliferaci. V důsledku mutace či chybné exprese z tohoto protoonkogenu vznikne onkogen a jeho produktem je onkoprotein. Jedním z nejdůležitějších onkogenů u rakoviny plic je K-ras onkogen, lokalizovaný na chromozomu 6 [7]. Při mutaci K-ras dochází k záměně aminokyseliny glycinu za valin, což má za následek extrémní stimulaci proliferace buňky. K-ras onkogen bývá někdy označován zkratkou KRAS2 (Kristen RAAt Sarcoma 2 viral oncogen). Gen K-ras kóduje protein zvaný GTP, který je zodpovědný za přenos signálu u proteinkinázy. Je přitom patrný rozdíl v typu mutace u kolorektálního karcinomu a karcinomu plicního. Z toho lze usoudit, že velký vliv zde má i působení exogenních činitelů (např. kouření, radon). U nemalobuněčného plicního karcinomu je K-ras onkogen aktivován jen v 15 – 20 %, nejčastěji ho můžeme zjistit u adenokarcinomů v 30 % [6]. Několik studií potvrdilo, že mutace K-ras onkogenu je negativní nezávislý prognostický faktor u pacientů po kompletní resekci plicního karcinomu [6,7].

Dalšími neméně důležitými onkogeny jsou Myc onkogeny. Mezi ně patří c-myc, N-myc a L-myc, které zodpovídají za transkripční faktor pro fosfoprotein. Gen c-myc je lokalizován na chromozomu 8, jeho aktivace probíhá overexpresí nebo amplifikací genu. Účinkem c-myc je zvýšená proliferační aktivita buňky a jeho produkt brání přechodu buněk z cyklu do fáze G<sub>0</sub>. C-myc se vyskytuje u nemalobuněčného i malobuněčného karcinomu plic. Zatím se jen uvažuje, že výskyt tohoto genu může být spojen s rezistencí na chemoterapii a jeho zvýšená exprese spojena s relapsem nádorového onemocnění [6,8,9]. Další onkogeny N-myc a L-myc se vyskytují

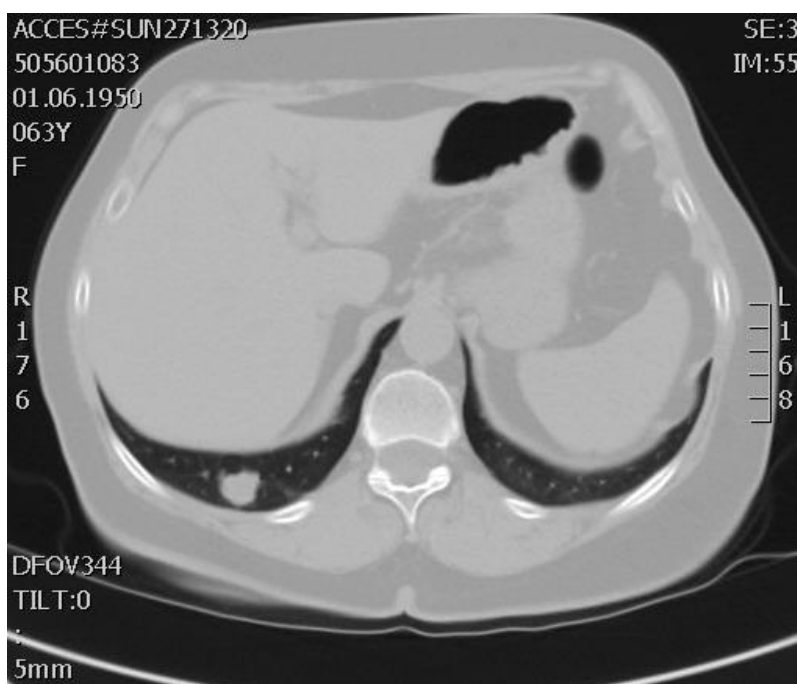
pouze u malobuněčného plicního karcinomu a jsou spojeny s jednoznačně horší prognózou [6,10,11].

### 2.3 Diagnostické metody

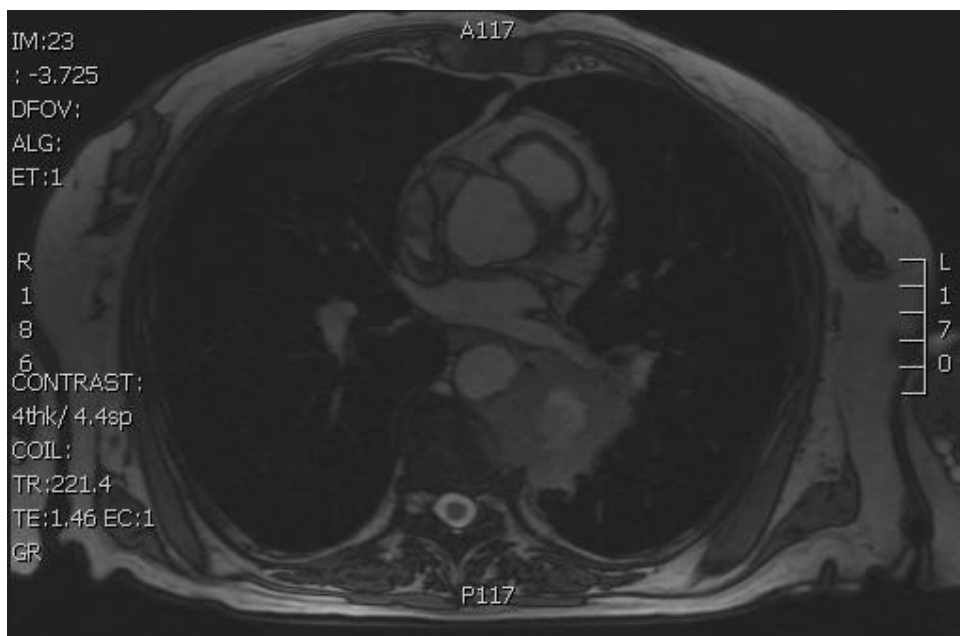
K diagnostice plicního karcinomu lze dnes využít celou škálu vyšetřovacích metod. Své místo si stále zachovává klasický rentgen (RTG) hrudníku, který nadále zůstává i nečastěji využívanou radiologickou vyšetřovací metodou. Bohužel jeho největší slabinou stále zůstává malé prostorové rozlišení způsobené sumačním zobrazením trojrozměrného objektu. Tyto nevýhody naopak nemá počítačová tomografie (CT) s vysokým rozlišením (HRCT) (obr. č. 1), kterou lze dnes považovat za základní vyšetřovací metodu u plicních nádorů. Pomocí CT lze s velkou přesností stanovit T, N i M klasifikaci nádoru.

T parametr lze pomocí HRCT stanovit poměrně přesně, jakkoliv k verifikaci infiltrace okolních struktur a orgánů je někdy lepší využít magnetickou rezonanci (MRI) (obr. č. 2), která poskytuje přesnější informaci o hranici tumorosní invaze. Za pozitivní mediastinální uzliny se považují ty, které jsou větší než 10 mm ve svém kratším diametru. Musíme si ale uvědomit, že zvětšené uzliny mohou provázet i benigní onemocnění nebo jiné malignity. Falešně negativních může být až 10 % nezvětšených uzlin. Dle Detterberka a Toloza lze zcela eliminovat falešnou pozitivitu či negativitu kombinací CT a pozitronové emisní tomografie, doplněnou o biopsii, nejpřesněji pomocí mediastinoskopie nebo alespoň cestou bronchoskopické punkce [12,13].

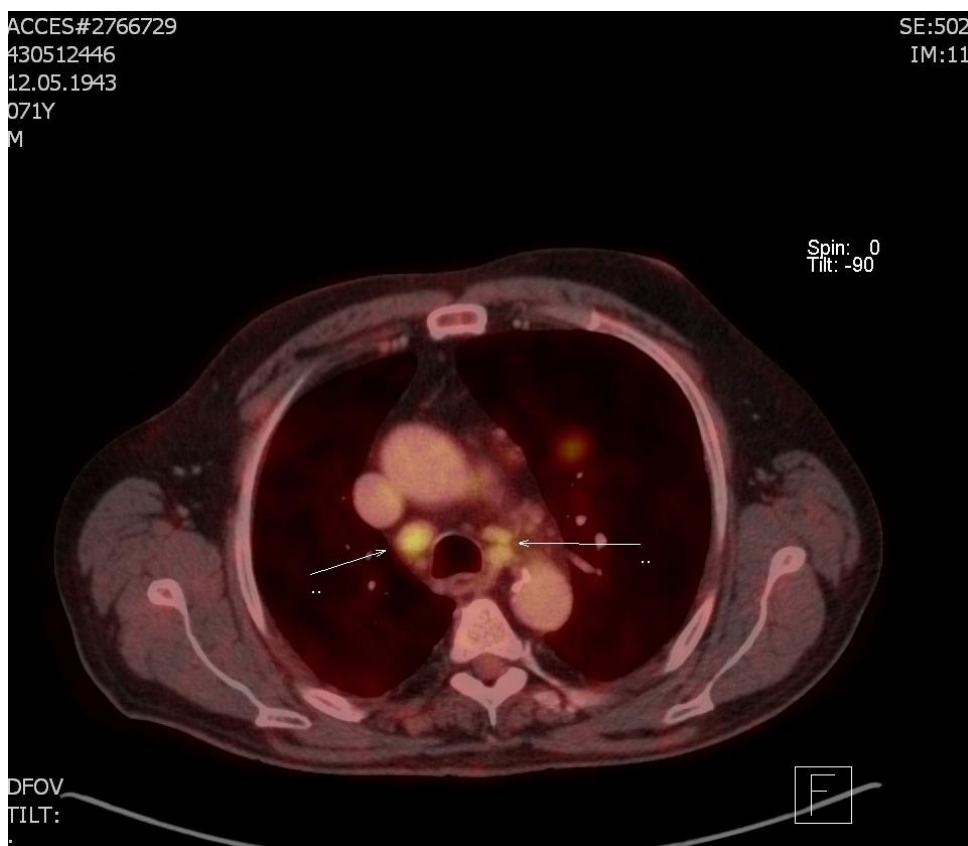
Obr. č. 1: CT obraz karcinomu dolního laloku pravé plíce



Obr. č. 2: MRI potvrzená infiltrace aorty karcinomem plic

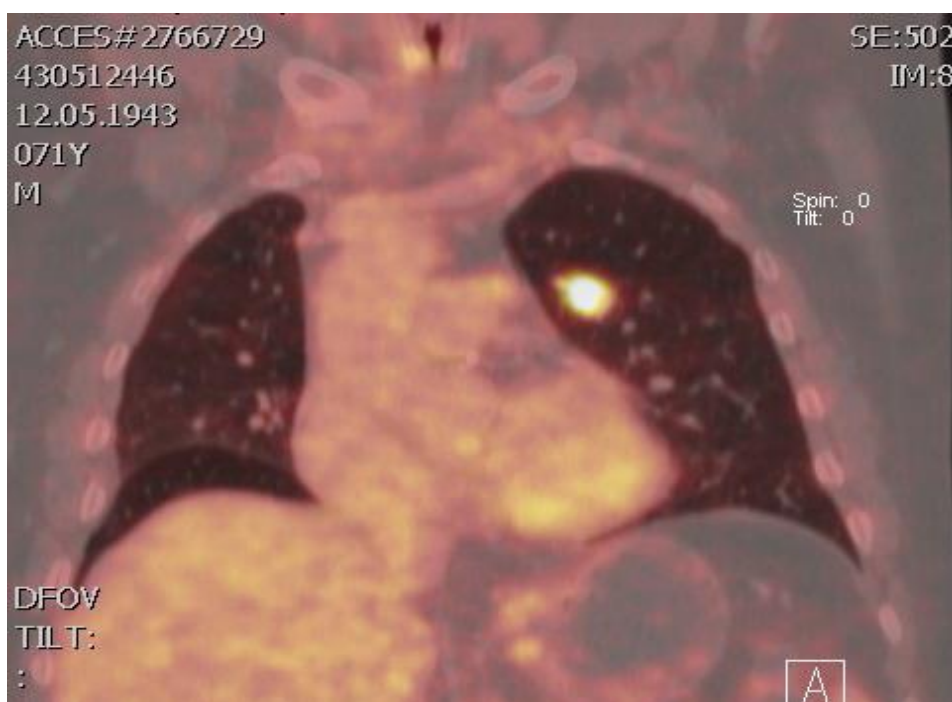


Obr. č. 3: PET/CT obraz pozitivních paratracheálních uzlin (skupiny 4R,L) u karcinomu plic



Pozitronová emisní tomografie (PET-CT) s využitím 18-fluorodeoxyglukózy (FDG) má zcela zásadní význam pro diferenciaci mezi maligním a benigním nádorem. Základním principem je vysoká akumulace fluorodeoxyglukózy v nádorových buňkách (obr. č. 3, 4). U lézí větších než 15 mm v průměru, u kterých nedochází k vychytávání radiofarmaka, se jedná s největší pravděpodobností o benigní lézi, senzitivita je kolem 95 %. Granulomatózní onemocnění, postradiační pneumonitida a čerstvé jizvy bývají jedny z nejčastějších příčin falešně pozitivního nálezu. Falešně negativní se objevují u tumorů, kdy jejich rozměr je menší než 10mm nebo u tumorů, které mají nízký metabolický potenciál, mezi které patří karcinoid a bronchoalveolární karcinom [14]. Wahidi et al. uvádí na základě metaanalýzy 17 studií, které se zabývaly hodnocením nádorů plic, že PET CT je charakterizováno vysokou senzitivitou (80-100 %), ale bohužel specifita je příliš variabilní (mezi 40 – 100 %) [15]. Novinkou v diagnostice je použití 18F-FLT-PET/CT (18F-fluorothymidinu). Rozdíl oproti použití 18F-FDG spočívá v rozlišení mezi zánětlivým a maligním onemocněním [16].

Obr. č. 4: PET CT obraz karcinomu horního laloku levé plíce



Mezi semiinvazivní vyšetřovací metody patří na prvním místě bronchoskopie. Je to velice důležitá pneumologická disciplína, kterou využívá řada oborů. Používá se nejen v diagnostice maligních plicních procesů, ale i u benigních plicních onemocnění. Indikace k bronchoskopii bývá stanovena nejčastěji na podkladě podezřelého nálezu zobrazovacích vyšetřovacích metod. Mezi invazivní bronchoskopické metody, pomocí kterých lze získat diagnostický materiál, patří odběr sekretu

speciálním katétrem, výplach bronchu – laváž, biopsie speciálními endoskopickými klíšťkami a transtracheální či transbronchiální punkce, popřípadě pomocí endobronchiální sonografické navigace (viz níže). Dalším důležitým aspektem metody je možnost využití pomocných navigačních metod, které upřesní lokalizaci patologického ložiska. Autofluorescenční bronchoskopie se využívá k diagnostice časných malignit a premaligních lézí na podkladě změny aktivity chromoforů, obsažených zejména v submukóze. Autofluorescenční bronchoskopie je založena na principu poklesu autofluorescence v místě ranných maligních afekcí (dysplazie, ca in situ), který lze detekovat po osvětlení světlem o určité vlnové délce, např. 442 nm produkovaného helium-cadmiovým laserem. Pokles autofluorescence má nejvyšší hodnoty v zelené oblasti viditelného světla a je na monitoru patrný v podobě červenohnědých skvrn obklopených normální zelenou barvou nezměněné sliznice. Handicapem fluorescence je ovšem nespecifičnost nálezů dysplazie, těžké dysplazie nebo karcinomu in situ. U 16 % pacientů se zánětlivě změněným epitelem dochází k metaplazii, až u 30 % se z hyperplazie či metaplazie vyvíjí mírná až střední dysplazie a asi u 37 % se z těžké dysplazie vyvine karcinom in situ. U 55 – 80 % karcinomů in situ dochází k zvrátu v invazivní karcinom [17].

Další novou metodou je bronchoskopie s úzkým svazkem světla (narrow band imaging), která využívá tři druhy vlnové délky (modrá, zelená a červená), kdy podle odrazů světla lze určit jednotlivé vrstvy sliznice, a tedy posoudit stupeň invaze léze a zároveň zacílit místo biopsie, a tudíž zvýšit přesnost biopsie dané léze [18].

Zvyšování výtěžnosti bronchoskopických metod je možné díky zavedení endobronchiální sonografie (EBUS). Mohou být použity dva druhy sond. První je sonda radiální, která se zavádí pracovním kanálem přímo k periferním tumorům. Druhým systémem je lineární sonda, která je součástí bronchoskopu. Zde se pracovním kanálem zavádí jehla, kterou je možné provést punkci mediastinálních uzlin, což lze využít ke zpřesnění stagingu karcinomu plic, a to šetrněji než pomocí chirurgické mediastinoskopie [19,20]. Podle některých prací lze možno pomocí EBUS s biopsií dosáhnout minimálně stejných či i lepších výsledků jako při mediastinoskopii v rámci předoperačního posouzení N2 a N3 mediastinálních uzlin [21].

Samostatnou problematiku představuje u plicního karcinomu, tak jako u jiných solidních malignit, problematika onkomarkerů. U karcinomu plic můžeme zjistit zvýšenou hladinu karcinoembryonálního antigenu (CEA). U nemalobuněčných karcinomů bývá zvýšeno CYFRA-21 (solubilní fragment cytokeratinu 19), TPA (tkáňový polypeptidový specifický antigen), CEA (karcinoembryonální antigen) a někdy NSE (neuron specifická enoláza). Oproti tomu u malobuněčného karcinomu je zvýšená hladina onkomarkerů pro-gastrin-releasin peptide (ProGRP) a NSE. Hlavní význam těchto onkomarkerů spočívá v možnosti monitorování hladin v průběhu léčby a dalšího sledování nemocného. Zvýšení hladiny totiž může signalizovat relaps

či progresi onemocnění, bohužel na ně však nelze plně spoléhat z důvodu nedostatečné specifity a možného výskytu i u jiných nádorů [22]. Jejich význam pro primodiagnostiku plicního nádoru je pak zcela zanedbatelný.

## 2.4 Staging karcinomu plic

Rozsah nádorového onemocnění se hodnotí dle celosvětově platného systému TNM, z nějž jsou odvozována jednotlivá klinická stádia. Výhodou TNM klasifikace je použitelnost skoro u všech solidních malignit, výjimku tvoří hlavně malignity hematologické. TNM klasifikace patří mezi základní popis nádoru, kde parametr T popisuje velikost, parametr N postižení lymfatických uzlin a parametr M přítomnost vzdálených metastáz. Pomocí TNM klasifikace je možné stanovit jak **staging** (stanovení klinické pokročilosti onemocnění), tak i **grading** (stupeň diferenciacie nádoru). Dalším neméně důležitým pojmem je **typing**, který určuje histologický typ nádoru. Při určení TNM na základě klinického vyšetření vždy každé písmeno označujeme symbolem „c“. Označení TNM symbolem „p“ vyjadřuje, že klasifikace byla provedena na podkladě vyšetření patologem, což je pochopitelně nejpřesnější.

Pro plicní karcinomy byla poprvé tato klasifikace vytvořena v roce 1973 na souboru 2155 pacientů v univerzitní nemocnici ve městě Houston [23]. Další revize byly provedeny v roce 1997. Od roku 1999 byly změny v TNM klasifikaci prováděny pouze Mezinárodní asociací pro studium plicní rakoviny (IASLC). Do roku 2010 platila 6. verze klasifikace plicních nádorů. Nyní již od roku 2011 platí v ČR zcela nová verze klasifikace (tab. č. 1) vypracovaná Mezinárodní unií proti rakovině (UICC) a Americkým výběrem proti rakovině (AJCC) jakožto revize číslo 7, vydána byla v roce 2009 [23,24].

Nová klasifikace rozlišuje 5 skupin nádoru s velikostmi 2, 3, 5 a 7 cm. Oproti staré klasifikaci, platné do roku 2010, kde byl satelitní nádorový uzel ve stejném laloku hodnocen už jako T4, je v nové klasifikaci hodnocen jako T3. Nádor, infiltrující mediastinální struktury pod pleurou či perikardem, je klasifikován jako T4. Maligní pleurální výpotek je hodnocen jako M1. Pleurální diseminace a postižení uzlin v druhostranné plíci jsou klasifikovány M1a a vzdálené metastázy jako M1b [25]. Pomocí parametrů TNM klasifikace jsou určena jednotlivá stádia plicního karcinomu [23,26,27] (tab. č. 2).

Pro malobuněčný karcinom se v klinické v praxi používá zjednodušená klasifikace dle VALG (Veterans Administration Lung Cancer study Group) [28]:

1. limitované stádium (LD – limited disease) – definováno jako postižení pouze jednoho plicního křídla s postižením ipsilaterálních uzlin a bez postižení kontralaterálních mediastinálních uzlin nebo supraklavikulárních a s či bez jednostranného pleurálního výpotku.
2. extenzivní stádium (ED – extensive disease) – všechny ostatní formy.

Dřívější klasifikace rozděluje plicní karcinom podle růstových a morfologických vlastností na řadu subtypů. Podle histologického hlediska dělíme plicní karcinom na základní subtypy: malobuněčný plicní karcinom (small cell lung cancer – SCLC) a nemalobuněčný plicní karcinom (non-small cell lung cancer – NSCLC). Toto rozdělení je zcela zásadní pro léčebnou strategii. Toto rozdělení bylo v dřívějších dobách dostačující, ale v dnešní době, kdy byly zavedeny nové léčebné postupy, je nezbytné přesnější dělení. Odlišení adenokarcinomů od spinocelulárních karcinomů umožňuje nastavit individuální léčbu s co možná největším účinkem a s minimem možných nežádoucích komplikací.

SCLC je většinou v době diagnózy již systémovým onemocněním, jelikož časně metastazuje jak lymfogenní, tak i krevní cestou. Oproti tomu NSCLC má v počátečním stádiu lokální charakter proliferace, roste pomaleji a preferuje lymfogenní cestu šíření metastáz. SCLC zpočátku dobře reaguje na chemoterapii, ale posléze se stává rezistentním a nemocný během několika měsíců zmírá. U NSCLC je odpověď na onkologickou léčbu oproti SCLC horší, zde však chirurgická léčba u nemocných radikálně odoperovaných poskytuje uspokojivou šanci na pětileté přežívání. Proto je nesmírně důležité určení histologického typu plicního nádoru pro další strategii léčby.



Tab č. 1: TNM klasifikace plicního karcinomu (UICC,AJCC 2009)

<b>T (velikost nádoru)</b>		
TX	Primární nádor nelze hodnotit, nebo průkaz na základě přítomnosti maligních buněk ve sputu nebo bronchiálním výplachu, ale není viditelný zobrazovacími vyšetřovacími metodami či	
T0	Bez známek primárního nádoru	
Tis	Karcinom in situ	
T1a	Nádor o velikosti ≤ 2 cm	T1 - Tumor 3 cm v nejdelším průměru, obklopen plicí nebo viscerální pleurou, bez bronchoskopických známek invaze proximálně od lobárního bronchu
T1b	Nádor o velikosti > 2 cm ale ≤ 3 cm	
T2a	Nádor o velikosti > 3 cm ale ≤ 5 cm	T2 - Tumor postihuje hlavní bronchus ≥ 2 cm od kariny; postihuje viscerální pleuru; je sdružen s atelektázou nebo pneumonií za stenózou, která nezasahuje celou plicí
T2b	Nádor o velikosti > 5 cm ale ≤ 7 cm	
T3	Nádory větší než 7 cm s přímým šířením do hrudní stěny nebo bránice, mediastinální pleury, parietálního perikardu. Tumor postihující hlavní bronchus 2 cm distálně od kariny, bez postižení kariny; nebo je sdružen s atelektázou, postihující celou plicí; nebo nádory s dalšími uzly ve stejném laloku jako primární nádor.	
T4	Tumor jakékoliv velikosti s invazí do: mediastina, srdce, velkých cév, průdušnice, jícnu, těl obratlů nebo kariny; nebo nádorové uzly v jiném laloku stejnostranné plíce	
<b>N (postižení regionálních lymfatických uzlin)</b>		
NX	Regionální mízní uzliny nelze hodnotit	
N0	V regionálních mízních uzlinách nejsou metastázy	
N1	Metastázy ve stejnostranných peribronchiálních a/nebo stejnostranných hilových uzlinách intrapulmonálních uzlinách, včetně postižení přímým šířením	
N2	Metastázy ve stejnostranných mediastinálních a/nebo subkarinálních mízních uzlinách	
N3	Metastázy v druhostranných mediastinálních, druhostranných hilových, stejnostranných či druhostranných skalenických nebo supraklavikulárních mízních uzlinách	
<b>M (vzdálené metastázy)</b>		
MX	Vzdálené metastázy nelze hodnotit	
M0	Nejsou vzdálené metastázy	
M1a	Metastázy v druhostranné plicí, rozsev na pleure nebo perikardu, maligní výpotek	M1 Vzdálené metastázy
M1b	Metastázy ve vzdálených orgánech	

Tab č. 2: TNM klasifikace plicního karcinomu (UICC, AJCC 2009)

<b>T / M</b>	<b>Podskupina</b>	<b>N0</b>	<b>N1</b>	<b>N2</b>	<b>N3</b>
<b>T1</b>	T1a	Ia	IIa	IIIa	IIIb
	T1b	Ia	IIa	IIIa	IIIb
<b>T2</b>	T2a	Ib	IIa	IIIa	IIIb
	T2b	IIa	IIb	IIIa	IIIb
<b>T3</b>	T3 >7 cm	IIb	IIIa	IIIa	IIIb
	T3 invazivní	IIb	IIIa	IIIa	IIIb
	T3 satel. Ložisko	IIb	IIIa	IIIa	IIIb
<b>T4</b>	T4 invazivní	IIIa	IIIa	IIIb	IIIb
	T4 stejnostranné uzliny	IIIa	IIIa	IIIb	IIIb
<b>M1</b>	M1a druhostranné uzliny	IV	IV	IV	IV
	M1a Pleurál. diseminace	IV	IV	IV	IV
	M1b	IV	IV	IV	IV

V posledním desetiletí dochází ke zvyšování počtu adenokarcinomů na úkor spinocelulárního karcinomu, pravděpodobně z důvodu poklesu počtu kuřáků a narůstajícímu počtu nekuřáků, u kterých převažuje právě adenokarcinom. Dle Národního onkologického registru z roku 2009 u mužů bylo zjištěno 39 % spinocelulárních karcinomů, u žen pak 23 %. Adenokarcinomy u mužů dosahují 15 – 16 %, u žen 25 %, tyto hodnoty jsou vyšší než v minulých letech, ale pořád nedosahují světového průměru, který činí u mužů 24 % a u žen 46 % [29].

Základní histopatologické rozdělení stupně diferenciacie se dělí do čtyř skupin (tab č. 4).

Tab č. 3: WHO klasifikaci epiteliálních plicních nádorů

<p><b>Spinocelulární karcinom</b></p> <p>papilární světlobuněčný malobuněčný bazaloidní</p>
<p><b>Adenokarcinom</b></p> <p>adenokarcinom, smíšený subtyp acinární adenokarcinom papilární adenokarcinom bronchioalveolární adenokarcinom (lepidický)     nemucinózní     mucinózní     smíšený solidní adenokarcinom s hlenotvorbou fetální adenokarcinom mucinózní (koloidní) adenokarcinom mucinózní cystadenokarcinom adenokarcinom z prstenčitých buněk světlobuněčný adenokarcinom</p>
<p><b>Velkobuněčný karcinom</b></p> <p>velkobuněčný neuroendokrinní karcinom bazaloidní karcinom lymfoepiteliomu podobný karcinom světlobuněčný karcinom velkobuněčný karcinom s rhabdoidním fenotypem</p>
<p><b>Malobuněčný karcinom</b></p> <p>kombinovaný malobuněčný karcinom</p>
<p><b>Adenoskvamózní karcinom</b></p>
<p><b>Sarkomatoidní karcinom</b></p> <p>pleiomorfní karcinom vřetenobuněčný karcinom obrovskobuněčný karcinom karcinosarkom pulmonální blastom</p>
<p><b>Karcinom typu slinných žláz</b></p> <p>mukoepidermoidní karcinom adenoidně cystický karcinom epiteliálně myoepiteliální karcinom</p>

Tab. č. 4: Grading

GX (grade X)	Stupeň diferenciacie nelze určit
G1 (grade 1)	Dobře diferencovaný
G2 (grade 2)	Středně diferencovaný
G3 (grade 3)	Málo diferencovaný
G4 (grade 4)	Nediferencovaný

## 2.5 Možnosti léčby karcinomu plic

Léčba karcinomu plic je principiálně multimodální, ovšem jedinou potencionálně kurativní metodou zůstává chirurgická resekce, doplněná o radikální lymfadenektomii.

Kurativní resekce bývá celosvětově bohužel možná pouze u 20-25 % pacientů s karcinomem v době stanovení diagnózy, v České republice je to pouze 10-17% [30]. Ve stádiu I přežívá 5 let jen 57 – 78 % pacientů, pětileté přežití ve stádiu II je mezi 39 – 66 %, ve stádiu IIIA v rozmezí 23 – 33 %, ve stádiu IV je pětileté přežití výjimečné [31].

K recidivám onemocnění dochází i přes adekvátní léčbu asi u 30 % pacientů ve stádiu I a II. V 70 % se jedná o recidivu systémového onemocnění, které i přes intenzivní léčbu způsobí smrt pacienta [32].

### 2.5.1 Chirurgická léčba

První doložené záznamy v literatuře o resekci gangrenózní plíce pocházejí z 15. století, kdy ji měl vykonat Rolando z Parmy. Rolandův pacient výkon přežil, ovšem jinak byly výsledky operací plic v pionýrských dobách většinou tristní. Postupně se vyvíjela operační technika, hrudní drenáž a anestezie nemocných. První zmínka o chirurgické léčbě karcinomu plic pochází z konce 19. století, kdy Pean provedl atypickou plicní resekci pro karcinom plic. Postupem času se dospělo k metodě volby, kterou se stala anatomická plicní resekce, avšak tyto operace byly zatíženy stále velkou letalitou, dokonce až 70 %. Operace byly zprvu prováděny jako dvoudobé, v první době byla provedena pleuroabraze nebo pleurektomie k navození pleurodýzy. V druhé době následovala anatomická resekce, založená na principu podvazu cévní stopky plíce pryžovou hadičkou, která způsobila ischemizaci a nekrózu plíce a následně její odloučení. Tato nekróza byla ovšem bohužel zpravidla spojená se vznikem bronchopleurální píštěle, jejíž důsledky měla řešit předem navozená pleurodýza, jelikož v tomto případě se dostával vzduch a infekční materiál

jen do operační rány, nikoliv do pleurální dutiny. První lobektomii, tak jak ji známe dnes, tedy se selektivním uzávěrem hilových struktur, provedl Davies v roce 1912. Nissen roku 1930 provedl úspěšně první pulmektomii, která byla v této éře považována za kurativní metoda první volby u karcinomu plic. Operace menšího rozsahu byly prováděny jen u pacientů s nízkou funkční plicní rezervou. Teprve po roce 1945 je jako adekvátně radikální resekcí výkon považována lobektomie. Nejvýznamnější postavou hrudní chirurgie v Čechách a na Moravě byl prof. Diviš, který jako první na světě v roce 1926 provedl plicní metastazektomii [33].

Postupně se zdokonolovala operační technika, vyvíjely se nové nástroje sloužící k uzávěru bronchu, až do dnešní podoby staplerů. Ruku v ruce se zavedením laparoskopie se postupně rozvíjela torakoskopie. Poprvé provedl torakoskopii Jacobus v roce 1910 [34]. Jednalo se zprvu pouze o diagnostickou metodu, ovšem s přibývajícím zkušenostmi byla snaha ji použít k provedení chirurgických intervencí a posléze i kurativní operaci pro bronchogenní karcinom. První videoasistovaná lobektomie pro plicní karcinom byla provedena v roce 1992 [35]. Následné roky znamenaly velký rozvoj této operační techniky. V současné době šel vývoj tak daleko, že např. kodaňské pracoviště Henrika J. Hansena provádí až 70 – 80 % všech anatomických resekcí pro karcinom plic touto operační metodou [36], v rámci celého Dánska se takto provádí až 70 % resekcí. To jsou ovšem poměrně extrémní čísla, která nemají ve světě obdoby. Obecně je metoda VATS resekcí stále spíše ve stádiu zavádění do běžné klinické praxe. Proběhlo několik studií, které srovnávaly VATS lobektomie versus torakotomické lobectomie, ve většině případů vždy vyšly výsledky ve prospěch VATS lobektomií [37]. Souhrnné výsledky z celé Evropy, hlavně ze států s vysokým hrubým domácím produktem, v roce 2014 publikoval Bequm. Výrazně narůstá počet VATS lobektomií z 10,7 % mezi roky 2007 – 2008 na 18,7 % mezi 2010 – 2012. Uvádí, že dokonce VATS lobektomie je po součtu všech nákladů levnější operační metodou, než klasicky provedená lobektomie a zároveň lze dosáhnout stejné úrovně onkologické radikality jako při klasické operaci. Největším benefitem pro pacienty je navíc výrazné zkrácení doby hospitalizace, snížení pooperační bolesti a brzké začlenění pacienta zpět do sociálního života [38]. V České republice bohužel tento nový trend není zcela následován, stále převažuje klasická operační technika, ojedinělé pokusy o rozjezd VATS programu byly vždy pozastaveny či omezeny v důsledku vysokých nákladů v našich podmínkách na operaci. Snad časem dospějeme k tomu, abychom následovali trend ostatních ekonomicky rozvinutých zemí západní Evropy. Zatím stále lze říct, že nám vlak neujel, ale začíná se rozjíždět!

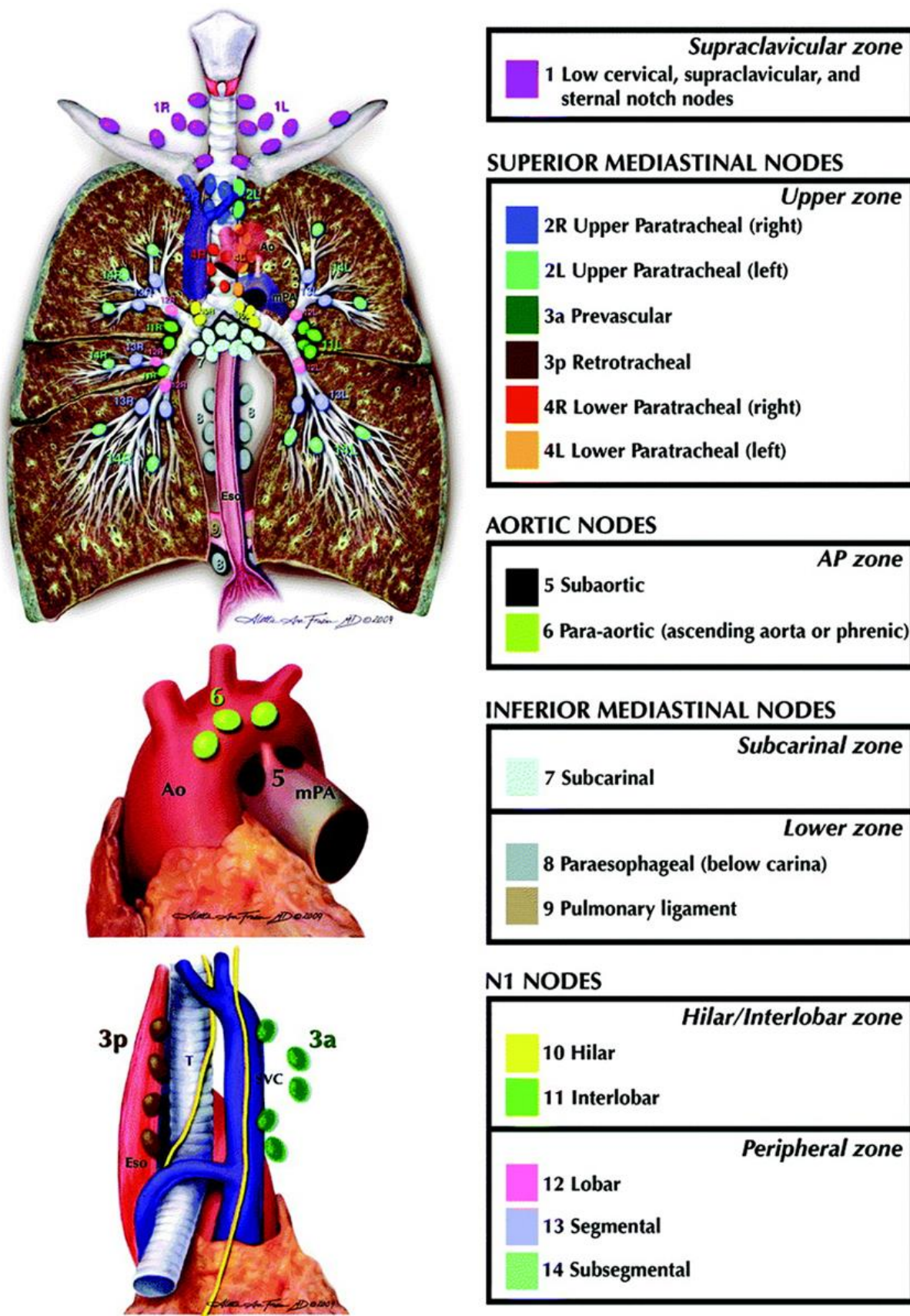
Před začátkem léčby karcinomu plic je nutné pacienta zařadit do příslušného stádia choroby podle TNM klasifikace, jelikož podle stávajících kritérií je to stěžejní parametr, rozhodující o indikaci nejvhodnějšího způsobu terapie. Předoperační staging (cTNM) se ovšem může lišit

od definitivního stádia, zjištěného po provedené plicní resekci, a to na základě histologického vyšetření odebraných tkání a především vyšetření odstraněných uzlin (pTNM). Shoda v pooperačním pTNM a předoperačním cTNM se pohybuje kolem 50 – 70 % [39].

Postupem se času se dospělo k jednoznačnému závěru, že nemalobuněčný karcinom plic metastazuje nejprve lymfatickou cestou. Jednotlivé uzliny bývaly považovány za filtr, který brání dalšímu šíření nádorového onemocnění. Již v roce 1951 Cahan ve své práci popisoval nutnost extensivní radikální disekce lymfatických uzlin jako součásti plicní resekce [40]. Dnes již ovšem víme, že příslušné uzliny určité úrovně mohou být metastazujícími nádorovými buňkami obejity skrze různé spojky a buňky tak mohou „přeskočit“ o etáž výše, tedy že existují tzv. „skipping metastázy“. Uzliny v podstatě nejsou součástí aktivní obrany vůči nádorovému postižení, ale zjištění jejich postižení slouží především jako ukazatel pokročilosti onemocnění a je tedy důležitým ukazatelem pokročilosti nádorového onemocnění a jeho prognózy, který zásadně ovlivňuje volbu dalšího léčebného postupu i jeho výsledky.

Pro zhodnocení lymfatického metastatického postižení bylo nutné především sjednotit klasifikaci lymfatických uzlin plic a mediastina, což umožnilo porovnání výsledků jednotlivých prací, zabývajících se dopadem lymfatického metastatického postižení na výsledek terapie plicního karcinomu. První klasifikace plicních a mediastinálních lymfatických uzlin byla vypracována Narukem [41]. Jeho klasifikace byla zařazena do TNM klasifikace Union Le Cancer v roce 1980. Postupně byla klasifikace přepracována, především Mountainem [42], až po současnou verzi z roku 2009 od The International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC) [43]. Provedené analýzy prokázaly, že k preciznímu zhodnocení uzlinového postižení je třeba vyšetřit uzliny z 6 uzlinových skupin: periferní (skupiny 12-14) a hilová (skupiny 10-11) pro stanovení uzlin N1 a horní (skupiny 1-4) a dolní mediastinální (skupiny 8-9), aortopulmonální (skupiny 5-6) a subkarinální (skupina 7) pro stanovení uzlin N2. Při lokalizaci nádoru na pravé straně je nutná disekce uzlin paratracheálních (4R) a vlevo uzlin subaortálních a paraaortálních (5,6), disekce bifurkačních by měla být provedena bez ohledu stranové lokalizace tumoru [44], viz obr. č. 5.

Obr. č. 5: Klasifikace mediastinálních uzlin z roku 2009 od IASLC [23]



V průběhu doby bylo postupně popsáno několik způsobů disekce lymfatických uzlin, počínaje prostým samplingem, přes systematický sampling až po radikální lymfadenektomii. Prostý sampling, tj. odstranění pouze uzlin suspektních dle předoperačního CT vyšetření či podezřelých pooperačně, nedává přesnou odpověď na postižení uzlin dle jednotlivých etází a může výrazně zkreslit stážování nemoci. Přesnější je systematický sampling, tedy odstranění „vzorku“ uzlin z minimálně šesti předem definovaných skupin lymfatických uzlin.

Zvláštním způsobem ověření lymfatického metastazování je metoda biopsie tzv. sentinelové uzliny, tzn. nalezení a odstranění první spádové lymfatické uzliny (uzlin) od nádoru pomocí lymfatického trasování. Existuje přitom předpoklad, že je-li tato uzlina (uzliny) negativní, pak jsou negativní i uzliny vyšších úrovní. Proběhla řada studií, a to i na našem pracovišti, ale aplikace metody u plicního karcinomu se z praktického hlediska nejeví být příliš využitelná a výtěžnost této metody nebyla ověřena větším počtem pacientů [45,46].

Japonští autoři v čele s Asamurou v roce 1999 definovali pojem lobárně specifická lymfadenektomie. Principem jen respektování lymfatického šíření nádoru, tedy disekce 3 uzlin z plíce a 3 uzlin odebraných ze spádového mediastina [47].

V současnosti je za standardní součást plicních resekcí pro karcinom považována systematická (radikální) mediastinální lymfadenektomie, která umožňuje stanovit patologický staging nejpřesněji. U tohoto typu lymfadenektomie se provádí odstranění kompletní lymfatické a tukové tkáně z postižené mediastinální strany, viz obr. č. 6. Cílem není odstranění jednotlivých uzlin, ale „en bloc“ extirpace celého lymfatického systému. Tento typ disekce uzliny nám podává nepřesnější výpovědní hodnotu o stagingu nemoci. Dle guidelines ESTS (Evropské společnosti hrudních chirurgů) z roku 2006 je při plicní resekcii nezbytné odstranění alespoň 6 skupin lymfatických uzlin spolu s resekatem, ale nejlépe kompletní radikální disekce mediastinálního tuku s uzlinami v zóně horních a dolních mediastinálních uzlin, vlevo periaortálně. Samozřejmostí je i odstranění N1 uzlin, tedy disekce uzlin hilových, interlobárních a uzlin perifernějších, které jsou obvykle odstraněny s resekatem. Pokud N1 disekci opomineme, můžeme negativně ovlivnit i pooperační staging a tedy eventuální indikaci k další onkologické léčbě. Systematická mediastinální lymfadenektomie je nejnáročnějším typem lymfadenektomie, který je logicky spojen s větším výskytem komplikací a prodloužením operačního času [48]. Rozsáhlá prospektivní randomizovaná studie (American College of Surgery Oncology Group Z0030 Trial), která srovnávala systematickou lymfadenektomii a systematický sampling na souboru 1111 pacientů, ovšem nezjistila zvýšení výskytu pooperačních komplikací u systematické lymfadenektomie a ukázala nižší mortalitu než u systematického samplingu (0,78% vs. 2%), aniž se významně prodloužila doba operace a hrudní drenáže [49]. Nicméně,



i při provedení této radikální disekce lymfatického systému nelze potvrdit, že by tento výkon měl pozitivní vliv na prodloužení přežívání odoperovaných nemocných [50,51,52].

Obr. č. 6: Mediastinální lymfadenektomie pro ca horního laloku pravé plíce



Nezbytnou podmínkou chirurgické léčby je schopnost nemocného podstoupit plánovaný operační výkon s ohledem na ventilační rezervu, kardiální zdatnost a pokročilost vlastního onemocnění. Jak už bylo uvedeno, léčba plicního karcinomu je multimodální, proto by měla indikace operace vzejít ideálně z multioborového indikačního semináře, kterého by se měl účastnit hrudní chirurg, radiolog a pneumoonkolog.

U pacienta s karcinomem plic je tedy standardním chirurgickým výkonem anatomická plicní resekce (lobektomie, bilobektomie, pneumonektomie, sleeve resekce), doplněná o systematickou lymfadenektomii.

### **2.5.2 Typy anatomických resekcí**

Nejradikálnějším anatomickým resekcčním výkonem je pneumonektomie, při níž se odstraňuje celá plíce a kompletní přilehlá lymfatická tkáň. Ve 40. letech byla pneumonektomie považována z hlediska radikality za jediný adekvátní výkon. Dnes již ovšem víme, že pneumonektomie představuje pro nemocného značně mutilující výkon a obrovskou zátěž, a to hlavně pneumonektomie pravostranná, při níž dochází ke ztrátě 55 – 60 % vitální kapacity plic. Vyvíjí se plicní restriktce, která s časovým odstupem vede k rozvoji plicní hypertenze. V současné době se pneumonektomie nejčastěji provádí při centrálně uložených tumorech nebo tumorech, které

infiltrují celou plíci, nebo při nádorech zasahujících přes interlobární štěrbinu [53], tedy v situaci, kdy nelze jednoznačně využít některý z méně extenzivních resekcí výkonů. Prognóza těchto pacientů je obecně spíše horší. Počet prováděných pneumonektomií ovšem celosvětově, oproti stoupajícímu počtu lobektomií, jednoznačně klesá [54]. Například Fergusson popisuje změnu poměru lobektomií versus pneumonektomií z 7:3 na 9:1 během 30 let [55]. Tento trend v poklesu pneumonektomií na úkor zvýšení počtu lobektomií je sledován i v České republice, což dokládá velká sestava 1412 pacientů z ČR [56]. Obecně dnes tedy platí, že by poměr pneumonektomií k lobektomiím neměl přesahovat 10 %.

Bilobektomie může být provedena pouze na pravé straně, indikací je infiltrace vedlejšího interlobia nádorem nebo histologicky potvrzenou nádorovou infiltrací uzlin. Někteří autoři při infiltraci interlobárního lymfatického pediklu, tzv. „sump“ uzlin, z onkologického hlediska doporučují pneumonektomii. Jestliže však nemocný není schopen pneumonektomie v důsledku špatné ventilační rezervy, je možné provést i bilobektomii za předpokladu, že interlobární uzliny i další uzliny vyššího řádu budou odstraněny [57]. Lze rozlišit bilobektomii horní, kterou rozumíme resekci horního laloku spolu se středním, a bilobektomii dolní, kdy se resekuje dolní a střední lalok.

Již řadu let je nejčastějším výkonem v hrudní chirurgii lobektomie, která je dosud považována za zlatý standard při resekcí léčbě plicního karcinomu. Indikací pro lobektomii nemusí být ovšem jen maligní nádory, ale mohou to být i benigní onemocnění jako bronchiektázie či plicní absces, postihující značnou část laloku. Lobektomie je určena pro tumory malé či periferně uložené nebo pro centrálně rostoucí nádory, kdy by nemocní po respirační stránce nesnesli větší rozsah výkonu. U takových pacientů je nutné provést radikální resekci bez ponechání rezidua tumoru, čehož lze docílit pomocí lobektomie bronchoplastické a/nebo angioplastické.

Operaci začínáme provedením torakoskopie či torakotomie, kdy vyloučíme generalizaci nebo inoperabilitu nádoru. Při klasických otevřených resekcích volíme dle zvyklostí pracoviště buď posterolaterální či anterolaterální torakotomii, dle lokalizace tumoru je zvolena výše mezižebří. Při lokalizaci tumoru v horním laloku spíše volíme přístup dle fyziognomie nemocného čtvrtým, případně pátým mezižebřím. U centrálních tumorů volíme zpravidla páté mezižebří. Pokud je tumor lokalizován v dolním laloku, upřednostňujeme páté či výjimečně šesté mezižebří.

V první fázi je u otevřených resekcí je disekováno interlobium, kde se snažíme identifikovat plicní tepnu s jednotlivými větvemi. Příslušné tepny pro daný lalok ošetříme centrálně opichovou ligaturou nevstřebatelným vláknem a ještě podvazem. Následuje podvaz plicní žíly drénující příslušný lalok. Podvaz je třeba anatomicky správně umístit i se zohledněním případných anomálií v drenáži, jelikož chybným podvazem docílíme infarzace plíce se stázou žilní krve,

vyústující v nekrózu chybně ošetřeného laloku plíce. Analogická chyba u tepen naproti tomu sice vede k vyřazení respirační funkce plíce, ale není spojena se vznikem hemoragické infarzace, jelikož k udržení vitality plicní tkáně stačí přítok cestou bronchiálních tepen. Ošetření žíly je technicky obdobné jako u tepen. Bronchus pro daný lalok přetínáme v přiměřené vzálenosti od odstupu. Pahýl ošetřujeme několika možnými způsoby, buď staplery, což jsou speciálně vytvořené nástroje s řadou svorek, nebo pomocí ručně šitého uzávěru, který je vždy modifikován dle příslušného pracoviště. Na I. chirurgické klinice FNOL je upřednostňován nejčastěji ručně šitý uzávěr bronchu, v první vrstvě jednotlivými nevstřebatelnými stehy, s druhou vrstvou pokračujícím vstřebatelným stehem. Těsnost bronchu ověřujeme vodní zkouškou. Anesteziolog selektivně intubovanou plíci nafoukne a pokud je uzávěr bronchu vzduchotěsný, nedochází k úniku vzduchu z pahýlu bronchu ponořeného pod vodní hladinu. Následuje dokončení systematické lymfadenektomie dle jednotlivých etází.

Dle posledních studií dosahují otevřené lobektomie mortality 1 – 2 % a morbidity 32 – 37 % [58,37]. Jak již bylo uvedeno, současné trendy směřují k stále častějšímu prováděným VATS lobektomiím. S tímto výkonem je spojován i nižší počet komplikací, zkrácení doby hospitalizace, snížení operačního traumatu, nižší protizánětlivá reakci organismu, což dokládají četné studie [36,37,38,59,60]. S přibývajícím zkušenostmi klesá mortalita na 0,8 % a morbidita na 15,3 %. Tyto výsledky prezentoval McKenna na souboru 1110 pacientů, kteří podstoupili VATS lobektomii [61]. Všechny studie dokládají, že výsledky VATS lobektomii jsou přesvědčivé a tato metoda by se měla stát celosvětově metodou volby minimálně u plicních tumorů nižších stádií.

### ***2.5.3 Indikační kritéria chirurgické léčby pro jednotlivá stádia***

#### **Stádium I**

Do stádia I jsou řazeni nemocní bez postižení lymfatických uzlin s velikostí nádoru do 3cm. V tomto stádiu je podle platných guidelines indikována primární anatomická plicní resekce, tedy převážně lobektomie, doplněná o lymfadenektomii. Celková doba pětiletého přežívání je mezi 57 – 78 % [31]. V poslední době je však stále častěji diskutován pojem onkochirurgické akceptability sublobární resekce. V Evropě je sublobární resekce využívána převážně pouze u pacientů se špatnou ventilační rezervou, kteří by nebyli schopni zvládnout lobektomii. Několik studií popisuje porovnatelnou dobu přežívání u pacientů, kteří podstoupili sublobární resekci, s pacienty, kteří podstoupili klasickou lobektomii [62,63,64]. Fanova metaanalýza 24 studií ukázala totožné výsledky u sublobární resekce a lobektomie co se týče přežívání a rekurence onemocnění, ovšem musí být dodržena podmínka velikosti tumoru nepřesahující 2 cm [65]. To je velmi důležitá limitace, jelikož víme, že s přibývajícím velikostí zásadně narůstá schopnost

tumoru metastazovat. Významné zjištění ovšem přinesla metaanalýza 12 studií, publikovaná v roce 2014, kdy u pacientů ve stádiu IA při provedení sublobární resekce, zahrnující segmentektomii či klínovitou resekci, nalezla statisticky signifikantně zkrácené přežívání oproti nemocným, u kterých byla provedena lobektomie [66]. V současné době začíná u tohoto stádia být navíc jednoznačně doporučováno provedení lobektomie videoasistované.

I u pacientů v tomto stádiu radikálně odoperovaných dochází zhruba ve 30 % k recidivě onemocnění [32]. V 70 % se přitom jedná o systémové recidivy, které většinou i přes včasnou diagnostiku a adekvátní onkologickou léčbu dospějí k infaustnímu konci. Velké množství systémových recidiv v tomto stádiu nutí onkology se neustále zabývat otázkou, zdali neexistuje nějaké preklinické stádium diseminované choroby, které nelze běžnými metodami zachytit, ale při jeho časném zjištění by bylo možné časněji zasáhnout onkologickou léčbou. Rovněž by bylo velmi důležité dokázat vyselektovat skupinu nemocných s agresivním chováním nádoru a těmto podat adjuvantní onkologickou léčbu [67]. Ta totiž není obecně u pacientů ve stádiu IA indikována. U stádia IB dříve platilo to samé, avšak na základě nově publikovaných randomizovaných studií, které prokázaly prodloužení bezpříznakového intervalu a nárůst celkové doby přežití pacientů po podání chemoterapie, dochází ve stádiu IB ke změnám protokolů [68]. Určitou roli v podání chemoterapie může mít i velikost tumoru, kdy při velikosti nad 4 cm by měla být adjuvantní chemoterapie vždy podána [69]. V České republice je již doporučována aktuálně adjuvantní chemoterapie od stádia IB až po stádium III. Radioterapie je indikována pouze při pozitivní resekcí linii, tedy u neradikálně odoperovaných pacientů [69].

## **Stádium II**

Do tohoto stádia jsou řazeni nemocní T1, T2 s pozitivními uzlinami N1 či pacienti bez postižení uzlin s tumory T2b či T3, vždy bez postižení uzlin mediastina a vzdálených metastáz. Tito pacienti jsou také indikováni k primární chirurgické léčbě. Předoperační staging tohoto stádia je ovšem poměrně nepřesný vzhledem velkému počtu nadhodnocení či podhodnocení lymfadenopatie. Přesný závěr určuje až patologická klasifikace pTNM. Pětileté přežívání nemocných ve stádiu IIA se pohybuje 40 – 58 % a ve stádiu IIB 27 – 50 %. U neléčených nemocných je přežívání řádově několik měsíců. Prognóza se zhoršuje s počtem postižených uzlin, s rostoucí velikostí tumoru a jeho histologickým typem. Delší přežívání je statisticky prokázáno u nemocných s epidermálním typem karcinomu oproti nemocným s adenokarcinomem [70]. U karcinomů lokalizovaných v horním laloku pravé plíce je indikována lobektomie. Pokud je přítomna nádorová uzlinová infiltrace vedlejšího interlobia nebo tzv. sump uzliny, je nutné provést radikálnější výkon, kterým je horní bilobektomie. Horší je situace u nádorů dolních laloků a v případě uzlin infiltrujících interlobární štěrbinu, zde je nutné vždy vyšetřit peroperačně pozitivitu hilových uzlin. V případě negativity se lze spokojit s dolní

bilobektomií. V případě positivity je pak nutné provést pulmektomii. V rozhodnutí o provedení radikální pulmektomie nám také může pomoci histologická povaha nádoru, kdy se hlavně u adenokarcinomů snažíme být co možná nejradikálnější [71].

### **Pokročilá stádia indikovaná k chirurgické léčbě (IIIA, IIIB)**

Stádium IIIA zahrnuje především tumory s postižením N2 uzlin (T1–3), ale také nádory T3 N1 a T4 N0–1. Do stádia IIIB patří jakýkoliv tumor s postižením kontralaterálních mediastinálních uzlin (N3), případně tumory T4 N2.

Postižení N2 uzlin diagnostikujeme předoperačně pomocí zobrazovacích metod (CT, PET-CT), měly by být ovšem validovány histologicky z biopsie cestou EBUS nebo mediastinoskopie. Postižení N2 uzlin může být pochopitelně rovněž zjištěno až při pooperačním vyšetření odebraných uzlin při resekcčním výkonu. Nejhorší formu představuje tzv. bulky disease, kterou se rozumí masivní metastatické postižení N2 uzlin s výrazným makroskopickým obrazem lymfadenopatie. Pětileté přežívání u této formy je velice nízké, řádově 2 – 5 %. U minimálního postižení N2 uzlin, zjištěného zpravidla až při patologickém vyšetření definitivního preparátu je pětileté přežívání řádově 15 – 30 % [72]. Třebaže otázka primární chirurgické resekce ve stádiu IIIA je v současné době intenzivně diskutována, zatím obecně stále platí, že pacient s klinickým stádiem IIIA je k primární chirurgické resekcii indikován převážně jen tehdy, je-li mediastinoskopicky vyloučena pozitivita zvětšených či PET-CT aktivních uzlin mediastina. Výjimečně lze akceptovat 1 uzlinu s intrakapsulární metastázou. U pacientů s pozitivními uzlinami následuje tedy neoadjuvantní chemoterapie a po jejím ukončení se provede restaging, nejlépe s provedením remediastinoskopie, a nemocný je posléze indikován k operačnímu výkonu. Nemocní v tomto stádiu, léčení kombinací radiochemoterapie bez chirurgické resekce, mají pětileté přežití pouze 9 % [72]. Je tedy vidět, že, přes jasnou tendenci nádoru k diseminaci, chirurgická terapie má svůj smysl. Prognózu těchto nemocných předurčuje i počet postižených stanic uzlin. Při postižení pouze jedné stanice je pětileté přežívání 27,8 %, při postižení více stanic 9,3 % [73]. Standardní léčbou při pozitivitě N2 uzlin před operací je podstoupení neoadjuvantní chemoterapie s platinovým derivátem a následně absolvování operace, adjuvantní chemoterapie, a dále zvážení radioterapie, která sice neprodlouží přežívání, ale sníží riziko vzniku lokální recidivy. Četné postižení stanic uzlin N2 a bulky disease nejsou vhodné k chirurgické léčbě, u těchto pacientů by měla převažovat léčba nechirurgická [73,74]. Při podání neoadjuvantní chemoterapie lze zvýšit pětileté přežití z 17,9 % až na 27,3 % [75], při podání adjuvantní III. generace chemoterapeutik na bázi derivátů cis-platiny lze u nemocných po radikální resekcii zvýšit pětileté přežití na 37 % [76].

Pokud nelze u nemocných dosáhnout R0 resekce (bez mikroskopických či makroskopických reziduí nádoru), je třeba doplnit resekční výkon o radioterapii a chemoterapii, pokud ji nemocný neabsolvoval již před operací jako neoadjuvantní léčbu [73,75,77].

Primární chirurgická léčba ve stádiu IIIB s postižením uzlin nezaznamenala přínos v pětiletém přežívání. Proto je u těchto nemocných indikována indukční onkologická léčba. Poté lze provést restaging a ověření uzlin pomocí remediastinoskopie. V případě zásadní regrese či complete response, kdy lze hovořit o down stagingu a je technicky proveditelná R0 resekce, je možné uvažovat o provedení radikálního výkonu s rozšířenou radikální mediastinální lymfadenektomií. Pokud došlo i regresi plicního tumoru, vždy musíme dodržovat rozsah resekce jako před započítáním indukční léčby [78,79]. Po provedení operace a dodržení R0 resekce dochází k prodloužení pětiletého přežívání nemocných [80], terapii lze doplnit o další pooperační adjuvantní chemoterapii. Pokud nádor prorůstá do okolních struktur jícnu, velkých cév, srdce a obratlů (T4), lze vyselektovat skupinu pacientů s negativními uzlinami, kteří by z eventuální operace měli benefit a indikovat je k operaci, ale opět pouze v tom případě, kdy lze operací docílit R0 resekci. Po úspěšném provedení takového extenzivního výkonu lze zvýšit pětileté přežívání až na 20 % [81,82,83,84]. Rendina popisuje na souboru primárně inoperabilních pacientů, že po obdržení indukční chemoterapie, která obsahovala kombinaci 5-fluorouracilu a cis-platiny s konkomitantní radioterapií, byla při restagingu zjištěna u 54 % pacientů parciální odezva, a tedy tito nemocní byli následně indikováni k operaci. U zbylých nemocných došlo k progresi a chirurgickou léčbu již nebyli schopni podstoupit. Velké rozdíly byly v 5 letém přežití, které ve skupině operovaných pacientů bylo 38 % oproti 5,6 % ve skupině bez operace [85]. Neoadjuvantní kombinovanou léčbou lze tedy docílit zastavení progresse nádorového onemocnění či dokonce zlepšit resekabilitu nádoru. Pokud po této léčbě dochází alespoň k parciální regresi a jsme schopni docílit R0 resekce, měli bychom nemocné vždy indikovat k operaci.

#### **Stádium IV**

Tato skupina zhrnuje pacienty s jakýmkoliv hodnotami parametrů T a N, ovšem s přítomností vzdálených metastáz. I zde je oproti létům minulým patrný posun v přístupu. V této fázi nádorového onemocnění je indikována chemoterapie, která vede k prodloužení přežívání nemocných a ústupu symptomů nemoci. Výjimku tvoří nemocní, u kterých došlo k poklesu hmotnosti o více než 10%, v takových případech podání chemoterapie není oprávněné, pacienti jsou léčeni pouze symptomaticky [69]. Nejčastěji užívanými cytostatiky jsou přípravky na bázi platiny [69].

### 2.5.4 Chemoterapeutické režimy

U karcinomu plic platilo do roku 1980, hlavně kvůli jeho odolné biologické povaze, že je léčitelný pouze pokud ho lze chirurgicky odstranit. Při pokročilosti onemocnění již žádná léčba indikována nebyla, pouze symptomatická. Řada studií ovšem postupně prokázala, že i u pokročilého nemalobuněčného plicního karcinomu je podání chemoterapie přínosné, a tedy indikované, ve zvláštních případech též v kombinaci s radioterapií. Při lokální pokročilosti nádorového onemocnění či přítomnosti metastáz bývá chemoterapie vždy doplněná paralelní i následnou radioterapií.

V 80. letech 20. století bylo zavedeno do praxe platinové cytostatikum cis-platina. Toto cytostatikum má výrazný protinádorový účinek, ale bohužel ovšem i silné nežádoucí účinky jako např. nefrotoxicita, neurotoxicita a zvracení. Platinová cystostatika poškozují DNA a podporují vznik nových interkalačních vazeb mezi řetězci, které zabrání obnovení nukleových kyselin. Postupným vývojem došlo k objevení nových derivátů platinových cytostatik karboplatiny a oxaliplatiny, které mají nežádoucích účinků o něco méně.

Cytostatika III. generace byla poprvé do praxe zavedena v 90. letech 20. století. Do této skupiny patří rostlinné alkaloidy, vinka-alkaloidy a taxany. Společným účinkem je inhibice mitózy buněk. Zástupcem taxanů je paklitaxel a docataxel a jejich podání je indikováno u nemalobuněčného plicního karcinomu. Mezi vinka-alkaloidy patří vinorelbin a vinkristin. V léčbě plicního karcinomu se dnes používá ale pouze vinorelbin. Neméně důležitým zástupcem cytostatik III. generace jsou antimetabolity, které svým vlivem působí jednak přímo poruchu syntézy nukleových kyselin nebo se začlení jako nukleosidtrifosfáty do řetězce nukleové kyseliny, a tím pádem poruší genetickou informaci buňky a dochází k jejímu poškození. Podofylinové alkaloidy se svým zástupcem etoposidem a kamptothecidová analoga, tzv. topotecan, jsou především využívány v léčbě malobuněčného plicního karcinomu.

Průlom v léčbě adenokarcinomu a velkobuněčného karcinomu nastal v roce 2010, kdy bylo celosvětově zavedeno podávání antifolátu pemetrexedu v kombinaci platinovým derivátem cis-platinou v první linii [86].

Na přelomu druhého a třetího tisíciletí se poprvé v léčbě plicního karcinomu objevuje cílená molekulární terapie, známá spíše pod názvem biologická léčba. Mechanismus účinku, oproti běžné užívané chemoterapii, je výběrový účinek uvnitř nádorových buněk. Tyto látky se vážou na receptory nádorových buněk, tím pádem dochází ke změně vlastností nádorových buněk. Ty již nejsou schopny dále přežít v organismu, ba i dokonce ztrácejí metastatický potenciál [87,88].

Inhibitory tyrosinkinázy – receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR) jsou známy dva – erlotinib a gefitinib. Indikací k jejich podání je pokročilý nemalobuněčný plicní karcinom. Podle provedených studií je nutná k úspěšné léčbě těmito preparáty nejen přítomnost receptoru pro epiteální růstový faktor na povrchu buněk, ale i přítomnost specifických mutací v genotypch nádorové buňky [89,90,91]. Prvním schváleným lékem z této skupiny je v České republice gefitinib. Jeho podání je indikováno v první linii u pacientů s prokázanými aktivačními mutacemi receptoru pro EGFR v axonu 19-21. U maligních buněk s aktivační mutací EGFR receptoru má za následek zvýšenou proliferaci, angiogenezi a vzrůstá jejich metastatický potenciál. Gefitinib cíleně působí inhibici tyrosinkinázové aktivity receptoru EGF a tímto mechanismem inaktivuje signální dráhu jdoucí do jádra buňky [89]. Druhým lékem této skupiny erlotinib. Gridelli ve své studii srovnal dvě skupiny nemocných s pokročilým karcinomem, kdy všichni pacienti měli přítomnou aktivační EGFR mutaci. Jedna skupina podstoupila klasickou chemoterapii (cisplatina/pemetrexed) a druhá užívala erlotinib. Skupina s erlotinibem měla staticky významně prodloužený interval do progresu onemocnění [92].

Bohužel, přes počáteční nadšení, spojené se zavedením těchto dvou nových léků do praxe, je vystřídalo zklamání, jelikož až u 70 % pacientů dochází již po deseti měsících k vytvoření rezistence. Proto bylo cílem nalezení nového a ireverzibilního inhibitoru [89]. Nový lék splňující tento požadavek by mohl být afanitib, který působí ireverzibilní blokádu receptorů ErbB, včetně EGFR, tedy zamezuje růstu nádorové buňky a aktivuje apoptózu. Dokládá to randomizovaná studie Lux-Lung 3, která srovnává afanitib s konvenční chemoterapií, kdy výsledky vyzněly výrazně kladně pro afanitib pokud se týče prodloužení intervalu do progresu onemocnění [93], což potvrdily i další publikované studie [94,95].

Dalším preparátem, používaným v léčbě nemalobuněčného plicního karcinomu, je bevacizumab, jehož místem působení je inhibice receptoru vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGFR), čímž brání další angiogenezi buněk. Studie, porovnávající bevacizumab a konvenční chemoterapii, vyzněla lépe pro tuto biologickou látku, přičemž nádory byly vždy jiné histologické povahy než spinocelulární [96,97].

Selektivním inhibitorem anaplastické lymfomové kinázy je crinozotinib. Mechanismus účinku spočívá v inaktivaci Hepatocyte Growth Factor Receptoru (c-Met) tyrosinkinázy. U 5 % nemocných s nemalobuněčným plicním karcinomem byl prokázán specifický onkogen EML4-anaplastický lymfom kináza, který bývá specificky zvýšen u adenokarcinomů a u pacientů nekuřáků nebo lehkých kuřáků. Indikací k podání u nemocných s pokročilým nemalobuněčným karcinomem je nutný průkaz EML4-ALK mutace [89,92,98].



### **2.5.5 Léčba u malobuněčného karcinomu plic**

Ze všech karcinomů plic se malobuněčný karcinom (SLC) vyskytuje v 20 – 25 % [99]. První zmínka o něm pochází z konce 19. století, kdy autoři Hartig a Hess našli výskyt zvláštní choroby u horníků v arzenových dolech. V roce 1927 W. G. Barnard popsal poprvé nádor se zvláštním typem buněk ve tvaru ovsa a pojmenoval ho jako malobuněčný [100]. Je to neuroendokrinní nádor se špatnou diferenciací. Jeho zvláštní formou je tzv. kombinovaný malobuněčný karcinom s přítomností nemalobuněčné komponenty, nejčastěji skvamózní či adenokarcinomové. TNM klasifikace u malobuněčného karcinomu nemá faktický význam. Od nemalobuněčného karcinomu se liší hlavně výraznou proliferací nádorových buněk, nemocní bez adekvátní léčby zmirají do několika málo měsíců od stanovení diagnózy. Proliferující nádorové buňky jsou značně chemo a radiosenzitivní, tím pádem lze docílit onkologickou léčbou remisi až u 80 – 90 % pacientů bez ohledu na počáteční stádium onemocnění [101]. Tato remise je ale bohužel velice promptně následována relapsem onemocnění, proto dvouleté přežití u nemocných s malobuněčným karcinomem nepřesahuje 5 % [30].

V současné době je dostačující dělení pouze na dvě skupiny a to: limitované stádium (limited disease LD) a extenzivní (extensive disease ED). LD stádium je charakterizováno jako postižení malobuněčným karcinomem pouze jedné pohrudniční dutiny, spojené se stejnostranným pohrudničním výpotkem, postižením příslušných spádových uzlin a parézou zvrátého nervu. Do ED stádia patří všechny ostatní formy malobuněčného karcinomu. Chirurgická léčba malobuněčného karcinomu má svá jasná kritéria, která byla kodifikována již v roce 1997 International Association for the Study of the Lung Cancer. Resekční výkon indikujeme pouze tehdy, pokud se nepodaří předoperačně stanovit diagnózu SLC a během operace se zjistí, že se jedná o SLC ve stádiu T1 nebo T2 bez postižení uzlin a vzdálených metastáz. Za této situace je dokončení anatomické resekce s důslednou lymfadenektomií zcela oprávněné a následuje adjuvantní chemoterapie s profylaktickým ozářením mozku [102]. Další indikací je elektivní operace v klinické stádium SLC I a II. podle TNM. Po tomto radikálním výkonu je pětileté přežití v rozmezí 30 – 70 % [103,104]. Výsledky jednoznačně potvrzují, že chirurgická resekce je plně indikována v přesně daných případech a výrazně prodlouží přežívání oproti pouze samostatné onkologické léčbě. Poslední indikací je perzistence primárního nádoru v plicním parenchymu po skončení chemoterapie, kdy s téměř stoprocentní jistotou můžeme říci, že účinek radioterapie nebude dostačující, proto je nemocný indikován k tzv. salvage therapy. Ta opět nemocnému prodlouží pětileté přežití [105]. Vždy po provedení kurativní resekce musí následovat adjuvantní terapie doplněná o profylaktické ozáření neurocrania [106].

U pacientů s extenzivním stádiem malobuněčného karcinomu je chirurgická léčba přísně kontraindikována, jelikož neznamena pro nemocné žádný průkazný přínos. Doporučeným léčebným protokolem pro terapii SLC je kombinace cis-platiny nebo karbo-platiny s etoposidem a radioterapie. [107,108].

### 3. Minimální reziduální choroba

#### 3.1 Úvod

Pojem minimální reziduální choroba byl poprvé použit na konci dvacátých let 20. století, v době, kdy nemocní s leukémií byli léčeni chemoterapií, která byla podávána řádově několik týdnů. Ukončena byla, pokud měl nemocný v krvi pouze normální buňky bez nádorové patologické složky, což bylo zjišťováno dostupnými mikroskopickými vyšetřovacími metodami. V poměrně krátkém časovém intervalu ovšem docházelo u těchto pacientů přesto k relapsu onemocnění. S objevením nových diagnostických metod, jako je imunohistochemie a polymerázová řetězová reakce (PCR), bylo zjištěno, že maligní buňky, nalezené při relapsu onemocnění, pocházejí ze stejné řady jako buňky z doby před započatím léčby. Z toho vyplývá, že v těle těchto nemocných může kolovat určité množství buněk, běžnými vyšetřovacími metodami nezjistitelných, které jsou zodpovědné za časný relaps onemocnění. Označujeme jako zbytkové neboli reziduální nádorové buňky [109]. Postupem času se zjistilo, že cirkulující nádorové buňky se nevyskytují jen u hematologických malignit, ale i u solidních nádorů, kde jsou po odstranění primárního nádoru zodpovědné za relaps onemocnění.

Minimální reziduální chorobou (minimal systematic/residual disease, MSD, MRD) rozumíme tedy buňky volně cirkulující či obsažené v krvi, kostní dřeni, mízních uzlinách či jiných tělních dutinách, kdy musí být splněna základní podmínka předchozího radikálního odstranění primárního nádoru a nepřítomnost klinických známek nádorového onemocnění. Cirkulující nádorové buňky, které jsou vlastně subklinickými zbytky nádorů, běžně nedetekovatelné dostupnými vyšetřovacími metodami. Cirkulující nádorové buňky jsou zodpovědné za recidivu nádorového onemocnění [110] a jsou považovány za hlavního činitele vzniku vzdálených metastáz po odstranění primárního nádoru u solidních tumorů [111].

Je tedy prokázáno, že solidní nádory mají svoji leukemickou fázi [112], při níž dochází k uvolnění nádorových buněk do cirkulace, což podmiňuje možnost metastatického rozsevu nádoru. Na modelech bylo prokázáno, že 1 g nádorové tkáně je schopen uvolnit do oběhu až 1 milion nádorových buněk za jeden den.

Na rozdíl od hematoblastóz se ale nádorové buňky vyskytují v pro ně nepřátelském prostředí, kde jsou trvale vystaveny působení humorálních i buněčných mechanismů. Musí odolávat nepříznivým vlivům. Mechanizmy, které dovolí nádorové buňce setrvat v oběhu, vycestovat a založit metastázu, se daří objasňovat velice pomalu. Ne každá nádorová buňka je toho totiž schopna. Řada cirkulujících buněk je apoptických, některé jsou dormantní, další z nich nejsou schopny proteosyntézy, proliferace a indukce angiogeneze [113]. Volné nádorové buňky

se označují jako cirkulující nádorové buňky (circulating tumor cells, CTS), v kostní dřeni jako diseminované nádorové buňky (disseminated tumor cells, DTC) [114].

Většina z těchto buněk je ničena vlastním imunitním systémem organismu. Z tohoto důvodu platí, že detekce cirkulujících nádorových buněk pomocí velmi citlivých molekulárně-genetických metod ještě neznamená a priori známku relapsu nebo perzistenci nádoru. I zde totiž platí Weaverův postulát, týkající se původně sentinelových uzlin - polymerázová řetězová reakce je pro nádorové buněčné markery příliš citlivá a identifikuje tolik PCR pozitivních případů, že tento počet výrazně převyšuje empirickou míru recidiv [115]. Proto je zřejmé, že teprve další studie budou schopny zodpovědět přesně otázku skutečného klinického významu takto detekovaných cirkulujících nádorových buněk pro nemocného co do jeho prognózy a rovněž pro ušití léčebné strategie přesně na míru.

### **3.2 Detekce minimální reziduální choroby**

Jak už bylo řečeno, současnými obvyklými vyšetřovacími metodami (světelná mikroskopie atd.) nelze odhalit časnou diseminaci nádorového onemocnění, tedy cirkulující nádorové buňky. Běžně používané zobrazovací biochemické, cytogenetické a imunologické metody jsou schopny detekovat 1 nádorovou buňku mezi 10 až 100 tisíci nenádorovými buňkami [116]. Teprve s využitím nových molekulárně biologických metod jsme schopni tyto volné nádorové buňky v organismu zachytit a mohou nám tak pomoci diagnostikovat onemocnění, monitorovat léčbu a včas zjistit relaps onemocnění. Tyto buňky jsou považovány za prekurzory vzdálených metastáz.

Principem imunohistochemie je reakce monoklonálních protilátek se specifickými antigeny nádorových buněk. Další metodou je průtoková cytometrie, která je založena na stanovení množství povrchových a intracelulárních antigenů pomocí monoklonálních protilátek konjugovaných s fluorescenčním barvivem, procházejícím měřicí komorou, kde dochází k excitaci navázaných fluorochromů a emitované záření je detekováno fotonásobiči. Výsledný signál je počítačově zpracován.

Zavedení nových molekulárně biologických metod na principu PCR umožnilo detekovat jednu nádorovou buňku mezi deseti miliony buňkami nenádorovými. Za objevení této metody obdržel Kary Mullis v roce 1993 Nobelovu cenu za chemii. Této metody bylo poprvé použito v hematologii, kdy byly dobře popsány genetické změny a objeveny vysoce specifické a senzitivní markery nádorových buněk [117]. Polymerázová řetězová reakce je založena na detekci vybrané sekvence DNA pomocí její amplifikace za použití sekvenčně specifických oligonukleotidů a DNA polymerázy. Tato metoda je jednou z nejdůležitějších diagnostických metod v molekulární diagnostice.

Průběh vyšetření se skládá ze tří přesně definovaných kroků:

1. Zahřátím na teplotu 92-95 stupňů je denaturována genomová DNA po dobu 30 sekund.
2. Následuje hybridizace denaturované DNA s dostatečným množstvím syntetických primerů oligonukleotidů při teplotě 50-60 stupňů během 30 sekund.
3. Nyní využíváme DNA polymerázu pro replikaci DNA k oligonucleotidovým primerům. Díky českému vědci Šmardovi a jeho kolegům máme exaktně stanovené hodnoty teplot a časovou posloupnost jednotlivých úkonů k provedení úspěšné polymerázové řetězové reakce [118,119].

Transkriptázová polymerázová řetězová reakce v reálném čase – RT-PCR – je nejcitlivější metoda založená na principu reverzně-transkriptázové polymerázové řetězové reakce v reálném čase, pomocí které je možné detekovat i jednu nádorovou buňku mezi deseti miliony buňkami nenádorovými [120]. Tato metoda je nejvýhodnější ke sledování minimální reziduální choroby. Bylo opakovaně prokázáno, že RT-PCR je nejpřesnější pro stanovení nádorových cirkulujících buněk u kolorektálního karcinomu, karcinomu prsu a karcinomu ledvin [114,121,122]. RT-PCR byla vyhodnocena jako nejvíce specifická a senzitivní pro stanovení MRD i u dalších solidních nádorů, například u karcinomu pankreatu Srovnalem a Klosem et al. ve FN v Olomouci a Ústavu experimentální medicíny Biomedreg [123,124].

### 3.3 Onkomarkery

Rozdílem v genové expresi u maligních a benigních buněk lze detekovat nejpřesněji minimální reziduální chorobu pomocí real time polymerázové řetězové reakce. Maligní buňky exprimují jiné geny než benigní, proto je výsledkem rozdílné zastoupení exprimované mRNA [125]. Další problém nastává v tom, že některé specifické genové exprese mohou být shodné u několika různých typů maligních nádorů. Proto je významné nalezení onkomarkerů pro jednotlivé maligní nádory co nejvíce specifických [126,127,128,129].

Jednotlivé markery, sloužící k určení minimální reziduální choroby, se liší svou specificitou a senzitivitou. Mezi nejvíce používané nádorové markery patří karcinoembryonální antigen (CEA). Jedná se o glykoprotein buněčného povrchu, který bývá zvýšen u 95 % nádorů gastrointestinálního traktu, 70 % karcinomů plic a u 50 % karcinomů prsu [130,131]. Dalším vhodným markerem receptor pro epidermální růstový faktor 1 (EGFR 1), patřící do HER (receptorové) skupiny. U této skupiny nádorů, exprimujících rozdílné růstové faktory, lze tyto vlastnosti využít ke stanovení diagnózy, průběhu onemocnění a celkové prognóze nemocného v závislosti na přítomnosti minimální reziduální choroby. Zvýšeně exprimován je u 70 % procent nádorů prsu, plic a střeva [132,133]. Receptor pro hepatocytární růstový faktor (c-MET), který

po vazbě na membránový receptor stimuluje hepatocytární růstový faktor, má řadu dalších důležitých funkcí pro vývoj a regeneraci tkáně a podílí se na onkogenezi a progresi karcinomů. Cytokeratin (CK 19) patří do největší skupiny proteinů cytoskeletu epiteliálních buněk a je také používán jako marker minimální reziduální plicní choroby, karcinomu kolorekta a karcinomu prsu [134,135].

### **3.4 Minimální reziduální choroba u karcinomu plic - její význam, diagnostika a specifické onkomarkery**

U solidních nádorů, a tedy i u karcinomu plic, nejsou dosud známy dostatečně přesné onkomarkery. Důvodem je vysoká míra genetické instability a nádorové heterogenity. Základním principem detekce reziduální choroby u epiteliálních nádorů je záchyt nádorových buněk epiteliálního původu v mezenchymálních prostorech, tedy v prostředí netypickém pro epiteliální buňky. Provedením odběrů u pacientů před operací a po operaci lze z poklesu či vzestupu exprese nádorových markerů sledovat vývoj nádorového onemocnění a efekt léčby. Pokud dojde ke zvýšení sledovaných markerů, je možné zachytit recidivu nádorového onemocnění dříve, než se vyvinou klinické příznaky onemocnění. Toto zjištění je důležité pro strategii léčby a prognózu onemocnění. Podle přítomnosti minimální reziduální choroby bychom mohli vyselektovat skupinu nemocných v nízkém TNM stádiu, u kterých by dle zavedených léčebných postupů adjuvantní (pooperační) onkologická léčba nebyla podána. Tato skupina pacientů s pozitivní minimální reziduální chorobou a nízkým TNM stádiem by tak obdržela adjuvantní onkologickou terapii, a tím pádem by bylo možné předejít časnému relapsu maligního onemocnění. Dokazují to i četné publikované výsledky – u nemocných s nemalobuněčným karcinomem plic radikálně odresekovaným v I stádiu dochází až u 30 % pacientů k systémové recidivě, která i přes maximální možnou onkologickou léčbu většinou končí smrtí nemocných. Dle celosvětových doporučených léčebných postupů až do nedávné doby byla adjuvantní onkologická léčba indikována až od stádia II. Až v poslední době zaznamenala indikace adjuvantní léčby výraznou změnu. V důsledku narůstajících systémových recidiv v I. stádiu je již standardně indikována od stádia IB, překročí-li nádor velikost 4 cm [68,69]. Další potenciální využití minimální reziduální choroby je spatřováno v monitoraci úspěšnosti léčby a možnosti brzkého odhalení rekurence onemocnění, kdy je možno následně zasáhnout a zastavit tak progresi onemocnění. Standardní onkomarkery užívané ke sledování u nemalobuněčného karcinomu plic nejsou ale dosti specifické a senzitivní, jako např. CEA a EGFR.

Vzhledem ke všem výše uvedeným okolnostem probíhá řada molekulárně - biologických studií, zabývajících se minimální reziduální chorobou, jejím prognostickým významem a určením

specifických onkomarkerů s dostatečnou specificitou a senzitivitou pro její detekci u karcinomu plic.

V roce 2001 proběhla studie, kdy byl nalezen nový plicní specifický gen LunX. Onkogen je lokalizován na chromozomu 20p11.1- q12 a k jeho identifikaci byla použita RT-PCR metoda. U 20 pacientů s nemalobuněčným karcinodem plic bylo vyšetřeno 104 lymfatických uzlin, kdy LunX protein byl prokázán u 16 (80 %) z 20 histologicky pozitivních uzlin a u 21 (25 %) z 84 histologicky negativních uzlin. Autoři studie deklarovali, že LunX RT-PCR test je potenciálně vhodnou diagnostickou metodou pro detekci metastáz nemalobuněčného karcinomu plic [136]. Dalším, kdo potvrdil, že LunX je specifický onkomarker pro nemalobuněčný karcinom byl Mitas a jeho spolupracovníci, kteří LunX izolovali z periferní krve nemocných s NSCLC [137].

V roce 2008 Cheng a kol. rozpracovali studii, jejímž cílem bylo poskytnutí podrobného zhodnocení významu jednotlivých onkomarkerů plic a posouzení jejich diagnostického významu nemalobuněčného plicního karcinomu. Použili opět RT-PCR k určení LunX, CK19, CEA a hladiny mRNA v periferní krvi a v pleurální tekutině. Srovnávali skupinu pacientů s nemalobuněčným karcinodem plic se skupinou pacientů s jiným epiteliálním karcinodem (karcinomy prsu a jícnu). Další skupinu tvořili pacienti s benigním plicním onemocněním a v poslední skupině byli pouze zdraví jedinci. V periferní krvi byla zaznamenána zvýšená hladina LunX mRNA u (33/44) pacientů s NSCLC. U pacientů s jinými epiteliálními karcinomy (0/28) ani u benigních onemocnění plic (0/10) nebo u zdravých dobrovolníků (0/15) nebyla zvýšená hladina LunX mRNA zjištěna. Všechny ostatní genetické markery byly pozitivní nejen u pacientů s NSCLC, ale i v ostatních skupinách. Míra positivity LunX mRNA v periferní krvi souvisí s progresí nádorového onemocnění. Dále byl zjištěn LunX mRNA u 92,2 % (13/14) vzorků maligních pleurálních výpotků, ale nebyl přítomen v benigních výpotcích. U vyšetřovaných pacientů došlo k poklesu exprese mRNA LunX v periferní krvi po zahájení léčby. Autoři tudíž konstatují, že LunX mRNA je nejspecifičtější genový marker rakoviny plic mezi použitými onkomarkery [138].

I další studie, zahrnující 42 pacientů s nemalobuněčným karcinodem, deklaruje specifitu LunXu pro nemalobuněčný plicní karcinom oproti kontrolní skupině s benigním onemocněním, u nichž LunX mRNA nebyla detekována. Pro stanovení prognózy nemocných s nemalobuněčným plicním karcinodem a stanovení diseminace onemocnění lze s výhodou použít multimarkerovou analýzu s detekcí exprese mRNA CK19, EGFR a LunX v periferní krvi [139].

Cílem japonských autorů pod vedením Fumihura Tanaky bylo zjistit diagnostický význam cirkulujících nádorových buněk (CTC) v periferní krvi u nemocných s rakovinou plic, nenádorovým onemocněním a u nemocných s přítomností vzdálených metastáz [140]. Byl prokázán větší počet cirkulujících nádorových buněk u pacientů s karcinodem plic, ale tento

rozdíl nebyl statisticky významný. U pacientů s progresí onemocnění a zejména s rozvojem vzdálených metastáz dochází ke statisticky zjevnému zvýšení cirkulujících nádorových buněk (senzitivita 71%, specificita 83%).

Zjištění specifického onkomarkeru pro malobuněčný karcinom plic se věnoval Shingyoji. V roce 2002 se ve své studii tedy zaměřil na právě na tento typ karcinomu, který má sklon k progresivnímu růstu. K odhalení jeho mikroskopického šíření byly zkoumány tumor-specifické geny v periferní krvi a kostní dřeni. Byly použity markery prepro gastrin-releasing peptid (preproGRP), neuromedin b receptor a gastrin-releasing peptid receptor. Výsledky byly opět vyhodnoceny RT-PCR. Všechny tři onkomarkery byly v kostní dřeni zachyceny častěji při vzdálených metastázách. Tato studie opět potvrdila přítomnost nádorových buněk v periferní krvi a kostní dřeni u neléčených pacientů. Detekce uvedených onkomarkerů u SLCL pomocí RT-PCR v kostní dřeni signalizuje špatnou prognózu onemocnění, z tohoto vyplývá, že přítomnost těchto markerů je negativním prognostickým faktorem [141].

Dalším onkomarkerem, který se stal předmětem zájmu, byl c-Met. C-Met receptor a jeho ligand – růstový faktor hepatocytů se podílí na nádorové invazivitě a tvorbě metastáz [142]. Byl objeven v roce 1982 a je umístěn na 7. chromozomu [143]. První studii, která se zaměřuje na přítomnost c-Met v periferní krvi a její prognostický význam u pacientů s NSCLC, publikovala skupina čínských autorů v roce 2005. Byla sledována c-Met RNA v nádorové tkáni a periferní krvi pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic pomocí RT-PCR, srovnávacími výsledky s imunohistochemickými metodami. Tato studie objasňuje potencionální roli c-Met jakožto možného prognostického faktoru u NSCLC. Výsledky prokázaly, že c-Met v nádorové tkáni je spojen s množstvím c-Met v cirkulující krvi. Nadměrně cirkulující c-Met významně koreluje s postižením lymfatických uzlin, což znamená, že u pacientů s NSCLC vyšší hladina c-Met signalizuje pokročilost onemocnění. C-Met tak může předpovědět riziko vzniku recidivy onemocnění a vzniku metastáz. Nadměrná exprese c-Met byla zjištěna v 75,5 % (34 ze 45 vzorků nádorové tkáně) při užití RT-PCR ve srovnání s 60 % (27 ze 45 vzorků nádorové tkáně) při použití imunohistochemických metod. RT-PCR má vysokou míru detekce a nízkou variabilitu v hodnocení genové exprese, a tím pádem je v souladu s výsledky jiných studií citlivější než imunohistochemie. Z této studie vyplývá, že exprese c-Met v periferní krvi znamená vysoké riziko recidivy onemocnění a jeho zvýšená hladina je nezávislý negativní prognostický faktor u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic [144].

S přibývajícím zkušenostmi se potvrdila teorie, že provedením multimarkerové analýzy několika onkomarkerů lze docílit zvýšení specifity a senzitivity průkazu minimální reziduální choroby. V roce 2006 proběhla studie, kdy Sheu u 69 pacientů prokázal s velkým benefitem provedení multimarkerové analýzy CEA, CK-19 a c-Met, senzitivita dosahovala 85,5 %. Samostatný c-Met

nemá dostatečnou výpovědní hodnotu jako diagnostický marker, ale jeho exprese v periferní krvi korelovala s patologickým stádiem nemocného s maligním plicním nádorem. V této studii byl testován další potencionální marker plicního nádoru HnRNP (heterogenous nuclear ribonucleoprotein), ale bohužel nebyl prokázán jeho přínos [145].

Z výše uvedených prací vyplývá, že význam minimální reziduální choroby u karcinomu plic je velký, jelikož, jak už bylo uvedeno, zjištěním MRD lze stanovit eventuální progresi nemoci dříve, než bude zjištěna klasickými konvenčními vyšetřovacími metodami. Hladina MRD také koreluje s délkou přežití nemocných. Nejlepší metodou k detekci je RT-PCR za použití multimarkerové analýzy. Nejlepšími onkomarkery se jeví být c-Met, LunX, EGFR a CEA. Kompartment, v němž můžeme detektovat MRD, je kostní dřen, periferní a systémová krev.



## 4. Vlastní práce

Minimální reziduální chorobu u karcinomu plic lze detekovat vyšetřením přítomnosti cirkulujících nádorových buněk (circulating tumour cells, CTCs) v periferní krvi, kostní dřeni a plicní žilní krvi. Standardní metodou ke stanovení minimální reziduální choroby je reverzně transkriptázová polymerázová řetězová reakce (reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR). Dle dostupných publikovaných prací byly vybrány nádorové onkomarkery vhodné ke stanovení přítomnosti minimální reziduální choroby v jednotlivých kompartmentech. Pomocí stanovení těchto onkomarkerů je možno diferencovat nádorové buňky od nenádorových. Vzhledem k tomu, že neexistují mezní hodnoty jednotlivých markerů pro toto vyšetření, byly stanoveny mezní „cut-off“ hodnoty vyšetřením souboru dárců/pacientů bez přítomnosti maligního či zánětlivého onemocnění v anamnéze.

### 4.1 Základní cíle práce

1. Ověření možnosti detekce minimální reziduální choroby u karcinomu plic pomocí specifických onkomarkerů v periferní krvi, kostní dřeni a žilní plicní krvi.
2. Zhodnocení vlivu zjištění minimální reziduální choroby na přežívání pacientů s karcinomem plic po radikální resekcí.
3. Korelace hladiny cirkulujících nádorových buněk s postižením uzlin a klinickým stádiem onemocnění.
4. Korelace hladiny cirkulujících nádorových buněk u pacientů s radikální R0 resekcí oproti nemocným, u kterých byl nádor odstraněn, ale nebylo dosaženo mikroskopicky beznádorových resekcčních okrajů, tedy R1.
5. Zjištění rozdílů mezi jednotlivými histologickými typy plicního karcinomu ve výskytu minimální reziduální choroby.

### 4.2 Soubor pacientů

Soubor obsahoval 137 pacientů s primárním plicním karcinomem, z toho 97 mužů a 40 žen, kteří byli operováni v letech 2009 – 2012 na I. chirurgické klinice ve FN Olomouc. Všichni nemocní byli radikálně operováni R0 resekcí, ale u 3 nemocných se na základě pooperačního patologického vyšetření zjistilo, že byla provedena R1 resekcí, tyto nemocní proto následně podstoupili radioterapii, jelikož další reoperace nebyli schopni. U téměř všech nemocných byla provedena anatomická resekcí, tedy lobektomie, bilobektomie či pulmektomie. U dvou pacientů byla možná ale pouze segmentektomie, a to z důvodu nedostatečné ventilační rezervy. S radikálním výkonem byla vždy provedena systematická mediastinální lymfadenektomie.

Věkový průměr byl 65,9 let a věkové rozmezí 29 – 82 let. Operovaní pacienti byli ve stádiu I, II, IIIA. V I. stádiu bylo 73 nemocných, v II. stádiu 42 a ve IIIA stádiu 22 nemocných. Nikdo z pacientů před operací neprodělal indukční neoadjuvantní onkologickou léčbu. Dle histologické povahy bylo 71 spinocelulárních karcinomů, 56 adenokarcinomů, 10 karcinomů velkobuněčných.

Tab č. 5: Histologické typy tumorů

Histologický typ nádoru	Počet
Spinocelulární karcinom	71
Adenokarcinom	56
Velkobuněčný karcinom	10
Celkový počet	137

Tab č. 6: Rozdělení pacientů dle klinického věku, pohlaví a klinického stádia

		N	sex	mean age	grading			N staging	
			(male/female)	(years) (min; max)	1	2	3	0	1+2
clinical stage	I	73	51/22	66.5 (44;82)	8	21	33	73	0
	II	42	29/13	66.5 (45;81)	1	15	19	12	30
	IIIA	22	17/5	62.9 (29;74)	0	7	12	0	22
Total		137	97/40	65.9 (29;82)	9	43	64	85	52

### 4.3 Materiál a jeho odběr

V souboru byli zahrnuti pacienti TNM stádia I až IIIA. Ze skupiny byli vyřazeni pacienti, kteří před operací podstoupili neoadjuvantní onkologickou léčbu.

Studie byla schválena etickou komisí ve FN v Olomouci. Ke stanovení minimální reziduální choroby u karcinomu plic byly použity vzorky systémové žilní krve, krve z plicní žíly drénující příslušný lalok s nádorem a kostní dřeň, odebrané při chirurgickém výkonu. Na konci operačního výkonu byl z tumoru odebrán vzorek velikosti 1x1 cm a uložen do 1000 µl roztoku RNA later,

inhibující ribonukleázu, která slouží ke stabilizaci vzorku tumoru a připraví ho k analýze DNA, RNA a dalších proteinů. Vzorek je možný v této podobě transportovat i při pokojové teplotě. Následné odběry s odstupem minimálně 14 dní od operace zahrnovaly odběr systémové krve a kostní dřeně.

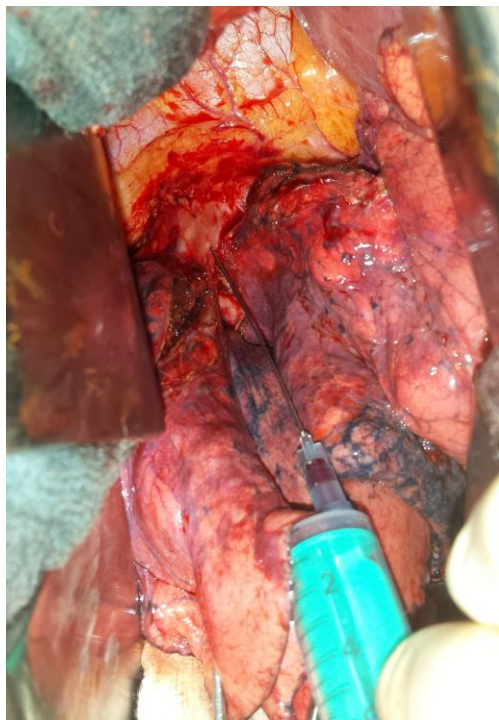
U každého nemocného zařazeného do tohoto výzkumu byly provedeny tyto odběry:

1. Odběr kostní dřeně – byl proveden v úvodu výkonu po uvedení do celkové anestezie. Místo punkce a odběru kostní dřeně bylo sternum. Vzorek kostní dřeně cca 10 ml byl odebrán do zkumavky s EDTA (obr. 7).
2. Odběr systémové žilní krve – odebrána z periferní žíly, vena cubita nebo vena mediana či basilica, v množství 10 ml do zkumavek s EDTA. Vlastní odběr byl před uvedením nemocného do celkové anestezie.
3. Odběr žilní krve z plicní žíly drénující příslušný lalok s tumorem – neméně důležitým vzorkem byl odběr cca 10 ml žilní krve tenkou jehlou ze žíly drénující lalok s tumorem před provedením vlastní anatomické resekce plic, tzn. před odstraněním nádoru plic. Vzorek byl opět odebrán do zkumavky s protisrážlivým činidlem EDTA. Nejdříve byly identifikovány tepny pro příslušný lalok, poté žíla a následně bronchus pro daný lalok plíce (obr. 8).
4. Odběr vzorku tkáně z nádoru plic – vzorek velikosti 1x1 cm byl odebrán na konci operace z tumoru a umístěn do stabilizačního roztoku RNA later.

Obr. č. 7: Odběr kostní dřeně



Obr. č. 8: Odběr krve z horní plicní žíly drénující tumor lokalizovaný v horním laloku pravé plíce



#### **4.4 Zpracování a vyšetření materiálu v Ústavu molekulární a translační medicíny**

Po skončení operace byly vzorky transportovány na Ústav molekulární a translační medicíny do Laboratoře experimentální medicíny. Zde byly provedeny příslušné úkony k vyšetření přítomnosti minimální reziduální choroby. Použita byla metodika v laboratoři zavedená, běžně využívaná a ověřená v několika pracích [123,124].

Vyšetření přítomnosti minimální reziduální choroby z krve či kostní dřeně probíhá v několika krocích níže popsaných krocích.

##### **4.4.1 Osmotická lýza se separací jaderných buněk**

Důvodem provedení osmotické lýzy je odstranění červené složky krve, tedy erytrocytů. Červená řada krevních buněk obsahuje hem, který je blokátorem celé řady enzymů využívaných v molekulární biologii. Jaderné buňky, včetně nádorových, jsou stabilnější, a proto zůstanou uchovány v nezměněné podobě. Roztok používaný k lýze (lyzační roztok) obsahuje: 1,55M NH<sub>4</sub>Cl, 0,1M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 1mM EDTA, promývací roztok (Phosphate Buffer Saline, PBS) obsahuje: 1,4 M NaCl, 0,03 M KCl, 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 0,015 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

Vlastní proces osmotické lýzy byl proveden na ledu, kdy byly vzorky krve a kostní dřené lyzovány vychlazeným lyzačním roztokem v poměru ke vzorku 4 : 1 po dobu 7–30 minut až se lyzát vyčeřil. Následovně byl materiál centrifugován při 4500 rpm, 10 minut, 4 °C, po odstranění supernatantu byl vzorek ještě jednou centrifugován a promyt promývacím roztokem. Do připravených zkumavek bylo provedeno rozplnění alikvotů po  $11 \times 10^6$  buněk. Po centrifugaci (2000 rpm, 4 minuty, 4 °C) byl odstraněn supernatant a k buňkám byl za současného propipetování přidán 1 ml TRI reagentu a vzorek byl zamražen.

#### **4.4.2 Vlastní izolace RNA**

K izolaci RNA byla použita metoda, kterou poprvé představil v roce 1987 Chomczynski, tzv. fenol-chloroformová metoda [146]. Tato technika dnes v praxi zjednodušeně využívá komerčně dodávanou chemikálii TRI reagent (MMC, Cincinnati, Ohio, USA), která je směsí guanidin-thiokyanátu a fenolu v přesně daném poměru. Ke vzorku s TRI reagent přidáme chloroform, v důsledku centrifugace se směs rozdělí do tří vrstev. Horní vrstva obsahuje RNA, interfáze DNA a spodní vrstva obsahuje DNA a bílkoviny. Tato metoda nám umožňuje současně vyizolovat ze zkoumaného vzorku DNA, RNA i proteiny. RNA rozpuštěná ve vodné fázi se precipituje izopropanolem, promyje etanolem a rozpustí ve vodě. Metoda je vhodná pro izolaci RNA všech typů o délce 0,1–15 kb. Koncentraci a čistotu vyizolované RNA lze ověřit spektrofotometricky přístrojem Nanodrop ND 1000 (Nanodrop, Wilmington, DE, USA). Při použití 1 ml TRI reagentu lze izolovat RNA z 50–100 mg tkáně a z 5–11 milionů buněk.

Pro zpracování lze použít čerstvé nebo zamražené buněčné TRI lyzáty (koncentrace 5–11 milionů buněk/1 ml TRI reagentu). Ke vzorku přidáme 200 µl chloroformu a tím začínáme proces izolace RNA. Nyní je nutné ponechat vzorek odstát 10 minut při pokojové teplotě, následuje centrifugace 15 minut při 12000 g, 4 °C. Pokud byla centrifugace provedena dokonale, dochází k separaci jednotlivých vrstev – čirá, horní vrstva obsahuje námi požadovanou izolovanou RNA, prostřední vrstva mezivrstev DNA a růžová spodní vrstva obsahuje DNA, detritus, tuky a bílkoviny. Do čisté zkumavky odebereme horní vrstvu o objemu 400–500 µl a přidáme stejné množství isopropanolu tj. 400–500 µl. Tímto krokem je započata precipitace. Vzorek promícháme protřepáním, nesmí zůstat tzv. „mléčný prstenec“, který by mohl zkreslit další postupy. Takto upravený vzorek se nechá stát 5 minut. Po další centrifugaci 10 minut při 12000 g, 4 °C, se na dně zkumavky vytvoří čirá či bílá RNA peletka. Šetrně je odstraněn supernatant a peletu promyjeme 1,5 ml 75% etanolu. Zkumavku obrátíme dnem vzhůru, což nám umožní lépe odlepit ze dna zkumavky peletku. Zkumavku s peletkou opět centrifugujeme 5 minut při 12000 g, 4 °C a odstraníme supernatant. Peletku sušíme ve flow boxu, na vzduchu 3–10 minut. K RNA peletce přidáme cca 25 µl DEPC vody (21–60 µl podle velikosti peletky) a obsah několikrát propipetujeme.

Rozpuštění RNA urychlujeme zahřátím vzorku na 60 °C po dobu 10 minut, následně zchladíme na ledové tříšti. Nyní můžeme odebrat alikvot a spektrometricky stanovit koncentraci a čistotu vyizolované RNA na přístroji Nanodrop ND 1000. Rozpuštěnou RNA dlouhodobě uchováváme při -70 až -80 °C.

*a. Reverzní transkripce*

Pomocí reverzní transkriptázové polymerázové řetězové reakce (RT-PCR) můžeme stanovit genovou expresi. Nejdříve dochází za působení enzymu reverzní transkriptázy k přepisu RNA do komplementární jednovláknové DNA (complementary DNA, cDNA). Nejčastěji je k tomuto užívaná transkriptáza z Moloneyho viru myší leukémie (M-MuLV), nebo z ptačího viru myeloblastózy (AMV). Pro reverzní transkripci se hojně využívají enzymy bez RNázovéaktivity. Při reverzní transkripci je dále nutno použít primery. Používají se specifické mRNA primery, oligo-dT primery nebo stále častěji náhodné hexamery, které mají velkou výtěžnost. My jsme k vyšetření MRD používali RevertAid H minus M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas, Vilnius, Litva) a náhodné primery (Promega, Madison, WI, USA). Do reakce je také nezbytné přidat inhibitory ribonukleáz, např. RNasin (Promega, Madison, WI, USA) chránící mRNA před těmito enzymy v průběhu reakce.

Reverzní transkripci provádíme z 3 µg vyizolované celkové RNA v reakčním objemu 30 µl. Směs 3 µg RNA a 0,3 µg hexamerů je doplněna vodou do objemu 19,5 µl, krátce směs stočíme a zvortexujeme. Vzorek necháme inkubovat v termocykléru s vyhříváním víčkem při 70 °C po dobu 5 minut, poté vzorek rychle zchladíme na ledu po dobu cca jedné minuty. Ke zchlazenému vzorku RNA s hexamery a vodou přidáme MasterMix připravený z 6 µl 5xRT pufru, 3 µl 10mM DTP a 30 U RNAsinu. Následně ke vzorku RNA a MasterMixu přidáme ještě 150 U reverzní transkriptázy a vzorek necháme stát při pokojové teplotě ve flowboxu po dobu 10 minut. Vzorek inkubujeme v termocykléru s vyhříváním víčkem při 42 °C po dobu 60 minut a poté při 70 °C po dobu 10 minut. Po inkubaci je vzorek zchlazen na ledu, stočen a uložen při teplotě -20 °C.

*b. Polymerázová řetězová reakce v reálném čase (real-time RT-PCR)*

RT-PCR je enzymatická reakce, která je umožněna primery, specifickou fluorescenčně značenou sondou a termostabilní DNA-polymerázou. Změny fluorescence jsou monitorovány po každém cyklu PCR reakce (tj. v reálném čase) pomocí real-time termocykléru, v naší práci konkrétně real-time cyklér Rotor Gene 3000 (Corbett Research, Sydney, Austrálie). Po přidání standardů do reakce a vytvoření standardizační křivky lze kvantifikovat specifické vyšetřované sekvence ve vzorku.

Primery jsou krátké oligonukleotidy (o délce cca 20–25 bp), které vymezují amplifikovaný úsek DNA, specifická hydrolyzační TaqMan próba je krátký oligonukleotid značený fluorescenční barvou a zhášecem. Syntéza primerů a prób byla provedena firmou Generi Biotech, s.r.o., (Hradec Králové, ČR). Teplota funkčnosti primerů byla spočítána ze složení nukleotidů a experimentálně zkontrolována při optimalizaci amplifikačních procesů. Každá sada primerů obsahovala adekvátní koncentraci hořčnatých iontů. Dnes je již běžnou praxí využití tzv. hot-start DNA-polymerázy, dodávané s příslušným reakčním pufrem.

PCR reakce je prováděna se 100 ng cDNA, resp. celkové RNA, vstupující do reverzní transkripce, v reakčním objemu 25  $\mu$ l. MasterMix obsahuje 2,5  $\mu$ l 10x PCR pufu, 0,5  $\mu$ l 10mM dNTP, zoptimalizované množství primerů, próby a MgCl<sub>2</sub>, DEPC vody a 1 U Taq polymerázy. Do připravených 0,1 ml zkumavek je rozpipetováno 24  $\mu$ l MasterMixu, 1  $\mu$ l cDNA vzorků, 1  $\mu$ l DEPC vody jako „no template“ kontrola, 1  $\mu$ l cDNA pozitivní kontroly a 1  $\mu$ l specifických standardů. Zkumavky jsou vloženy do karuselu přístroje, vyváženy, je provedena automatická kalibrace snímání fluorescence přístroje a spuštěn příslušný amplifikační program.

Po ukončení real-time RT-PCR je provedena analýza výsledků. Ke stanovení minimální reziduální choroby u karcinomu plic bylo využito sledování exprese markerů CEA, EGFR, LunX a c-Met. Pro provedení absolutní kvantifikace exprese jednotlivých markerů metodou real-time RT-PCR bylo nutno namodelovat standardizační křivku. Současně s patientskými vzorky byla vyšetřena škála standardů pro daný marker, připravená desetinásobným ředěním PCR amplikonů obsahujících sekvenci testovaného markeru. Výpočet množství kopií byl proveden na základě známé molekulové hmotnosti (délka amplikonu), spektrofotometricky určené koncentrace a Avogadrovy konstanty.

Tab. č. 7 Sekvence a délka použitých primerů a prób a délka produktů pro jednotlivé markery (s – sense, as – antisense, P – probe, Fw – forward, Rev – reverse)

Název	Sekvence (5'-3')	Délka (bp)
<b>Carcinoembryonic antigen (CEA)</b>		
CEA s	taagtgtgaccacagcgaccc	22
CEA as	gttcccatcaatcagccaagaa	22
CEA P	atgtcctctatggcccagacgaccc	25
Produkt CEA		167
<b>Epidermal growth factor receptor (EGFR)</b>		
EGFR s	acttcaaaaactgcactccat	22
EGFR as	aatcagcaaaaaccctgtgatt	22
EGFR P	acatcctgccggtggcatttagg	23
Produkt EGFR		149
<b>Lung specific X protein (LunX)</b>		
LunX Fw	gatggccaccgtctctatgt	20
LunX Rev	acagccagcctcaacagact	20
LunX P	ccatccctctcggcataaagctcc	24
Produkt LunX		93
<b>Protooncogenic protein (c-met)</b>		
c-met Fw	tggacaatgatggcaagaaa	20
c-met Rev	gatgattccctcggtcagaa	20
c-met P	tcactgtgctgtgaaatccttgaaca	26
Produkt c-met		99



Tab. č. 8 Zoptimalizované koncentrace primerů, próby, hořečnatých kationtů a PCR profil reakcí pro jednotlivé markery

Marker	Finální koncentrace				Teplotní profil
	Primer s/Fw (nM)	Primer as/Rev (nM)	Próba (nM)	MgCl <sub>2</sub> (mM)	
<b>CEA</b>	300	600	200	3	95 °C / 15 s 65 °C / 15 s
<b>EGFR</b>	400	400	200	3	95 °C / 15 s 62 °C / 15 s
<b>LunX</b>	400	400	200	4	95 °C / 15 s 62 °C / 10 s
<b>c-met</b>	400	400	200	6	95 °C / 15 s 58 °C / 15 s

#### **4.4.3 Stanovení cut-off hodnot pro jednotlivé markery CEA, EGFR, LunX a c-met a hodnocení výsledku vyšetření přítomnosti MRD**

Pro rozhodnutí o přítomnosti či nepřítomnosti minimální reziduální choroby bylo nutné stanovit tzv. mezní (cut-off) hodnoty pro vyšetřované markery. K tomu jsme vyšetřili expresi jednotlivých nádorových markerů – genů v krvi a kostní dřeni u srovnávací skupiny. V této pilotní studii byly do srovnávací skupiny zařazeny vzorky krve získané od 98 zdravých dárců krve a vzorky kostní dřene odebrané od 12 pacientů operovaných pro benigní a nezánečlivá onemocnění. Tento soubor byl analyzován pomocí real-time RT-PCR reakce dle uvedených standardizovaných podmínek a výsledky byly statisticky zpracovány. Cut-off hodnoty pro pozitivní versus negativní hodnocení minimální reziduální choroby byly stanoveny jako průměrná hodnota exprese markeru v kontrolním souboru + 2 směrodatné odchylky (standard deviation, SD). Dále byly stanoveny tzv. šedé zóny – výpočtem cut-off hodnoty ± směrodatná chyba (standard error, SE).

Tab. č. 9 Kvantitativní exprese vyšetřovaných markerů v krvi zdravých dárců a kostní dřeni pacientů operovaných pro benigní a nezánetlivá onemocnění

marker		Krev	Kostní dřeň
		(kopie/ $\mu$ g RNA)	(kopie/ $\mu$ g RNA)
<b>CEA</b>	přůměr	88,3	155,6
	SD	111,5	124,8
	<b>cut-off</b>	<b>200,0</b>	<b>350,0</b>
	SE	10,4	44,1
	<b>šedá zóna</b>	<b>190 - 210</b>	<b>306 - 394</b>
<b>EGFR</b>	přůměr	49,2	15 528,3
	SD	127,1	21 960,4
	<b>cut-off</b>	<b>250,0</b>	<b>30 000,0</b>
	SE	11,8	7 764,2
	<b>šedá zóna</b>	<b>238 - 262</b>	<b>22 236 - 37 764</b>
<b>LUNX</b>	přůměr	1,51	172,27
	SD	14,92	205,38
	<b>cut-off</b>	<b>30,0</b>	<b>550,0</b>
	SE	1,5	59,3
	<b>šedá zóna</b>	<b>28 - 32</b>	<b>491 - 609</b>
<b>c-met</b>	přůměr	2 357,47	5 211,82
	SD	3 203,68	3 387,77
	<b>cut-off</b>	<b>8 500,0</b>	<b>11 500,0</b>
	SE	323,6	978,0
	<b>šedá zóna</b>	<b>8 176 - 8 824</b>	<b>10 522 - 12 478</b>

**Pravidla pro hodnocení výsledku:**

- je-li hodnota exprese v tzv. šedé zóně, výsledek nelze jednoznačně uzavřít a vyšetření je opakováno
- je-li hodnota exprese pod spodní hranicí šedé zóny, označujeme expresi za nízkou, nesvědčící pro přítomnost nádorových buněk ve vzorku

- je-li hodnota exprese nad horní hranicí šedé zóny, označujeme expresi za vysokou a svědčí pro přítomnost nádorových buněk ve vzorku

#### **4.4.4 Statistická analýza**

Data byla analyzována prostřednictvím softwaru R ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)) a STATISTICA 12 (StatSoft, Inc. USA). Hladiny markerů (počet kopií CEA, EGFR, LunX, c-Met) v plicní krvi, systémové krvi a kostní dřeni byly srovnávány vzhledem ke klinickým charakteristikám: histologický typ, stádium, grading, velikost nádoru, postižení uzlin a typ radikality. Vzhledem k tomu, že data nesplňovala podmínku normality (testováno prostřednictvím Shapirova-Wilkova testu), byly pro vyhodnocení rozdílů v distribucích markerů v jednotlivých podskupinách použity neparametrické metody, a to Wilcoxonův dvouvýběrový test (v případě dvou podskupin), popř. Kruskalův-Wallisův test v případě více jak dvou podskupin. V případě signifikantního Kruskalova-Wallisova testu bylo provedeno násobné porovnávání průměrného pořadí v jednotlivých dvojicích podskupin. Výsledky jsou graficky prezentovány prostřednictvím krabicových grafů (boxplotů), přičemž referenční tečkovaná čára naznačuje práh pro hodnocení pozitivitu jednotlivých markerů. Tam, kde násobné porovnání neodhalilo žádnou významnou dvojici

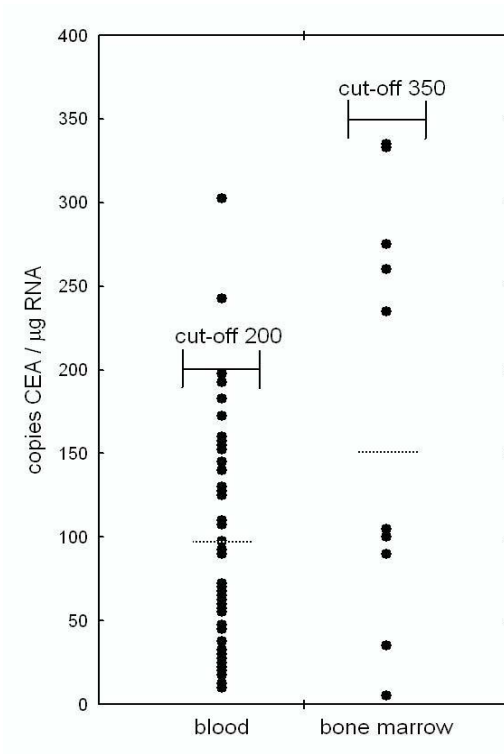
na hladině 5%, jsou v boxplotech vyznačeny i dvojice významné až na hladině 10%. Statistickou analýzu provedla Mgr. Jana Vrbková a výsledky jsou publikovány s jejím laskavým souhlasem.

### **4.5 Výsledky**

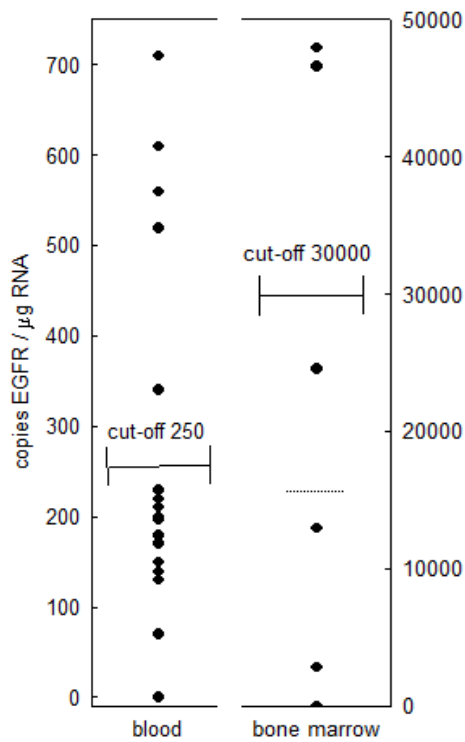
#### **4.5.1 Kontrolní skupina**

Do kontrolní skupiny byli zařazeni zdraví jedinci. 98 zdravým pacientům byly odebrány vzorky periferní krve a 12 vzorků kostní dřeni od pacientů, podstoupivších operaci kýly či cholecystectomii, a ze vzorků byla stanovena exprese onkomarkerů CEA (A), EGFR(B), LunX(C) a c-Met(D). Cut-off hodnota pro pozitivitu CTC byla vypočítána jako dvojnásobek normální odchylky.

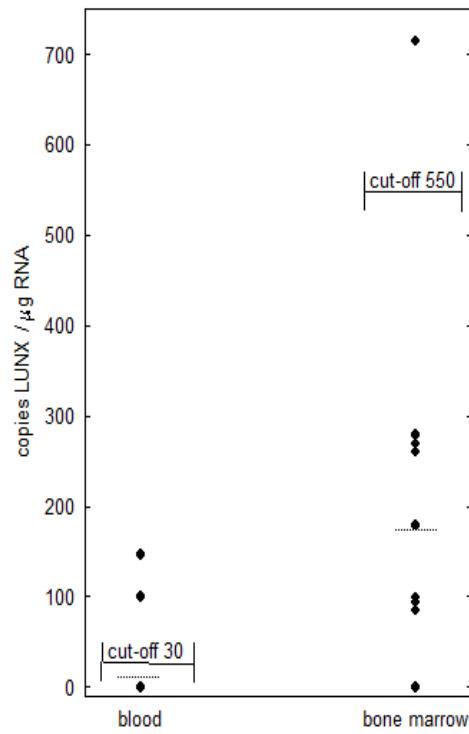
Obr. č. 9: CEA



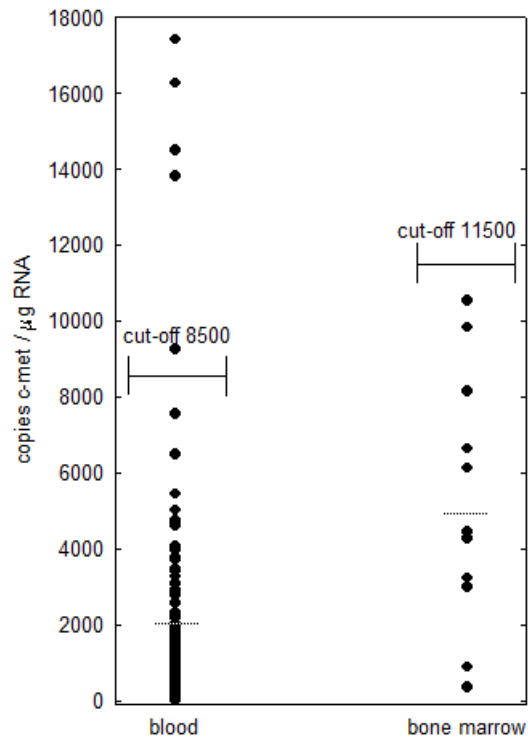
Obr. č. 10: EGFR



Obr. č. 11: LunX

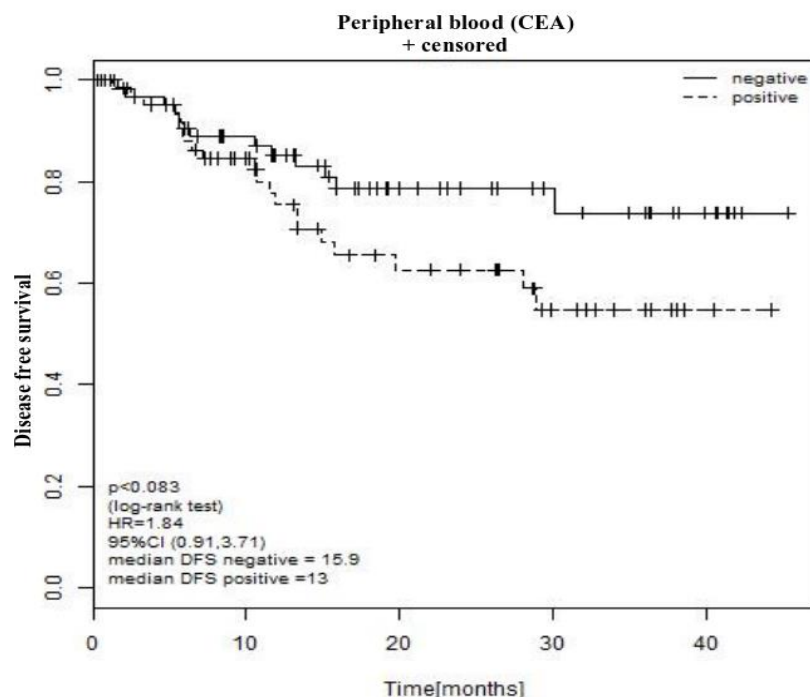


Obr. č. 12: c-Met



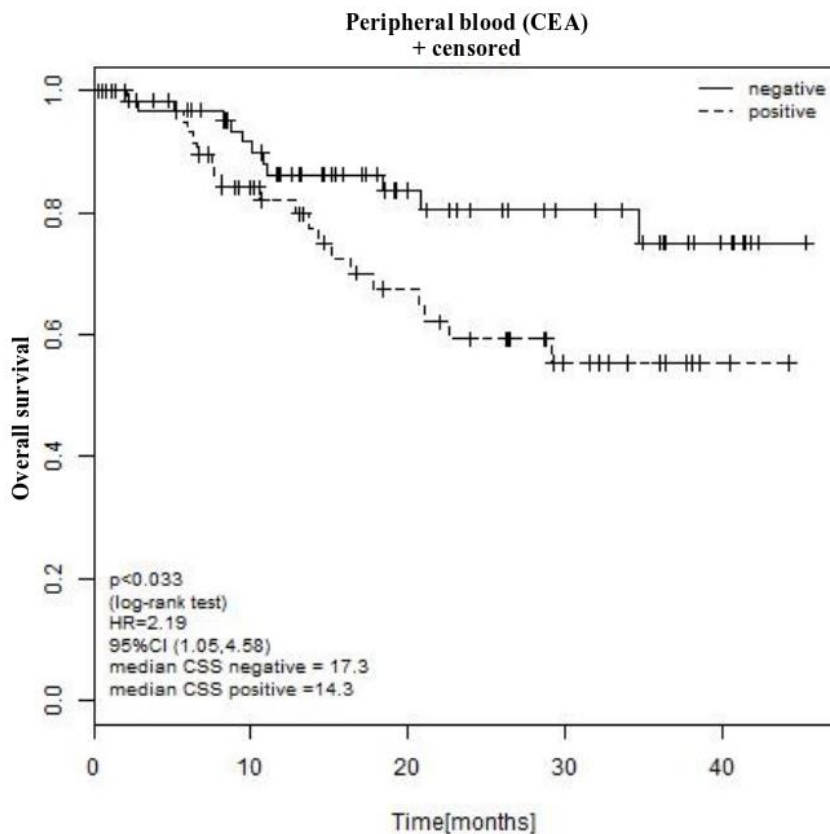
#### 4.5.2 Vztah MRD k disease free intervalu a celkové doby přežívání u nemocných s NSCLC

Obr. č. 13: Disease free interval u pacientů s karcinomem plic podle přítomnosti či nepřítomnosti CTC v periferní krvi stanovený pomocí metody RT-PCR u CEA.



Recidiva onemocnění byla zachycena u 34 nemocných (24,8 %) s DFI intervalem 14,6 měsíců. 32 pacientů ze souboru zemřelo a OS interval (délka přežití nemocných) byl 15,2 měsíců. U pacientů s karcinomem plic s prokázanou minimální reziduální chorobou v periferní při použití specifického markeru CEA (vyšší hodnota exprese mRNA CEA než cut off hodnota získaná od kontrolní skupiny) má signifikantně kratší DFI interval a vyšší hazard ratio ( $p < 0,083$ ;  $HR = 1,84$  [95 % CI: 0,91–3,71]) a kratší OS interval a vyšší hazard ratio ( $p < 0,033$ ;  $HR = 2,19$  [95 % CI: 1,05–4,58]) ve srovnání s pacienty bez přítomnosti minimální reziduální choroby (obr. 13,14). Nebyly pozorovány signifikantní rozdíly výsledků při určování minimální reziduální choroby z kostní dřeně, plicní či periferní krve. Jen vzorky periferní krve od nemocných jsou snáze dostupné. V našem souboru nemocných jsme prokázali, že přítomnost minimální reziduální choroby u nemocných s karcinomem plic je negativní prognostický faktor. My můžeme určit nemocné, kteří mají kratší DFI a OS interval pomocí exprese CEA v periferní krvi. Tím pádem můžeme vyselektovat nemocné, u kterých lze nastavit přímo na míru sestavit adjuvantní onkologickou léčbu a také určit nemocné u kterých i přes extenzivní chirurgický výkon nedojde k prodloužení přežití.

Obr. č. 14: Overall survival interval u pacientů s karcinomem plic podle přítomnosti či nepřítomnosti CTC v periferní krvi stanovený pomocí metody RT-PCR u CEA.



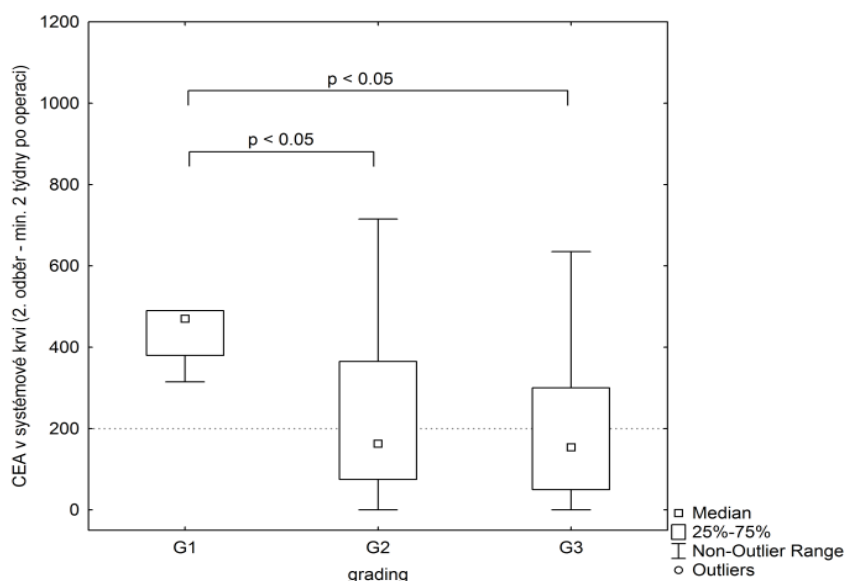
### 4.5.3 Statisticky významné výsledky jednotlivých onkomarkerů

#### 4.5.3.1 CEA

Na hladině 5 % se statisticky významně liší distribuce CEA v systémové krvi ve 2. odběru (minimálně 2 týdny po operaci) dle gradingu (Kruskalův-Wallisův test, p-value=0,0075). Nejvyšších hodnot dosahuje ve skupině G1 a tyto hodnoty se významně odlišují od ostatních skupin (násobné porovnávání G1 vs. G2: p-value=0,047, G1 vs. G3: p-value=0,005).

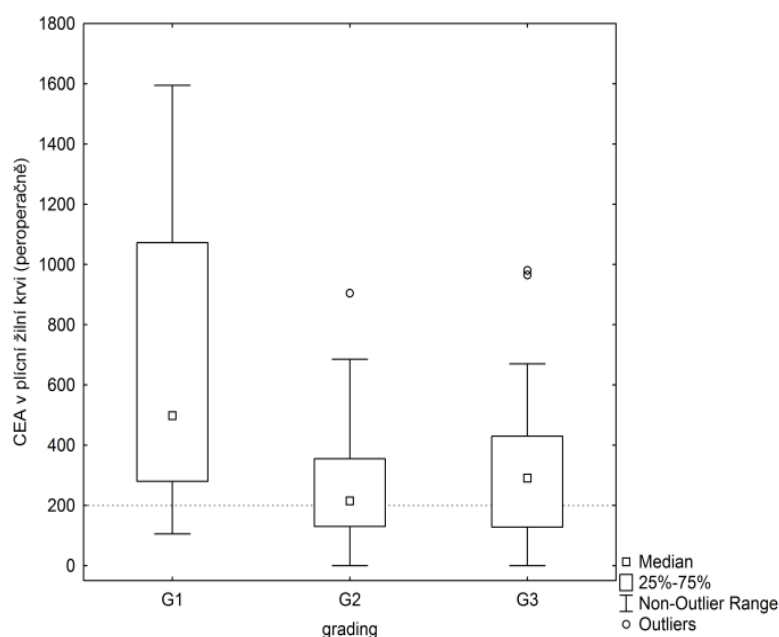
Na hladině 10 % se distribuce CEA liší vzhledem ke gradingu ještě v plicní krvi (Kruskalův-Wallisův test, p-value=0,0848) a vzhledem ke stádiu (Kruskalův-Wallisův test, p-value=0,0832), postižení mizních uzlin (Wilcoxonův dvouvýběrový test, p-value=0,0916) a histologii v kostní dřeni (Kruskalův-Wallisův test, p-value=0,0813).

Obr. č. 15: Expresse CEA v systémové krvi (2. odběr - min. 2 týdny po operaci) ve vztahu k histologické diferenciaci nádoru



V druhém odběru sytemové krvi s odstupem 2 týdnů statisticky významně na hladině 5 % ( $p\text{-value}=0,0075$ ) roste exprese mRNA CEA s Gradingem G1 oproti nemocným ve vyšším stádiem G2, G3. Nejvyšších hodnot dosahovaly ve skupině G1 a tyto hodnoty se významně odlišovaly od ostatních skupin (násobné porovnávání G1 vs. G2:  $p\text{-value}=0,047$ , G1 vs. G3:  $p\text{-value}=0,005$ ), (obr. č. 15).

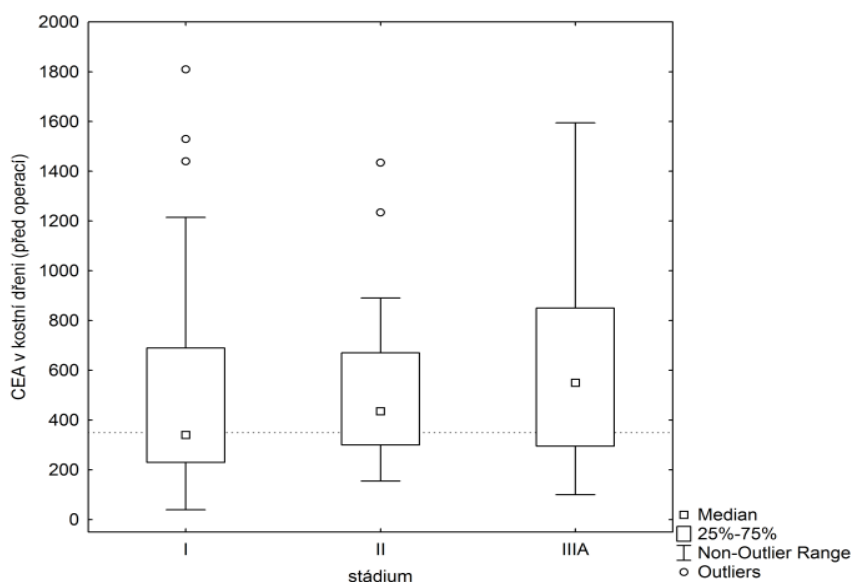
Obr. č. 16: Expresse CEA v plicní žilní krvi pooperačně ve vztahu k histologické diferenciaci nádoru





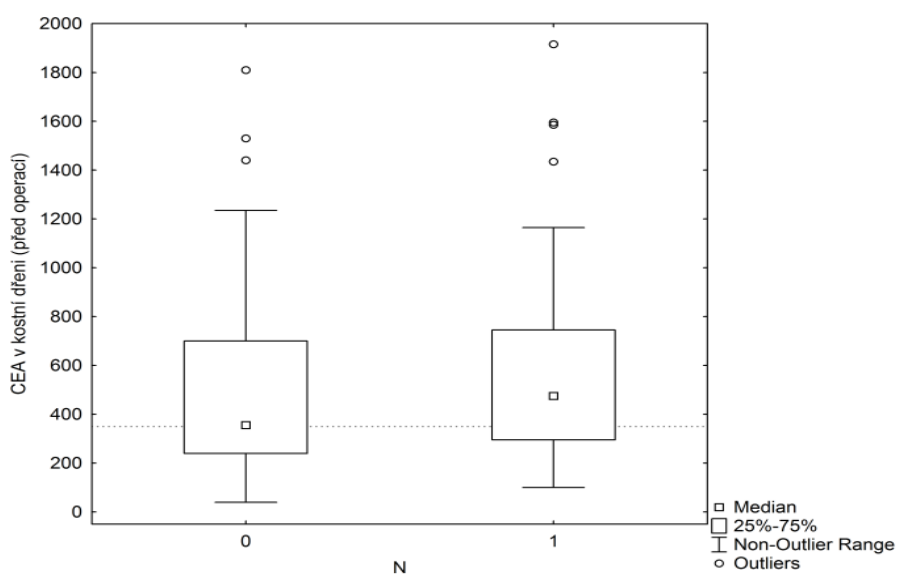
Na statistické hladině 10% se exprese mRNA CEA lišila vzhledem ke gradingu ještě v plicní krvi (Kruskalův-Wallisův test,  $p$ -value=0,0848). I zde byla opět nejvyšší v G1 oproti G2, G3 (obr. č. 16).

Obr. č. 17: Expese CEA v kost. dřeni před operací ve vztahu ke klinickému stádiu



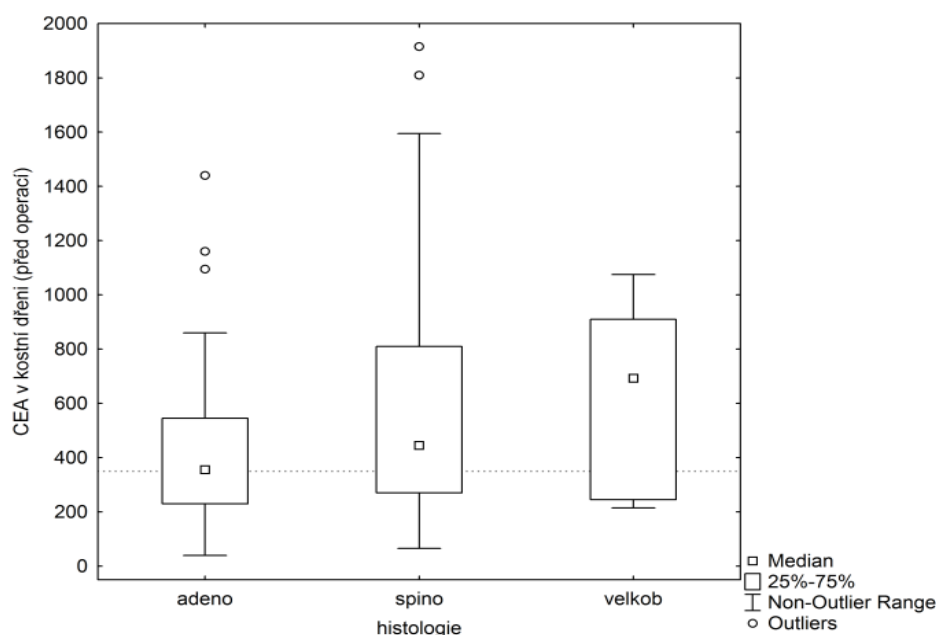
Na hladině statistické významnosti 10% byl patrný nárůst exprese mRNA CEA (z předoperačním odběrem kostní dřeně) s vyšším klinickým stádiem (Kruskalův-Wallisův test,  $p$ -value=0,0075), (obr. č. 17).

Obr. č. 18: Expese CEA v kost. dřeni před operací ve vztahu k postižení uzlin



Obdobně zde byla korelace exprese CEA dle postižení uzlin (předoperačním odběru v kostní dřeni). S narůstajícím N stádiem dochází k zvýšení exprese mRNA na statistické hladině významnosti 10% (Wilcoxonův dvouvýběrový test,  $p\text{-value}=0,0916$ ), (obr. č. 18).

Obr. č. 19: Expresa CEA v kostní dřeni před operací v závislosti na histologickém typu nádoru



U velkobuněčného karcinomu (předoperačním odběru kostní dřeni) byla vyšší exprese mRNA CEA oproti ostatním typům karcinomů plic na statistické hladině 10% ((Kruskalův-Wallisův test,  $p\text{-value}=0,0813$ ), (obr. č. 19).

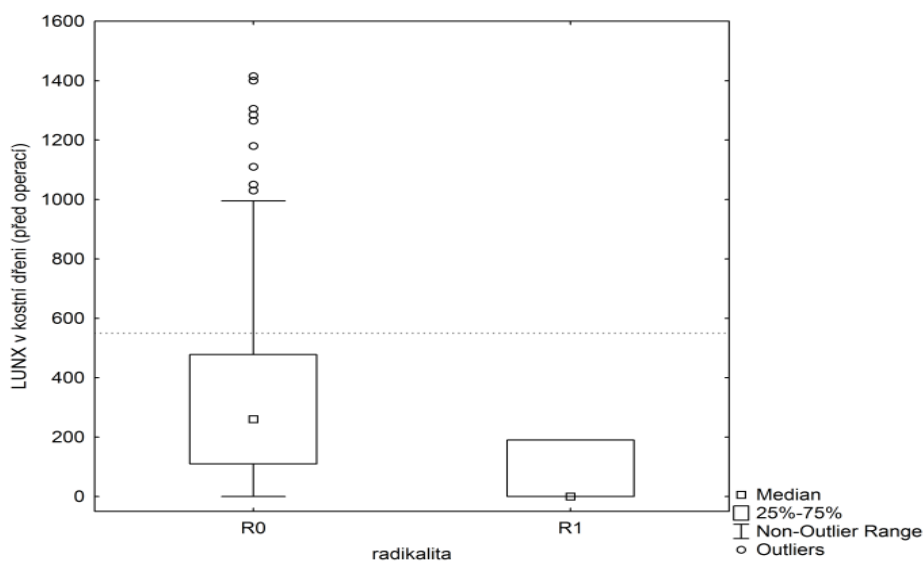
#### 4.5.3.2 EGFR

Distribuce EGFR se vzhledem k žádnému klinickému faktoru v žádném kompartmentu statisticky významně neodlišuje, a to ani na hladině významnosti 10%.

#### 4.5.3.3 LunX

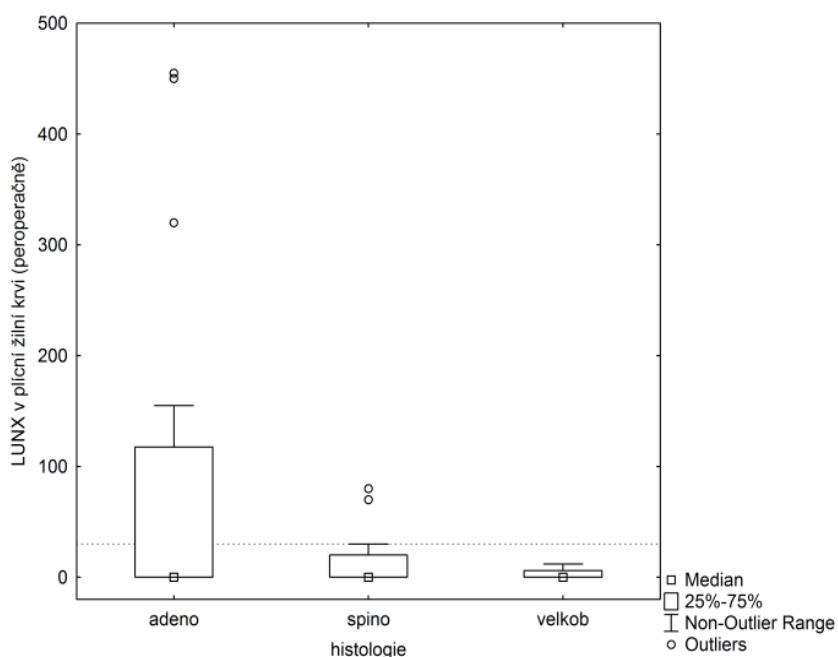
Na hladině významnosti 5 % se statisticky významně lišila distribuce LUNX v kostní dřeni vzhledem k provedení resekce R0 nebo R1 (Wilcoxonův dvouvýběrový test,  $p\text{-value}=0,0453$ ), kde ovšem jistou roli může hrát fakt, že počet pacientů s typem R1 je velmi malý. Distribuce LUNX se statisticky významně odlišovala ještě na hladině 10 % vzhledem k histologickému typu nádoru, a to jak v plicní krvi (Kruskalův-Wallisův test,  $p\text{-value}=0,0850$ ), tak v kostní dřeni (Kruskalův-Wallisův test,  $p\text{-value}=0,066$ ). V ostatních kompartmentech byla distribuce LUNX vzhledem k žádnému faktoru statisticky významně nelišila, a to ani na hladině 10 %.

Obr. č. 20: Expres LunX v kostní dřeni před operací ve vztahu k radikalitě výkonu

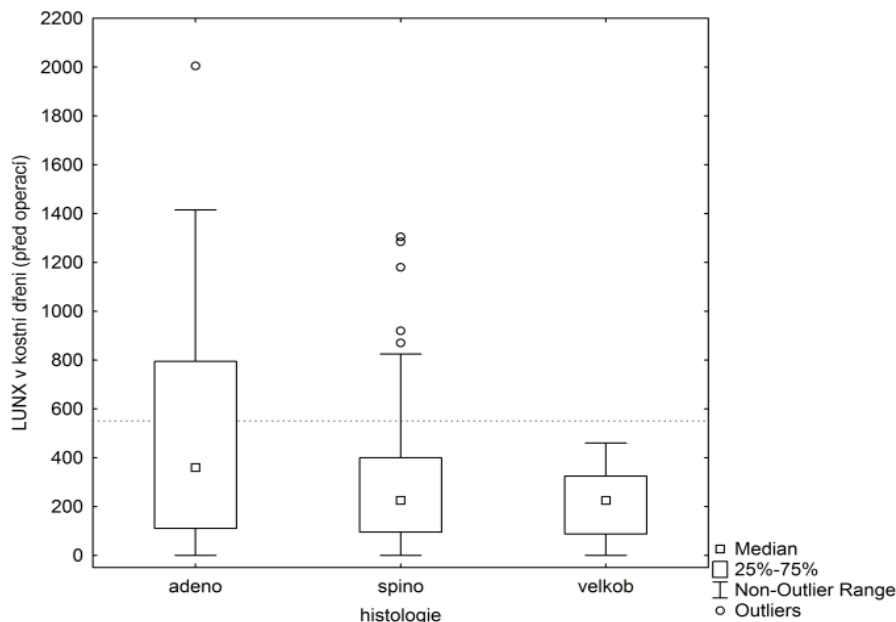


Na statistické hladině významnosti 5 % (Wilcoxonův dvouvýběrový test,  $p\text{-value}=0,0453$ ) exprese mRNA LunX (předoperační odběr kostní dřene) byla vyšší u nemocných, u kterých byla provedena radikální resekcce R0, oproti nemocným, u kterých ponechán mikroskopicky pozitivní resekcční okraj. Určitou roli zde mohlo hrát fakt, že v souboru byla pouze u 3 nemocných provedena R1 resekcce (obr. č. 20).

Obr. č. 21: Expres LunX v plicní žilní krvi pooperačně ve vztahu k histologickému typu nádoru



Obr. č. 22: Expres LunX v kostní dřeni před operací ve vztahu k histologickému typu nádoru

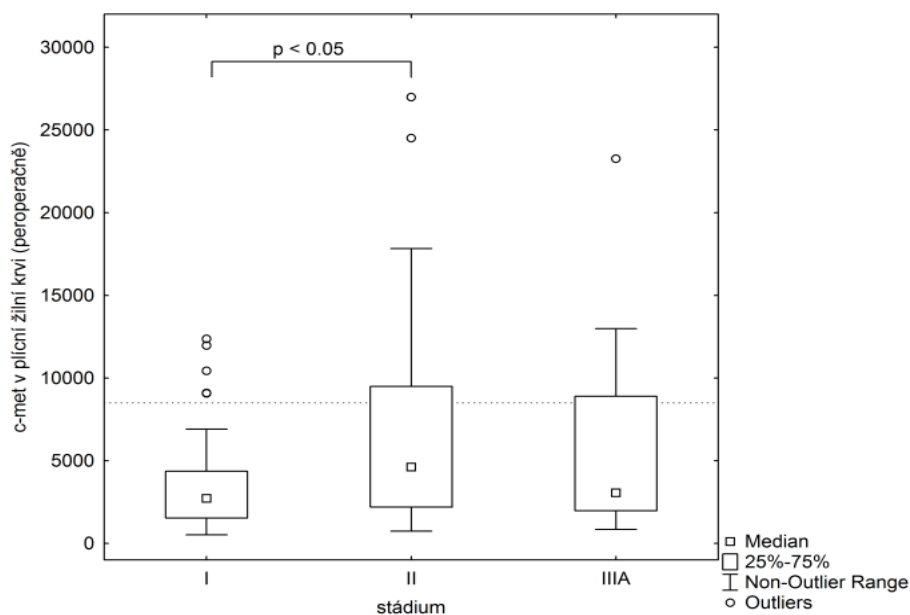


Na hladině statisticky významnosti 10 %, se lišila exprese mRNA LunX v plicní krvi (Kruskalův-Wallisův test, p-value=0,0850) i v kostní dřeni odebrané předoperačně (Kruskalův-Wallisův test, p-value=0,066) dle histologického typu nádoru. Nejvyšší exprese mRNA LunX byla v obou kompartmentech pozorována u adenokarcinomů, (obr. č. 21, 22).

#### 4.5.3.4 c-Met

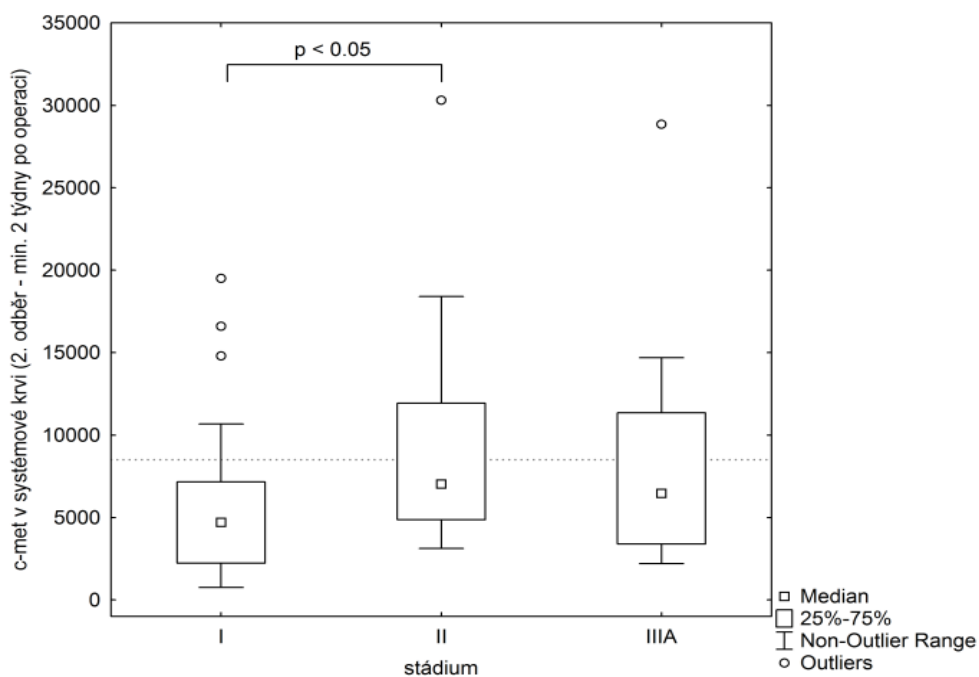
Distribuce c-met se statisticky významně lišila na hladině významnosti 5 % vzhledem ke stádiu v plicní krvi (Kruskalův-Wallisův test, p-value=0,0399) a systémové krvi ve 2. odběru (Kruskalův-Wallisův test, p-value=0,0272), vzhledem k postižení uzlin rovněž v plicní krvi (Wilcoxonův dvouvýběrový test, p-value=0,0037) a potom vzhledem ke gradingu (Kruskalův-Wallisův test, p-value=0,0238) a histologickému typu v kostní dřeni (Kruskalův-Wallisův test, p-value=0,0493). Na hladině významnosti 10% byl zjištěn statisticky významný rozdíl v distribuci c-met ještě v systémové krvi před operací vzhledem k postižení uzlin (Wilcoxonův dvouvýběrový test, p-value=0,0755).

Obr. č. 23: Expresse c-met v plicní žilní krvi pooperačně v závislosti na klinickém stádiu



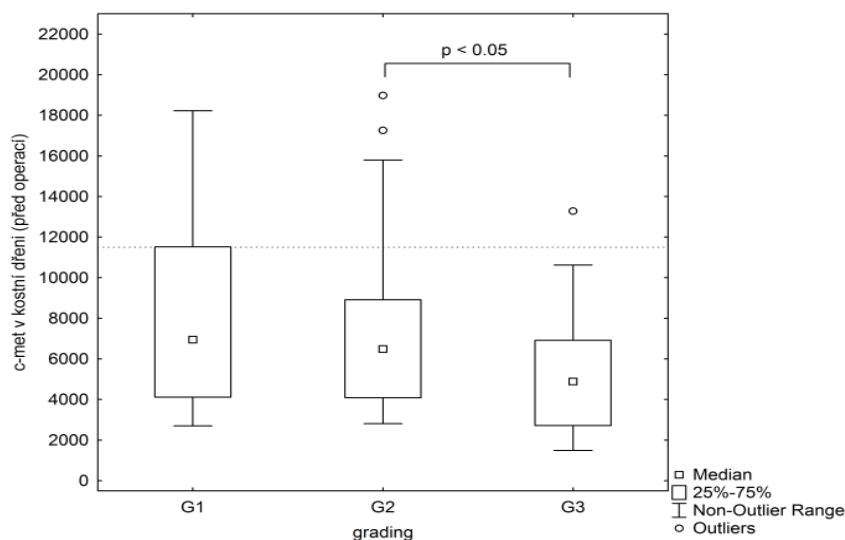
Expresse mRNA C-met (v odběru plicní žilní krve) v nízkém TNM stádiu se významně lišila oproti vyšším stádiím II, IIIA na hladině statistické významnosti 5 % (Kruskalův-Wallisův test,  $p$ -value=0,0399), (obr. č. 23).

Obr. č. 24: Expresse c-met v systémové krvi (2. odběr - min. 2 týdny po operaci) ve vztahu ke klinickému stádiu



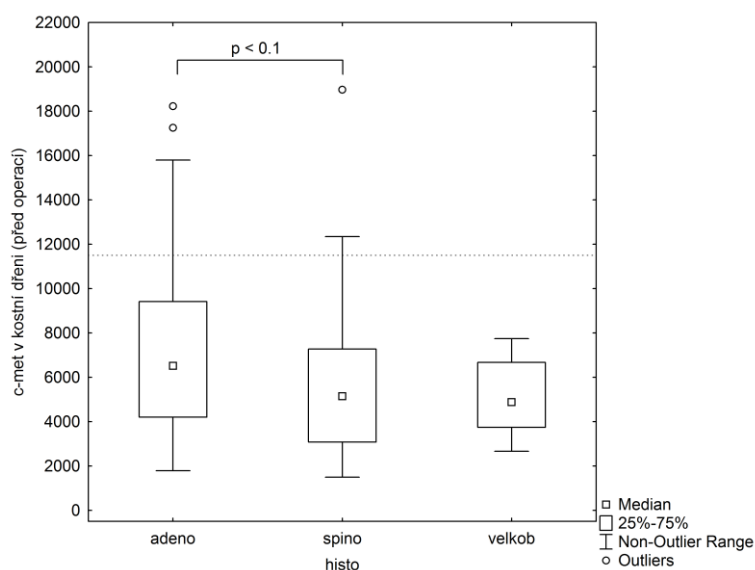
Opět exprese mRNA C-met (v odběru 2 týdny po operaci v periferní krvi) v nízkém TNM stádiu byla statisticky významně nižší oproti vyšším TNM stádiím II a IIIA a to na hladině statistické významnosti 5 % (Kruskalův-Wallisův test, p-value=0,0272), (obr. č. 24).

Obr. č. 25: Expresse c-met v kostní dřeni před operací ve vztahu k histologické diferenciaci nádoru



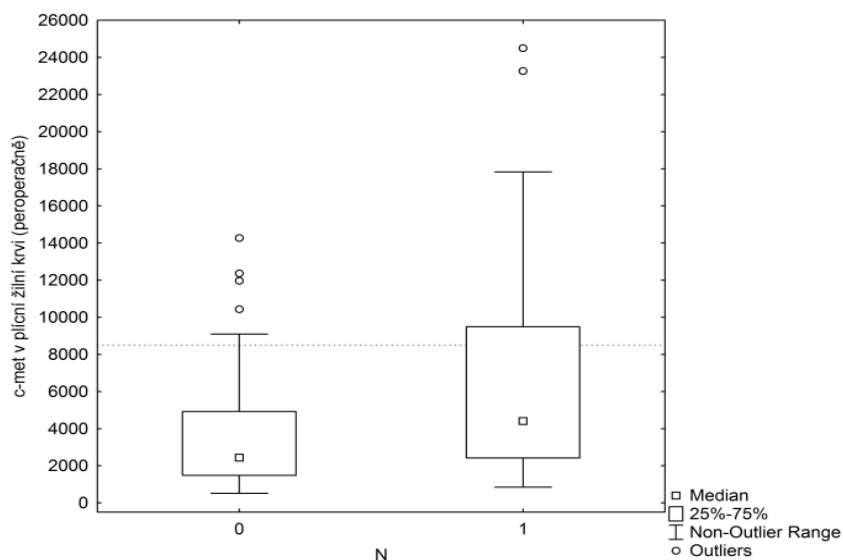
Na hladině statistické významnosti 5 % (Kruskalův-Wallisův test, p-value=0,0238) byla vyšší exprese mRNA c-Met (předoperačním odběru kostní dřeně) v G1 oproti Gradingu II a III (obr. č. 25).

Obr. č. 26: Expresse c-met v kostní dřeni před operací ve vztahu k histologickému typu nádoru



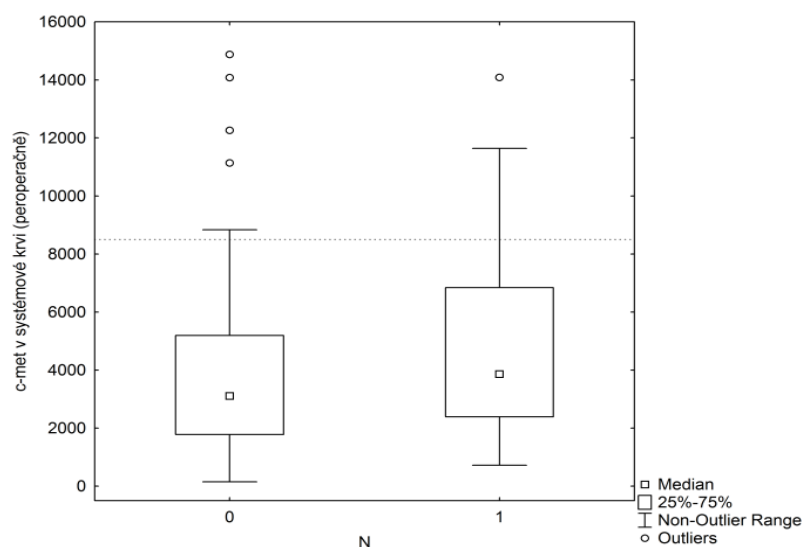
U adenokarcinomu (předoperačním odběru kostní dřeně) byla vyšší exprese mRNA c-Met oproti ostatním typům karcinomů plic na statistické hladině 5 % (Kruskalův-Wallisův test, p-value=0,0493), (obr. č. 26).

Obr. č. 27: Expresa c-met v plicní žilní krvi pooperačně ve vztahu k postižení uzlin



Nižší exprese mRNA c-Met (v plicní žilní krvi) byla zaznamenána u pacientů s negativními uzlinami N0 oproti nemocným s pozitivními uzlinami N1 a to se statistickou významností 5 % (Wilcoxonův dvouvýběrový test, p-value=0,0037), (obr. č. 27).

Obr. č. 28: Expresa c-met v syst. krvi pooperačně ve vztahu k postižení uzlin



Byl zjištěn 10 % statisticky významný rozdíl v distribuci c-met (odebrané systémové krvi před operací) vzhledem k postižení uzlin (Wilcoxonův dvouvýběrový test, p-value=0,0755) a o to u nemocných s postižením uzlin byla exprese mRNA c-Met vyšší než u pacientů bez postižení uzlin (obr. č. 28).



## 5. Diskuze

Pojmem minimální reziduální choroba u karcinomu plic či jiného solidního nádoru rozumíme přítomnost cirkulujících nádorových buněk v těle nemocného po radikální resekcí nádoru. Kdy a za jakých podmínek dochází k přeměně těchto cirkulujících nádorových buněk v metastázy doposud neznáme, pouze existuje pouze předpoklad toho, které pochody jsou k tomuto procesu nutné.

Při metastazování zhoubného nádoru musí být splněny základní předpoklady. Na modelech bylo prokázáno, že 1 g nádorové tkáně je schopen do oběhu uvolnit až 1 milion nádorových buněk za jeden den [112]. Aby k tomu mohlo dojít, je na počátku nutné, aby se buňky z nádorové tkáně mohly uvolnit, tedy vymanit se ze soudržnosti buněk okolních. Dále musí být schopny pronikat skrze bazální membrány epitelů a cévní stěnu. Buňky, které proniknou do cirkulace, se musejí vymknout kontrole imunitního systému a získat novou schopnost přežít v nepřátelském prostředí. Buňky, cirkulující v krevním oběhu, se nazývají volné cirkulující nádorové buňky (CTC). Nádorová buňka se brání produkcí ochranných látek, jako např. transmembránových proteinů, Fas ligandů (FasL) nebo protiapoptických proteinů Bcl-2. Tyto a jiné mechanismy uplatňuje k tomu, aby unikla nepřátelskému hostitelskému imunitnímu systému a tedy byla schopna přežít. Množství cirkulujících nádorových buněk je nicméně apoptotických. Další z nich jsou zbaveny proteosyntézy a proliferace. Některé jsou dormantní, tj. živé, ale jen se volně po řadu let pohybují v cirkulaci, bez vlastního dělení a dalších projevů, nezbytných pro založení metastázy. Doposud nebylo zjištěno, kdy dochází či jakým mechanismem vzniká po odstranění primárního nádoru z těchto volně cirkulujících nádorových buněk, relaps nádorového onemocnění.

Na místě vzniku metastázy musí nádorová buňka v každém případě opět cévu opustit a usídlit se v cílové tkáni. V cílové tkáni je pak nejdůležitějším faktorem k úspěšnému růstu zachování přístupu ke zdroji kyslíku a přísunu živin. Nádorové buňky jsou schopny tvořit cévy pro svoji potřebu, a to označujeme nádorovou angiogenezi, přičemž samy produkují faktory angiogenezi podporující. Mezi ně patří vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) nebo fibroblastový růstový faktor (FGF), začátek růstu nádoru je spojen se zvýšenou produkcí těchto růstových faktorů [147].

I při brzkém stanovení diagnózy u nemocného s karcinomem plic s nízkým TNM stádiem, navzdory provedení radikální resekce, zůstává stále přežívání nemocných v I. a II. stádiu neuspokojivé, pouze 57 – 78 %, resp. 39 – 66 % [31]. Navzdory všem inovacím v operační technice, především torakoskopicky asistovaným výkonům, kdy dochází k maximálnímu snížení komplikací a zkrácení doby hospitalizace, nedochází k výraznému prodloužení přežívání nemocných. Další zásadní pokroky v operační technice již v současné době nelze předpokládat, proto jediným možným směrem, kam lze upřít pozornost, je molekulárně biologická úroveň

nádorů. Cílem je přesně rozklíčovat jednotlivé stupně kancerogeneze a hlavně zjistit, kdy a za jakých podmínek se mění volně cirkulující nádorová buňka v metastázu. Pokud při použití molekulárně genetických metod získáme možnost vyselektovat pacienty se zvýšeným rizikem relapsu onemocnění, budeme je tak schopni léčit dříve, nejlépe ještě v době než relaps nastane. Proto je nezbytně nutné se zaměřit na stanovení minimální reziduální choroby (MRD), kterou bychom tak mohli použít jako diagnostický a zároveň prognostický faktor.

Význam minimální reziduální choroby se daří objasňovat velice pomalu. Největší zkušenosti s monitorováním minimální reziduální choroby mají hematologové, jelikož známkou úspěšné léčebné strategie, je dosažení kompletní remise. Tuto remisi můžeme rozdělit na klinickou kompletní remisi (CCR) a molekulární kompletní remisi (MCR). Klinickou kompletní remisí dosud ale rozumíme nepřítomnost nádorových buněk, zjištěná pomocí klasických, běžně užívaných metod (mikroskopie, radiodiagnostika). Zde nelze ovšem vyloučit časnou recidivu onemocnění, jelikož tyto diagnostické metody nejsou dostatečně citlivé k průkazu cirkulujících nádorových buněk, které relaps onemocnění s časovým odstupem zapříčiní. I v léčbě hematologických malignit je proto využívána polymerázová řetězová reakce pro detekci MRD, která je schopna detekovat 1 nádorovou buňku mezi milionem buněk nenádorových. Neidentifikujeme-li nádorové buňky ani pomocí těchto nových molekulárně-genetických metod, mluvíme o kompletní molekulární remisí. Tento výsledek je považován za příznivý prognostický faktor [110,117]. Podobně bylo prokázáno, že i solidní nádory mají svou leukemickou fázi [112].

Minimální reziduální chorobu lze nejlépe detekovat na základě rozdílné genové exprese mezi buňkami nádorovými a nenádorovými pomocí real time polymerázové řetězové reakce [125]. Tato metoda byla zvolena i námi v našem projektu. Dle dosud celosvětově proběhlých studií byly k naší práci zvoleny onkomarkery CEA, LunX, EGFR a c-Met, pomocí kterých byla minimální reziduální choroba detekována. Vzhledem k tomu, že nejsou dosud jednoznačně známy mezní hodnoty pro tyto markery, určili jsme „cut-off“ hodnoty na podkladě hodnot odebraných od 98 zdravých dárců krve a 12 dárců kostní dřeně. Cut-off hodnoty pro pozitivní versus negativní hodnocení minimální reziduální choroby byly stanoveny jako průměrná hodnota exprese markeru v kontrolním souboru + 2 směrodatné odchylky (standart deviation, SD). V naší práci potvrzujeme, že RT PCR je velmi senzitivní a specifická metoda k určení minimální reziduální choroby u plicího karcinomu, podobně jako potvrdily jiné dosud publikované práce [124,132,138,140,148].

Detekcí minimální reziduální choroby můžeme vyselektovat nemocné s kratším přežíváním a brzkou rekurencí maligního onemocnění. Přítomnost minimální reziduální choroby signalizuje vyšší šanci rekurence onemocnění a možnou přítomnost metastáz, a tím tedy horší prognózu

onemocnění. Z našich výsledků vyplývá, že přítomnost minimální reziduální choroby je negativní prognostický faktor u plicního karcinomu, což je ve shodě s dosud zveřejněnými pracemi [140,141,148].

MRD byla již prokázána jako prognostický marker i u dalších solidních nádorů, například u karcinomu pankreatu, kdy byla zjištěna statisticky potvrzená významná závislost v portální krvi mezi expresí EGFR a klinickým stádiem onemocnění [124]. U kolorektálního karcinomu byla zaznamenána signifikantní závislost mezi postižením uzlin a přítomností minimální reziduální choroby v periferní a portální krvi [123].

Pokud se týče zhodnocení významu jednotlivých markerů, použitých námi k detekci minimální reziduální choroby, onkomarker EGFR se jako predikční parametr neosvědčil. Jeho hladina nekorelovala v naší práci statisticky se žádným zjištěným klinickým faktorem, na rozdíl od dvou dosud publikovaných studií, které onkomarker EGFR zjistily jako použitelný prediktivní parametr [139,149].

Velké naděje byly vkládány do objevu nového plicního specifického onkogenu LunX v roce 2001. Jeho specifita a senzitivita pro plicní karcinom byla potvrzena mnoha pracemi [136,137,138,150,151,152]. Detekce LunX probíhala pomocí RT-PCR a byla potvrzena v různých tělních kompartmentech. V závislosti na jednotlivých studiích byla vždy srovnávána exprese mRNA LunX u plicního karcinomu oproti benignímu onemocnění či jiné malignitě. Jako nejvhodnější místo k detekci je periferní krev. Co do prognózy nemocných ve vztahu k LunX, existuje pouze ojedinelá práce z roku 2014 [139], která ukazuje na přítomnost exprese LunX pouze u necelé poloviny ze 42 pacientů s karcinomem plic a u porovnávané skupiny nemocných s benigním onemocněním nebyl exprimován vůbec. S narůstajícím klinickým stádiem dochází k výrazně vyšší expresi specifického onkomarkeru LunX spolu se zkrácením přežívání pacientů. Bohužel, v našem souboru nemocných nebyla zjištěna žádná statisticky významná korelace ve vztahu k LunX, kterou by bylo možno přenést do klinické praxe. V kostní dřeni u pacientů s provedenou radikální resekci R0 byla statisticky významně vyšší exprese (p-value=0,0453) než u nemocných s R1 resekci, což ovšem nemá žádný klinický impakt. Naše výsledky tak bohužel nepotvrzují počáteční optimismus spojený s objevem LunX.

C-Met je významným onkomarkerem v diagnostice a léčbě karcinomu plic, ale sám o sobě není dostatečně citlivý k detekci minimální reziduální choroby, v kombinaci s CEA a CK 19-9 se však jeho role výrazně zvyšuje. Jeho hlavní význam spočívá v prokázané korelaci jeho hladiny v periferní krvi a klinickým stádiem onemocnění. Z toho vyplývá, že u pacientů se zvýšenou hladinou c-Met můžeme předpovídat zvýšené riziko relapsu maligního onemocnění [144,145]. Obdobné výsledky dokládáme i v naší práci. Expresie mRNA c-Met v žilní krvi u pacientů ve stádiu I dle TNM klasifikace je statisticky významně nižší (5%, p-value = 0,0399)

než ve vyšších TNM stádiích, stejné výsledky na statisticky významné hladině 5 % (p-value=0,0272) jsou v periferní krvi, kde ve 2. odběru periferní krve je mRNA c-Met méně exprimován v nižším stádiu než ve stádiích vyšších (II a IIIA). Dalším důkazem toho, že c-Met koreluje s klinickým stádiem, je skutečnost, že statisticky významně (5%, p-value= 0,0037) dochází nižší expresi mRNA c-Met u nemocných s negativními uzlinami oproti nemocným, kde byly uzliny infiltrovány metastázami karcinomu. Statisticky významný rozdíl (5 %, p-value=0,0493) exprese mRNA c-Met v žilní krvi byl i ve srovnání mezi jednotlivými stupni diference. Tyto výsledky lze vysvětlit mimo jiné tím, že c-Met je sám o sobě protoonkogenem, spoluzodpovědným za nádorovou invazivitu a tvorbu vzdálených metastáz. Gefitinib přímo blokuje funkci c-Met a navíc působí blokádu HGFR receptoru [153,154].

CEA patří mezi nejčastěji používané onkomarkery k monitorování účinků léčby u solidních nádorů. Jeho zvýšená exprese je prokázána hlavně u gastrointestinálních nádorů, a to až v 95 % [130,131]. S velkou výhodou ho lze použít jako sérový nádorový marker při sledování u nemocných po chirurgické resekci kolorektálního karcinomu, kdy při zvýšení jeho hladiny může docházet k relapsu nádorového onemocnění [155]. Dle několika prací je možno pomocí jeho exprese potvrdit přítomnost minimální reziduální choroby, a to nejlépe v kombinaci s c-Met a CK 19-9 za použití multimarkerové analýzy [144,145]. V naší práci jsme prokázali, že u pacientů s plicním karcinomem a prokázanou MRD pomocí exprese mRNA CEA v periferní krvi je signifikantně kratší disease free interval a kratší OS interval ve srovnání se skupinou pacientů bez přítomnosti minimální reziduální choroby. Při vyšetření jednotlivých kompartmentů (periferní krve, kostní dřeně a žilní systémové krve) jsme nepozorovali žádný rozdíl při detekci minimální reziduální choroby. V druhém odběru systémové krve s odstupem 2 týdnů byla zjištěna statisticky významně vyšší exprese mRNA CEA u gradingu G1 na hladině 5 % (p-value=0,0075) oproti nemocným ve vyšších stádiích G2 a G3. To popírá hypotézu, že při rostoucím gradingu by měla hladina detekce minimální reziduální choroby vzrůstat. Jiné zjištěné výsledky již nedosahovaly statisticky významné hladiny 5 %.

Dalším naším cílem bylo dále potvrdit či vyvrátit zvýšenou expresi jednotlivých onkomarkerů u různých histologických typů NSCLC, což jsme na našem souboru nemocných neprokázali.

Nelichotivé výsledky v přežívání nemocných s radikálně odoperovaným plicním karcinomem v nízkém TNM stádiu nás neustále nutí se ptát, proč tomu tak je. U nemocných ve stádiu I dochází k relapsu u 30 % pacientů, ve většině případů jde o systémovou recidivu. Pokud bychom považovali volně cirkulující nádorové buňky za zodpovědné za progresi onemocnění, je nutné detekovat a sledovat jejich hladinu. Z našich výsledků vyplývá, že přítomnost MRD je prognostickým faktorem ukazujícím na snížení přežití a koresponduje s kratším disease free intervalem. Míra exprese minimální reziduální choroby v různých

kompartimentech koreluje s klinickým stádiem onemocnění i postižením uzlin. Přítomnost cirkulujících nádorových buněk v krvi před operací signalizuje časný relaps nemocných. Pomocí MRD bude možné vyselektovat skupinu nemocných s nízkým TNM stádiem, u kterých by se sice standardně zajišťovací onkologická léčba nepodávala, ale v závislosti na přítomnosti MRD by ji u této skupiny pacientů bylo možné preventivně podat. Tím pádem by bylo možné snížit riziko časně recidivy onemocnění a výrazně prodloužit přežívání nemocných. Při monitoraci MRD v pooperačním období by bylo možné navíc časnou recidivu zavčas zachytit, dříve než dojde k diseminaci onemocnění. Pomocí MRD lze individualizovat terapii, stanovit ji přesně na míru, jelikož se svým významem patrně více blíží diagnostice chování nádorového onemocnění (agresivita apod.) než TNM klasifikace, která nemocného zařadí pouze hrubě podle morfologie a velikosti nádoru. Ty ovšem, zejména u malých nádorů, vůbec nemusí odpovídat skutečným vlastnostem a chování nádoru. A proto je potřeba uvažovat o zavedení pojmu molecular staging, který by, stejně jako v hematologii, znamenal pozitivní prognostický faktor [156].

Po řadu let je stále na chirurgických fórech živě diskutována otázka, zda nešetrná manipulace tumorem a nedodržení zásad „no touch“ techniky při operaci zvyšuje množství nádorových buněk vyplavených do systémového oběhu. Dle studií provedených Turbullem a Hayashim nedodržení zásad „no touch“ techniky a zbytečnou manipulací s tumorem se zvyšuje jednoznačně množství cirkulujících nádorových buněk a snižuje přežívání nemocných [157,158].

V hrudní chirurgii k z toho ovšem vyplývá další problém. Pokud při manipulaci s tumorem narůstá množství cirkulujících buněk v systémové krvi, je třeba se zamyslet nad doposud zavedeným technicistním přístupem plicní resekce, spočívajícím v pořadí podvazu plicních cév, kdy se podvazují nejprve žíly a pak tepny. To vychází z obavy ze zvýšeného krvácení tkání, pokud by byly podvázány nejprve plicní žíly. Primární podvaz žil by ale mohl snížit množství vyplavených cirkulujících nádorových buněk z primárního nádoru, jelikož žilní krev jde přímo levé síně a následně pokračuje do velkého krevního oběhu. Toto téma není z pohledu validních studií dosud dostatečně zpracováno. Nejpropracovanější práci na toto téma zveřejnil Song, který na ale i tak nevelkém souboru pacientů s karcinomem plic prokázal, že při jakékoliv manipulaci dochází k vyplavení cirkulujících buněk, oproti tomu při podvazu žil před tepnami nedochází k tak velkému uvolnění nádorových buněk do cirkulace [159]. V dnešní době, kdy nastává rozmach videoasistovaných lobektomií, u kterých je obvykle standardně nejprve ošetřena žíla a až následně tepna, by tato operační technika měla potenciálně snížit vyplavení nádorových buněk do cirkulace. Tento předpoklad ovšem zpochybnil Yamashida, který tvrdí přesný opak, tedy že při videoasistované torakoskopii dochází většímu uvolnění nádorových buněk do cirkulace [160]. Podle Rafealyho pak nemá žádný vliv na konečný důsledek, co se týče přežívání a rekurence onemocnění u pacientů s karcinomem plic, zda byla prvotně ošetřena žíla

či tepna. Podvaz žíly před tepnou nepředstavuje podle něj výraznější riziko než podvaz tepny v první řadě [161]. Tato problematika si do budoucna zaslouží ještě hlubší analýzy, pochopitelně s využitím technik detekce cirkulujících nádorových buněk.

Pro chirurgické obory je MRD dalším možným potenciálním měřítkem k určení, která operační metoda či technika je pro pacienta výhodnější. Konečně se už nebude operační výkon hodnotit, jen podle velikosti jizvy, a tedy kosmetického efektu, který bývá často některými kolegy chirurgy upřednostňován. Množství cirkulujících nádorových buněk, které mohou zhoršovat prognózu nemocného, představuje tak rovněž významný parametr, přičemž je tento ukazatel dostupný poměrně rychle, na rozdíl od pouhé analýzy přežívání či disease free intervalu. Bude tedy přeci jen možné dosáhnout ještě určitého vylepšení chirurgické terapie plicního karcinomu, jakkoliv obecně bývá postulováno, že zlepšení osudu nemocných s plicním karcinomem již na poli vylepšování chirurgické techniky a taktiky nelze dosáhnout.

Význam zhodnocení minimální reziduální choroby je tedy zásadní. Je třeba ovšem provést ještě co nejvíce dalších studií, které srovnají jednotlivá získaná data s těmi klinickými. Až poté bude možné zhodnotit skutečnou validitu detekce minimální reziduální choroby jakožto prognostického faktoru u plicní rakoviny.

## 6. Závěr

Tak jako u jiných malignit, kde studie z poslední doby prokazují význam detekce MRD pro stanovení progresu onemocnění a pro určení jeho prognózy, tak i u plicního karcinomu se prokazuje význam detekce minimální reziduální choroby pomocí specifických onkomarkerů. V rámci analýzy detekce MRD u plicního karcinomu pomocí RT-PCR nebyly v této práci zjištěny signifikantní rozdíly ve výsledcích při odběrech z různých kompartmentů. Nejvhodnější je stanovení MRD z periferní krve, a to hlavně z důvodu snadného odběru. Z testované palety markerů EGFR, LunX, CEA a c-Met nebyla prokázána korelace detekce LunX ani EGFR s klinickým stádiem. Jako přínosné se jeví CEA a c-Met. U c-Met narůstá jeho hladina s přibývajícím TNM stádiem. U nemocných bez prokázaného postižení uzlin byla rovněž zjištěna nízká hladina c-Met, přičemž s postižením uzlin jeho exprese roste. CEA byl jediným testovaným markerem, jehož hladina korelovala s přežíváním nemocných a jejich DFI.

Tyto výsledky jsou částečně odlišné od několika dosud publikovaných prací. Jdou tedy nezbytné další práce, které ještě zpřesní poznatky o klinickém významu jednotlivých markerů pro stanovení prognózy nemocných a individualizaci terapie. Při potvrzení volby vhodných markerů u plicního karcinomu bude možné rovněž provést studie, analyzující některé aspekty chirurgické techniky a taktiky ve vztahu k ovlivnění rizika perioperační diseminace, a tím ještě dosáhnout přeci jen určitého vylepšení chirurgické terapie plicního karcinomu.

## 7. Souhrn

### Úvod:

Minimální reziduální chorobou (minimal systematic or residual disease, MSD, MRD) nazýváme buňky volně cirkulující či obsažené v krvi, kostní dřeni a mízních uzlinách či jiných tělních tekutinách při splnění základní podmínky radikálního odstranění primárního nádoru a nepřítomnosti klinických známek nádorového onemocnění. Tyto nádorové buňky, které jsou tedy subklinickými zbytky nádorů, nejsme schopni běžně dostupnými vyšetřovacími metodami detekovat. Cirkulující nádorové buňky jsou zodpovědny za recidivu nádorového onemocnění a jsou považovány za hlavního činitele vzniku metastáz po odstranění primárního nádoru u solidních tumorů. Význam její detekce spočívá v možnosti zpřesnění klinického stagingu onemocnění a vyselektování skupiny nemocných s horší prognózou, u kterých by se měla i přes nízké TNM stádium podat adjuvantní onkologická léčba.

### Materiál a metoda:

Náš soubor zahrnoval 137 pacientů s karcinomem plic, ve stádiu I až IIIA TNM klasifikace, u nichž byla provedena radikální resekce. Metodou real-time PCR za pomoci exprese specifických onkomarkerů EGFR, CEA, LunX a c-Met byly vyšetřeny vzorky z předoperačního odběru periferní krve, kostní dřene a žilní krve a po operaci s odstupem nejméně 2 týdnů vzorky periferní krve a kostní dřene. Výsledky byly porovnány s klinicko-patologickými znaky a přežitím pacientů.

### Výsledky:

U nemocných s přítomností minimální reziduální choroby stanovené pomocí exprese mRNA CEA je signifikantně kratší DFI ( $p < 0,083$ ; HR=1,84 [95 % CI: 0,91–3,71]) a kratší OS interval a vyšší hazard ratio ( $p < 0,033$ ; HR=2,19 [95 % CI: 1,05–4,58]) ve srovnání s pacienty bez přítomnosti minimální reziduální choroby. Dalším statisticky významným zjištěním je rozdílná expimace CEA u pacientů s odlišným gradingem ve II. vzorku ze systémové krve ( $p$ -value=0,0075).

U EGFR nenacházíme žádný znak ve statisticky významné korelaci k žádnému klinickému faktoru. LunX byl na hladině statistické významnosti 5 % ( $p$ -value=0,0453) zvýšeně exprimován u pacientů, u kterých byla provedena radikální resekce R0 oproti skupině pacientů, u kterých byla provedena pouze R1. Určitou roli zde však může hrát fakt, že v souboru s R1 byli pouze 3 pacienti. Slibné výsledky má pak dále onkomarker c-Met. Na stanovené hladině významnosti 5 % ( $p$ -value=0,0399) jeho hladina exprese narůstá s přibývajícím TNM stádiem ze vzorku plicní žilní krve, obdobné výsledky pozorujeme i při hodnocení vzorku z II. odběru systémové krve ( $p$ -value=0,0272). Rozporuplné výsledky na stanovené hladině statistické významnosti ukazují, že u pacientů s nižším gradingem je vyšší exprese c-Met ( $p$ -value=0,0238), a že s přibývajícím gradingem exprese c-met klesá. Naopak, při negativním postižení uzlin je, ve shodě s hypotézou



těž, nízká hladina c-Met, která s pozitivitou uzlin roste. Významným zjištěním je důkaz, že hladina c-Met koreluje s postižením uzlin, tedy s N stádiem. V plicní žilní krvi dosahuje statisticky významné hladiny 5 % (p-value=0,0037), v systémové krvi je bohužel statistická významnost 10 % (p-value=0,0755). V obou vyšetřovaných kompartmentech vzrůstá exprese c-Met s pozitivitou uzlin.

**Závěr:**

Z námi představené práce vyplývá, že diagnostika minimální reziduální choroby a její prognostický význam je jedinou možností, jak lze toho času zlepšit léčbu karcinomu plic, jelikož chirurgické možnosti zlepšení výsledků léčby jsou již téměř vyčerpány. Při potvrzení MRD pomocí exprese mRNA CEA mají pacienti v námi prezentované práci kratší dobu přežívání. Minimální reziduální chorobu v našem souboru hodnotíme jako negativní prognostický ukazatel. Bohužel nebyl prokázán klinický přínos LunX a EGFR. Zato onkomarkerem přínosným k monitoraci pokročilosti onemocnění je c-Met. Jeho hladina narůstá s přibývajícím stádiem a pozitivitou uzlin. I přesto, že výsledky ukazují jednoznačný význam detekce MRD, je potřeba porovnat tyto výsledky s dalším početnějším souborem nemocných s karcinomem plic.

## 8. Summary

### Introduction:

As the minimal residual disease is called the situation, when cells are freely circulating or contained in blood, bone marrow and lymph nodes or other body juices in the case of a radical removal of the primary tumor and in an absence of clinical signs of the malignant disease. These tumor cells are consequently subclinical tumor remnants and we are not able to detect them using common diagnostic methods. Circulating tumor cells are responsible for recurrence of a malignancy and are supposed to be the main factor responsible for arising of metastases after removal of the primary tumor in solid tumors. The significance of its detection is based on the opportunity to make the clinical staging of the disease more precise and to select a group of patients with a worse prognosis, in which adjuvant oncological therapy should be given.

### Material and methods:

Our group of patients included 137 patients with lung cancer in stages I–IIIA of TNM classification. Real-time PCR method using an expression of specific oncomarkers EGFR, CEA, LunX and c-Met was employed to examine the samples of pre-operative taken peripheral blood, bone marrow and venous blood and samples of peripheral blood and bone marrow taken at least 2 weeks after a resection. The results were compared with clinical-pathologic signs and survival of the patients.

### Results:

In the patients with detected minimal residual disease (MRD) by means of mRNA CEA expression is significantly shorter the disease free interval (DFI) ( $p < 0,083$ ; HR=1,84 [95 % CI: 0,91–3,71]) and the shorter overall survival and the higher hazard ratio ( $p < 0,033$ ; HR=2,19 [95 % CI: 1,05–4,58]) in comparison to the patients without detection of MRD. Another statistically significant important finding is the different expression of CEA in patients with the different grading in the second sample of the systemic blood ( $p$ -value=0,0075).

We found no statistically significant correlation to any clinical factor in EGFR. LunX was at the statistical significance level of 5 % ( $p$ -value=0,0453) increasingly expressed in patients after a radical R0 resection in comparison to patients after only R1 resection. Promising results can we find also in oncomarker c-Met. At the set significance level of 5 % ( $p$ -value=0,0399) its level grows with increasing TNM stage in samples of lung venous blood. Similar results can we find also in the second samples of systemic blood ( $p$ -value=0,0272). Controversial results at the set level of statistical significance showed, that in patients with lower grading is expression of c-Met higher ( $p$ -value=0,0238) and that it decreases with growing grading. On the contrary, with no involvement of lymph nodes can we find low level of c-Met, in correlation with a hypothesis, and it grows with positivity of lymph nodes. In lung venous blood

it reached statistically significant level of 5 % ( $p$ -value=0,0037), in systemic blood was unfortunately statistical significance of 10 % ( $p$ -value=0,0755).

**Conclusion:**

Our presented paper shows, that the diagnostics of the minimal residual disease and its prognostic importance is the only chance how to improve nowadays therapy of lung cancer, when surgical chances to improve results of therapy of lung cancer are near to be exhausted. In validation of MRD by means of mRNA CEA expression was in our study related to the shorter survival time. MRD can be concluded as negative prognostic marker. Unfortunately, no clinical significance of LunX or EGFR was proved. On the contrary, the beneficial oncomarker to monitor progression of the disease is c-Met. Its level grows with increasing stage and lymph node positivity. Despite of definite importance of detection of MRD according to our results, it is necessary to compare these results with another larger group of patients with lung cancer.

## 9. Seznam použitých zkratek

AJCC: Americký výbor proti rakovině (American Joint Committee on Cancer)

CCR: klinická kompletní remise

CEA: karcinomembryonální antigen

CK-19: cytokeratin

CT: počítačová tomografie (computer tomography)

CTCs: cirkulující nádorové buňky (circulating tumour cells)

cTNM: předoperační TNM klasifikace (tumor, uzliny, vzdálené metastázy)

CYFRA-21: solubilní fragment cytokeratinu 19

DFI: disease free interval

DNA: deoxyribonukleová kyselina

EBUS: endobronchiální sonografie

EDTA: kyselina ethylendiamintetraoctová

EGFR: receptor epidermálního růstového faktoru

ESTS: Evropská společnost hrudních chirurgů (European Society of Thoracic Surgeons)

E2F: skupina genů kódujících rodinu transkripčních faktorů

FasL: Fas ligand

FGF: fibroblastový růstový faktor

GTP: guanosintrifosfát

HER: receptorová skupina

HnRNP: heterogenous nuclear ribonucleoprotein

HRCT: high-resolution CT

IASLC: Mezinárodní asociací pro studium plicní rakoviny

KRAS2 , K-ras: Kristen rat sarcoma 2 viral oncogen

MCR: molekulární kompletní remise

MRD: minimální reziduální choroba

MRI: magnetická rezonance

mRNA: typ ribonukleové kyseliny

NSCLC: nemalobuněčný karcinom (non small cell lung cancer)

NSE: neuron specifická enoláza

OS: Overall survival

PCR: polymerázová řetězová reakce

PET-CT: diagnostická zobrazovací metoda spojující vyšetření počítačovou tomografií (CT) a pozitron emisní tomografií (PET)

pTNM: patologická VALG Veterans Administration Lung Cancer study Group

ProGRP: pro-gastrin-releasing peptide

Rb gen: retinoblastomový gen

RT-PCR: real time polymerázová řetězová reakce

R0 resekce: radikální resekce bez mikroskopické přítomnosti nádoru

R1 resekce: mikroskopicky pozitivní resekční okraj

SCLC: malobuněčný karcinom (small cell lung cancer)

TPA: tkáňový polypeptidový specifický antigen

UICC: Mezinárodní unií proti rakovině

VATS: videoasistovaná thorakoskopie

VEGFR: receptor vaskulárního endoteliálního růstového faktoru

WHO: světová zdravotnická organizace

18-FDG: 18-fluorodeoxyglukóza

18-FLT: 18-fluorothymidin

## 10. Seznam použité literatury

1. Kolek V, Kašák, V, Vašáková M et kol. Pneumologie. Praha: Maxdorf; 2011, s. 287.
2. Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR, Národní zdravotnický informační systém (NZIS), Národní onkologický registr (NOR), [20. 12. 2007], dostupné z [http://www.uzis.cz/info.php?article=368&mnu\\_id=7300](http://www.uzis.cz/info.php?article=368&mnu_id=7300).
3. Lee JJ, Lin RL, Chen CH, Chen RC. Clinical manifestations of bronchogenic carcinoma. J Formos Med Assoc. 1992 Feb;91(2):146-51.
4. Moyer VA; U.S. Preventive Services Task Force. Screening for lung cancer: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. Ann Intern Med. 2014 Mar 4;160(5):330-8.
5. Kerlikowske K, Carney PA, Geller B, Mandelson MT, Taplin SH, Malvin K, Ernster V, et al. Performance of screening mammography among women with and without a first-degree relative with breast cancer. Ann Intern Med. 2000 Dec 5;133(11):855-63.
6. Skříčková J, Kolek V. Základy moderní pneumoonkologie. Praha: Maxdorf; 2012, s. 40-41.
7. Slebos RJ, Kibbelaar RE, Dalesio O, Kooistra A, Stam J, Meijer CJ, et al. K-ras oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung. N Engl J Med. 1990 Aug 30;323(9):561-5.
8. Suzuki C, Takahashi K, Hayama S, Ishikawa N, Kato T, Ito T, et al. Identification of Myc-associated protein with JmjC domain as a novel therapeutic target oncogene for lung cancer. Mol Cancer Ther. 2007 Feb;6(2):542-51.
9. Wang H, Wang W, Wang X, Cai K, Wu H, Ju Q, et al. Reduced N-Myc downstream-regulated gene 2 expression is associated with CD24 upregulation and poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma. Med Oncol. 2012 Dec;29(5):3162-8.
10. Nau MM, Brooks BJ, Battey J, Sausville E, Gazdar AF, Kirsch IR, et al. L-myc, a new myc-related gene amplified and expressed in human small cell lung cancer. Nature. 1985 Nov 7-13;318(6041):69-73.
11. Rudin CM, Poirier JT. MYC, MAX, and small cell lung cancer. Cancer Discov. 2014 Mar;4(3):273-4.
12. Detterbeck FC, Jantz MA, Wallace M, Vansteenkiste J, Silvestri GA; American College of Chest Physicians. Invasive mediastinal staging of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). Chest. 2007 Sep;132(3 Suppl):202S-220S.
13. Toloza EM, Harpole L, McCrory DC. Noninvasive staging of non-small cell lung cancer: a review of the current evidence. Chest. 2003 Jan;123(1 Suppl):137S-146S.
14. Higashi K, Ueda Y, Seki H, Yuasa K, Oguchi M, Noguchi T, et al. Fluorine-18-FDG PET paging is negative in bronchioloalveolar lung carcinoma. J Nucl Med. 1998 Jun;39(6):1016-20.
15. Wahidi MM, Govert JA, Goudar RK, Gould MK, McCrory DC; American College of Chest Physicians. Evidence for the treatment of patients with pulmonary nodules: when is it lung cancer?: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). Chest. 2007 Sep;132(3 Suppl):94S-107S.
16. Everitt SJ, Ball DL, Hicks RJ, et al. Differential 18F-FDG and 18F-FLT Uptake on Serial PET/CT Imaging Before and During Definitive Chemoradiation for Non-Small Cell Lung Cancer. J Nucl Med. 2014 May 15;55(7):1069-1074.
17. Skříčková J, Kolek V. Základy moderní pneumoonkologie. Praha: Maxdorf; 2012, s. 71.

18. Zaric B, Perin B. Use of narrow-band imaging bronchoscopy in detection of lung cancer. *Expert Rev Med Devices*. 2010 May;7(3):395-406.
19. Zaric B, Stojic V, Sarcev T, Stojanovic G, Carapic V, Perin B, et al. Advanced bronchoscopic techniques in diagnosis and staging of lung cancer. *J Thorac Dis*. 2013; 5(Suppl 4): S359–S370.
20. Kokkonouzis I, Strimpakos AS, Lampaditis I, Tsimpoukis S, Syrigos KN. The role of endobronchial ultrasound in lung cancer diagnosis and staging: a comprehensive review. *Clin Lung Cancer*. 2012 Nov;13(6):408-15.
21. Yasufuku K, Pierre A, Darling G, de Perrot M, Waddell T, Johnston M, et al. A prospective controlled trial of endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration compared with mediastinoscopy for mediastinal lymph node staging of lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2011 Dec;142(6):1393-400.
22. Komagata H, Yoneda S. Lung cancer. *Gan to Kagaku Ryoho*. 2004 Oct;31(10):1609-13.
23. Tanoue LT, Detterbeck FC. New TNM classification for non-small-cell lung cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2009 Apr;9(4):413-23.
24. Detterbeck FC, Boffa DJ, Tanoue LT. The new lung cancer staging system. *Chest*. 2009 Jul;136(1):260-71.
25. Goldstraw P. The 7th Edition of TNM in Lung Cancer: what now? *J Thorac Oncol*. 2009 Jun;4(6):671-3.
26. Giroux DJ, Rami-Porta R, Chansky K, Crowley JJ, Groome PA, Postmus PE, et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: data elements for the prospective project. *J Thorac Oncol*. 2009;4:679-83.
27. Goldstraw P. Editorial comment: Revisions to the 7th edition of TNM for lung cancer: data are good but prospective data are better! *Eur J Cardiothorac Surg*. 2012 Nov;42(5):811-2.
28. Vallières E, Shepherd FA, Crowley J, Van Houtte P, Postmus PE, Carney D, et al; International Association for the Study of Lung Cancer International Staging Committee and Participating Institutions. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals regarding the relevance of TNM in the pathologic staging of small cell lung cancer in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2009 Sep;4(9):1049-59.
29. Dušek I, Májek O, Mužík J, Koptíková J, Pavlík T, Skříčková J: Epidemiologie zhoubných nádorů plic, průdušnice a průdušek v ČR. In: Skříčková J, Kolek V et al.: *Základy moderní pneumoonkologie*. Maxdorf, 2012, s. 24.
30. Skříčková J, Tomíšková M, Kadlec B, Jakubíková L, Špaldová J. Novinky v léčbě karcinomu plic. *Acta Medicinæ*. 2013; roč. 2013, č. 2, s. 49–53.
31. Depierre A, Milleron B, Moro-Sibilot D, Chevret S, Quoix E, Lebeau B, et al. Preoperative chemotherapy followed by Surgery compared with primary surgery in resectable stage I (except T1N0), II, and IIIa non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2002 Jan 1;20(1):247–53.
32. Klein J. *Chirurgie karcinomu plic*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing a.s.; 2006: s. 440–45.
33. Bohanes T, Szkorupa M. Historie hrudní chirurgie: od nejstarších dob do konce 19. století. *Rozhl Chir*. 2013;92(3):125-9.
34. Brandt HJ. The history and development of thoracoscopy. *Pneumologie*. 1989 Feb;43(2):46–7.
35. Roviario G, Rebuffat C, Varoli F, et al. Videoendoscopic pulmonary lobectomy for cancer. *Surg Laparosc Endosc* 1992;2:244-7.

36. Hansen HJ, Petersen RH. Video-assisted thoracoscopic lobectomy using a standardized three-port anterior approach – The Copenhagen experience. *Ann Cardiothorac Surg.* 2012 May;1(1):70-6.
37. Allen MS, Darling GE, Pechet TT, Mitchell JD, Herndon JE 2nd, Landreneau RJ, et al. Morbidity and mortality of major pulmonary resections in patients with early-stage lung cancer: initial results of the randomized, prospective ACOSOG Z0030 trial. *Ann Thorac Surg.* 2006 Mar;81(3):1013-9.
38. Begum S, Hansen HJ, Papagiannopoulos K. VATS anatomic lung resections-the European experience. *J Thorac Dis.* 2014 May;6 Suppl 2:S203-10.
39. Watanabe S, Asamura H, Suzuki K, Tsuchiya R. Recent results of postoperative mortality for surgical resections in lung cancer. *Ann Thorac Surg.* 2004 Sep;78(3):999-1002.
40. Cahan WG, Watson WL, Pool JL. Radical pneumonectomy. *J Thorac Surg.* 1951 Nov;22(5):449-73.
41. Naruke T, Suemasu K, Ishikawa S. Lymph node mapping and curability at various levels of metastasis in resected lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1978 Dec;76(6):832-9.
42. Mountain CF, Dresler CM. Regional lymph node classification for lung cancer staging. *Chest.* 1997 Jun;111(6):1718-23.
43. Rusch VW, Asamura H, Watanabe H, Giroux DJ, Rami-Porta R, Goldstraw P; Members of IASLC Staging Committee. The IASLC lung cancer staging project: a proposal for a new international lymph node map in the forthcoming seventh edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2009 May;4(5):568-77.
44. Rusch VW, Crowley J, Giroux DJ, Goldstraw P, Im JG, Tsuboi M, et al; International Staging Committee; Cancer Research and Biostatistics; Observers to the Committee; Participating Institutions. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the N descriptors in the forthcoming seventh edition of the TNM classification for lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2007 Jul;2(7):603-12.
45. Bohanes T, Klein J, Král V, Neoral C, Tichý T. Detekce sentinelové uzliny u plicního karcinomu pomocí patentní modři a její klinický význam. *Rozhl Chir.* 2004;83(6):210-6.
46. Tiffet O, Nicholson AG, Khaddage A, Prévot N, Ladas G, Dubois F, et al. Feasibility of the detection of the sentinel lymph node in peripheral non-small cell lung cancer with radio isotopic and blue dye techniques. *Chest.* 2005 Feb;127(2):443-8.
47. Asamura H, Nakayama H, Kondo H, Tsuchiya R, Naruke T. Lobe-specific extent of systematic lymph node dissection for non-small cell lung carcinomas according to a retrospective study of metastasis and prognosis. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1999 Jun;117(6):1102-11.
48. Zhong W, Yang X, Bai J, Yang J, Manegold C, Wu Y. Complete mediastinal lymphadenectomy: the core component of the multidisciplinary therapy in resectable non-small cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2008 Jul;34(1):187-95.
49. Darling GE, Allen MS, Decker PA, Ballman K, Malthaner RA, Inculet RI, et al. Randomized trial of mediastinal lymph node sampling versus complete lymphadenectomy during pulmonary resection in the patient with N0 or N1 (less than hilar) non-small cell carcinoma: results of the American College of Surgery Oncology Group Z0030 Trial. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2011 Mar;141(3):662-70.
50. Klein J, Král V, Neoral C, Bohanes T, Szkorupa M, Tichý T, et al. Rozsah lymfadenektomie při resekci plic pro karcinom. *Rozhl Chir.* 2004;83(11):539-44.
51. Stoelben E, Digel W, Henke M, Passlick B. Multimodal treatment of non small cell lung cancer. *Zentralbl Chir.* 2006 Apr;131(2):110-4.



52. Izbicki JR, Passlick B, Pantel K, Pichlmeier U, Hosch SB, Karg O, et al. Effectiveness of radical systematic mediastinal lymphadenectomy in patients with resectable non-small cell lung cancer: results of a prospective randomized trial. *Ann Surg.* 1998 Jan;227(1):138-44.
53. Skříčková J, Kolek V. *Základy moderní pneumoonkologie.* Praha: Maxdorf; 2012, s. 216.
54. Watanabe S, Asamura H, Suzuki K, Tsuchiya R. Recent results of postoperative mortality for surgical resections in lung cancer. *Ann Thorac Surg.* 2004 Sep;78(3):999-1002.
55. Ferguson MK, Vigneswaran WT. Changes in patient presentation and outcomes for major lung resection over three decades. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2008 Mar;33(3):497-501.
56. Stolz A, Simonek J, Harustiak T, Schutzner J, Pafko P, Lischke R. Časové trendy chirurgické terapie bronchogenního karcinomu. *Rozhl. Chir.* 2011;90(4): 216-221.
57. Klein J. *Chirurgie karcinomu plic.* Praha: Grada publishing, a.s.; 2006, s. 123.
58. Boffa DJ, Allen MS, Grab JD, Gaissert HA, Harpole DH, Wright CD. Data from The Society of Thoracic Surgeons General Thoracic Surgery database: the surgical management of primary lung tumors. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2008 Feb;135(2):247-54.
59. Solaini L, Prusciano F, Bagioni P, di Francesco F, Solaini L, Poddie DB. Video-assisted thoracic surgery (VATS) of the lung: analysis of intraoperative and postoperative complications over 15 years and review of the literature. *Surg Endosc.* 2008 Feb;22(2):298-310.
60. Marty-Ané CH, Canaud L, Solovei L, Alric P, Berthet JP. Video-assisted thoracoscopic lobectomy: an unavoidable trend? A retrospective single-institution series of 410 cases. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2013 Jul;17(1):36-43.
61. McKenna RJ Jr, Houck W, Fuller CB. Video-assisted thoracic surgery lobectomy: experience with 1,100 cases. *Ann Thorac Surg.* 2006 Feb;81(2):421-5.
62. Wolf AS, Richards WG, Jaklitsch MT, Gill R, Chirieac LR, Colson YL. Lobectomy versus sublobar resection for small (2 cm or less) non-small cell lung cancers. *Ann Thorac Surg.* 2011 Nov;92(5):1819-23.
63. El-Sherif A, Gooding WE, Santos R, Pettiford B, Ferson PF, Fernando HC, et al. Outcomes of sublobar resection versus lobectomy for stage I non-small cell lung cancer: a 13-year analysis. *Ann Thorac Surg.* 2006Aug;82(2):408-15.
64. Bilfinger TV, Baram D. Sublobar resection in nonsmall cell lung carcinoma. *Curr Opin Pulm Med.* 2008 Jul;14(4):292-6.
65. Fan J, Wang L, Jiang GN, Gao W. Sublobectomy versus lobectomy for stage I non-small-cell lung cancer, a meta-analysis of published studies. *Ann Surg Oncol.* 2012 Feb;19(2):661-8.
66. Liu Y, Huang C, Liu H, Chen Y, Li S. Sublobectomy versus lobectomy for stage IA (T1a) non-small-cell lung cancer: a meta-analysis study. *World J Surg Oncol.* 2014 May 1;12:138.
67. Bueno R, Hughes E, Wagner S, Gutin AS, Lanchbury JS, Zheng Y, et al. Validation of a Molecular and Pathological Model for Five-Year Mortality Risk in Patients with Early Stage Lung Adenocarcinoma. *J Thorac Oncol.* 2014 Nov 13. [Epub ahead of print].
68. Pignon JP, Tribodet H, Scagliotti GV, Douillard JY, Shepherd FA, Stephens RJ, et al. Lung adjuvantcisplatin evaluation: a pooled analysis by the LACE Collaborative Group. *J Clin Oncol.* 2008 Jul 20;26(21):3552-9.
69. Skříčková J, Kolek V. *Základy moderní pneumoonkologie.* Praha: Maxdorf; 2012, s. 231-232.
70. Guerrera F, Errico L, Evangelista A, Filosso PL, Ruffini E, Lisi E, et al. Exploring Stage I non-small-cell lung cancer: development of a prognostic model predicting 5-year survival after surgical resection. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2014 Nov 12. [Epub ahead of print].
71. Klein J. *Chirurgie karcinomu plic.* Praha: Grada publishing, a.s.; 2006, s. 45 -47.

72. Ma Q, Liu D, Guo Y, Shi B, Song Z, Tian Y. Surgical therapeutic strategy for non-small cell lung cancer with mediastinal lymph node metastasis (N2). *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*. 2010 Apr;13(4):342-8.
73. Furuse K, Fukuoka M, Kawahara M, Nishikawa H, Takada Y, Kudoh S, et al. Phase III study of concurrent versus sequential thoracic radiotherapy in combination with mitomycin, vindesine, and cisplatin in unresectable stage III non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 1999 Sep;17(9):2692-9.
74. Kara M, Sak SD, Orhan D, Yavuzer S. Changing patterns of lung cancer; (3/4 in.) 1.9 cm; still a safe length for bronchial resection margin? *Lung Cancer*. 2000 Dec;30(3):161-8.
75. Burdett S, Stewart LA, Rydzewska L. A systematic review and meta-analysis of the literature: chemotherapy and surgery versus surgery alone in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2006 Sep;1(7):611-21.
76. Socinski MA. Adjuvant therapy of resected non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer*. 2004 Nov;6(3):162-9.
77. Sawyer TE, Bonner JA. Postoperative irradiation in non-small cell lung cancer. *Semin Radiat Oncol*. 2000 Oct;10(4):280-8.
78. Berghmans T, Paesmans M, Meert AP, Mascaux C, Lothaire P, Lafitte JJ, et al. Survival improvement in resectable non-small cell lung cancer with (neo)adjuvant chemotherapy: results of a meta-analysis of the literature. *Lung Cancer*. 2005 Jul;49(1):13-23.
79. De Craene S, Surmont V, van Meerbeeck JP. Adjuvant or neoadjuvant chemotherapy in minimal N2 stage IIIA nonsmall cell lung cancer. *Curr Opin Oncol*. 2010 Mar;22(2):102-11.
80. Wei W, Wang S, Lin P, Li X, Wen Z, Rong T. Survival analysis of completely resected stage IIIB non-small cell lung cancer. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*. 2007 Apr;10(2):107-10.
81. Klein J, Kral V, Nemeč P, Bohanes T. Temporary aorto-aortal bypass used during extended pneumonectomy for lung cancer. *Acta Chir Belg*. 2007 Jan-Feb;107(1):81-3.
82. Grunenwald DH, Albain KS. The potential role of surgery after induction treatment. *Semin Radiat Oncol*. 2004 Oct;14(4):335-9.
83. Grunenwald DH. Surgery for locally advanced non-small cell lung cancer. *Semin Surg Oncol*. 2003;21(2):85-90.
84. Windisch T, Fischer JR, Vega A, Decker S, Held M, Graeter TP. Infiltration of the superior vena cava in NSCLC: Results of Surgical Intervention. *Pneumologie*. 2014 Nov 6. [Epub ahead of print].
85. Rendina EA, Venuta F, De Giacomo T, Ciccone AM, Ruvolo G, Coloni GF, et al. Induction chemotherapy for T4 centrally located non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1999 Feb;117(2):225-33.
86. Sculier JP, Moro-Sibilot D. First- and second-line therapy for advanced nonsmall cell lung cancer. *Eur Respir J*. 2009 Apr;33(4):915-30.
87. Bonomi P. Clinical studies with non-irresistible EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Lung Cancer*. 2003 Aug;41 Suppl 1:S43-8.
88. Ciardiello F, De Vita F, Orditura M, Tortora G. The role of EGFR inhibitors in nonsmall cell lung cancer. *Curr Opin Oncol*. 2004 Mar;16(2):130-5.
89. Skříčková J, Kadlec B, Venclíček O, Tomíšková M. Možnosti biologické léčby u nemalobuněčného karcinomu plic v České republice. *Acta Med Alerg Pneum*. 2014;6:13-16.

90. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med.* 2004 May 20;350(21):2129-39.
91. Mu XL, Li LY, Zhang XT, Wang MZ, Feng RE, Cui QC, et al. Gefitinib-sensitive mutations of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase domain in chinese patients with non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2005 Jun 15;11(12):4289-94.
92. Gridelli C, Peters S, Sgambato A, Casaluce F, Adjei AA, Ciardiello F. ALK inhibitors in the treatment of advanced NSCLC. *Cancer Treat Rev.* 2014 Mar;40(2):300-6.
93. Yang JC, Hirsh V, Schuler M, Yamamoto N, O'Byrne KJ, Mok TS, et al. Symptom control and quality of life in LUX-Lung 3: a phase III study of afatinib or cisplatin/pemetrexed in patients with advanced lung adenocarcinoma with EGFR mutations. *J Clin Oncol.* 2013 Sep 20;31(27):3342-50.
94. Sequist LV, Yang JC, Yamamoto N, O'Byrne K, Hirsh V, Mok T, et al. Phase III study of afatinib or cisplatin plus pemetrexed in patients with metastatic lung adenocarcinoma with EGFR mutations. *J Clin Oncol.* 2013 Sep 20;31(27):3327-34.
95. Haaland B, Tan PS, de Castro G Jr, Lopes G. Meta-analysis of first-line therapies in advanced non-small-cell lung cancer harboring EGFR-activating mutations. *J Thorac Oncol.* 2014 Jun;9(6):805-11.
96. Reck M, von Pawel J, Zatloukal P, Ramlau R, Gorbounova V, Hirsh V, et al. Overall survival with cisplatin-gemcitabine and bevacizumab or placebo as first-line therapy for nonsquamous non-small-cell lung cancer: results from a randomised phase III trial (AVAiL). *Ann Oncol.* 2010 Sep;21(9):1804-9.
97. Leighl NB, Zatloukal P, Mezger J, Ramlau R, Moore N, Reck M, et al. Efficacy and safety of bevacizumab-based therapy in elderly patients with advanced or recurrent nonsquamous non-small cell lung cancer in the phase III B017704 study (AVAiL). *J Thorac Oncol.* 2010 Dec;5(12):1970-6.
98. Camidge DR, Skokan M, Kiatsimkul P, Helfrich B, Lu X, Barón AE, et al. Native and rearranged ALK copy number and rearranged cell count in non-small cell lung cancer: implications for ALK inhibitor therapy. *Cancer.* 2013 Nov 15;119(22):3968-75.
99. Skříčková J, Kolek V. *Základy moderní pneumoonkologie.* Praha: Maxdorf; 2012, s. 56.
100. Watson WL, Berg JW. Oat cell lung cancer. *Cancer.* Jul-Aug 1962;15:759-768.
101. Niho S, Kubota K, Yoh K, Goto K, Ohmatsu H, Nihei K, et al. Clinical outcome of chemoradiation therapy in patients with limited-disease small cell lung cancer with ipsilateral pleural effusion. *J Thorac Oncol.* 2008 Jul;3(7):723-7.
102. Shepherd FA, Evans WK, Feld R, Young V, Patterson GA, Ginsberg R, et al. Adjuvant chemotherapy following surgical resection for small-cell carcinoma of the lung. *J Clin Oncol.* 1988 May;6(5):832-8.
103. Weksler B, Nason KS, Shende M, Landreneau RJ, Pennathur A. Surgical resection should be considered for stage I and II small cell carcinoma of the lung. *Ann Thorac Surg.* 2012 Sep;94(3):889-93.
104. Jones CD, Cummings IG, Shipolini AR, McCormack DJ. Does surgery improve prognosis in patients with small-cell lung carcinoma? *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2013 Mar;16(3):375-80.
105. Lüchtenborg M, Riaz SP, Lim E, Page R, Baldwin DR, Jakobsen E, et al. Survival of patients with small cell lung cancer undergoing lung resection in England,1998-2009. *Thorax.* 2014 Mar;69(3):269-73.

106. Patel S, Macdonald OK, Suntharalingam M. Evaluation of the use of prophylactic cranial irradiation in small cell lung cancer. *Cancer*. 2009 Feb 15;115(4):842-50.
107. Murray N, Turrisi AT 3rd. A review of first-line treatment for small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2006 Mar;1(3):270-8.
108. Pijls-Johannesma M, De Ruyscher D, Vansteenkiste J, Kester A, Rutten I, Lambin P. Timing of chest radiotherapy in patients with limited stage small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Cancer Treat Rev*. 2007 Aug;33(5):461-73.
109. Minimal Residual Disease. Co je MRD? [cit. 10. 1. 2015], Dostupné z <http://www.minimalresidualdisease.com/what-is-mrd>.
110. Černý J, Trněný M, Klener P. Význam minimální reziduální nemoci a metody jejího stanovení u pacientů s některými hematologickými malignitami. *Klinická onkologie*. 2003;16(2): 41-48.
111. Ignatiadis M, Reinholz M. Minimal residual disease and circulating tumor cells in breast cancer. *Breast Cancer Research*. 2011; 13(5): 222.
112. Mocellin S. Circulating tumor cells: the leukemic phase of solid cancers. *Trends in Mol Med*. 2006;12:130-139.
113. Rosenberg R, Nekarda H, Thorban S. Minimal residual disease in gastrointestinal tumors: tumor cell detection in bone marrow, blood and lymph nodes. *Acta Med Austriaca*. 2002;29:42-53.
114. Pantel K, Von Knebel Doeberitz M. Detection and clinical relevance of micrometastatic cancer cells. *Curr Opin Oncol*. 2000;12:95-101.
115. Weaver DL. Sentinel lymph node biopsy in breast cancer: creating controversy and defining new standards. *Adv Anat Pathol*. 2001;8:65-73
116. Fehm T, Sagalowsky A, Clifford E. Cytogenetic evidence that circulating epithelial cells in patients with carcinoma are malignant. *Clin Cancer Res*. 2002;8:2073-2084.
117. Hagenbeek, A. Minimal residual disease in leukemia: state of the art 1991. *Leukemia*. 1992;6:12-16.
118. Šmarda J. *Metody molekulární biologie*. 1. vydání. Brno: Masarykova Univerzita; 2005.
119. Snustad DP, Simmons MJ. *Genetika*. 1. vydání. Brno: Masarykova Univerzita; 2009.
120. Paterlini-Brechot P, Benali NL. Circulating tumor cells (CTS) detection : clinical impact and future directions. *Cancer letters*. 2007; 253(2): 180-204.
121. Mori M, Mimori K, Inoue H. Detection of cancer micrometastases in lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Cancer Res* 1995; 55:3417-3420.
122. Noguchi S, Aihara T, Motomura K, et al. Detection of breast cancer micrometastases in axillary lymph nodes by means of reverse transcriptase-polymerase chain reaction: comparison between MUC1 mRNA and keratin 19 mRNA amplification. *Am J Pathol*. 1996; 148:649-656.
123. Srovnal J. Minimální reziduální choroba u solidních nádorů. *Disertační práce*. UP Olomouc 2009.
124. Klos D. Minimální reziduální choroba u karcinomu pankreatu. *Disertační práce*. UP Olomouc 2012.
125. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology*. 2000; 251:69-193.

126. Pantel K. Detection of minimal disease in patients with solid tumors. *J Hematother.* 1996 Aug;5(4):359-67.
127. Bockmann B, Grill HJ, Giesing M. Molecular characterisation of minimal residual cancer cells in patients with solid tumors. *Biomol Eng.* 2001;17:95-111.
128. Palmieri G, Strazzullo M, Ascierto PA, Satriano SM, Daponte A, Castello G. Polymerase chain reaction-based detection of circulating melanoma cells as an effective marker of tumor progression. *Melanoma Cooperative Group. J Clin Oncol.* 1999;17:304-311.
129. Henke W, Jung M, Jung K. Increase analytical sensitivity of RT-PCR of PSA mRNA decreases diagnostic specificity of detection of prostatic cells in blood. *Int j Cancer.* 1997;70:52-56.
130. Aquino A, Formica V, Prete SP. Drug-induced increase of carcinoembryonic antigen expression in cancer cells. *Pharmacol Res.* 2004 May;49(5):383-96.
131. Sarobe P, Huarte E, Lasarte JJ, Borrás-Cuesta F. Carcinoembryonic antigen as a target to induce anti-tumor immune responses. *Curr Cancer Drug Targets.* 2004 Aug;4(5):443-54.
132. DeLuca A, Pignata S, Casamassini A. Detection of circulating tumor cells in carcinoma patients by a novel epidermal growth factor receptor reverse transcription-PCR assay. *Clin Cancer Res.* 2000;6:1439-1444.
133. Gebhart F, Bürger H, Brandt B. Modulation of EGFR gene transcription by a polymorphic repetitive sequence - a link between genetics and epigenetics. *Int J Biol Markers.* 2000 Jan-Mar;15(1):105-10.
134. Ignatiadis M, Kallergi G, Ntoulia M. Prognostic values of the molecular detection of circulating tumor cells using a multimarker reverse transcription-PCR assay for cytokeratin 19, mammaglobin A, and HER2 in early breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2008;9:2593-2600.
135. Vaiopoulos AG, Kostakis ID, Gkioka E, Athanasoula KCh, Pikoulis E, Papalambros A, et al. Detection of circulating tumor cells in colorectal and gastric cancer using a multiplex PCR assay. *Anticancer Res.* 2014 Jun;34(6):3083-92.
136. Iwao K, Watanabe T, Fujiwara Y. Isolation of a novel human lung-specific gene, LUNX, a potential molecular marker for detection of micrometastasis in non-small-cell lung cancer. *Int. J Cancer.* 2001;91:433-437.
137. Mitas M, Hoover L, Silveri G, Reed C, Green M, Turrisi A. LunX is a superior molecular marker for detection of non-small cell lung cancer in peripheral blood. *Journal of Molecular Diagnostics.* 2003;5: 237-242.
138. Cheng M, Chen Y, Yu X, Tian Z, Wei H. Diagnostic utility of LunX mRNA in peripheral blood and pleural fluid in patients with primary non-small cell lung cancer. *BMC Cancer.* 2008;8, 156-167.
139. Zhang X, Xie J, Yu C, Yan L, Yang Z. mRNA expression of CK19, EGFR and LunX in patients with lung cancer micrometastasis. *Experimental and Therapeutic Medicine.* 2014;7:360-364.
140. Tanaka F, Yoneda K, Kondo N, Hashimoto M, Takuwa T, Matsumoto S, et al. Circulating Tumor cell as a Diagnostic Marker in Primary Lung Cancer. *Clin Cancer.* 2009;15, 6980-6986.
141. Shingyoji M, Takiguchi Y, Watanabe R, Hiroshima K, Motoori K, Kurosaki K, et al. Detection of tumor specific gene expression in bone marrow and peripheral blood from patients with small cell lung carcinoma. *American Cancer Society.* 2003;4, 1057-1067.
142. Voort R, Taher TE, Derksen PW. The hepatocyte growth factor/Met pathway in development, tumorigenesis, and B-cell differentiation. *Adv Cancer Res.* 2000;79:39-90.
143. Blair DG, Cooper CS, Oskarsson MK, Eader LA, Vande Woude GF. New method for detection cellular transforming genes. *Science.* 1982;218:1122-1125.

144. Cheng TL, Chang MY, Huang SY. Over expression of circulating c-Met messenger RNA is significantly correlated with nodal stage and early recurrence in non-small cell lung cancer. *Chest*. 2005; 128, 1453-1460.
145. Sheu CC, Chang MY, Chang HC, Tsai JR, Chang SJ, Hwang JJ, et al. Combination detection of CEA, CK 19 a C-met mRNAs in peripheral blood: a highly sensitive panel for potential molecular diagnosis of non-small cell lung cancer. *Oncology*. 2006;70: 203-211.
146. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*. 1987;162(1): 156-159.
147. Kolář Z. Molekulární patologie nádorů. 1. vyd. Olomouc: EPAVA;2003, 168 s.
148. Chudacek J, Bohanes T, Klein J, Benedikova A, Srovnal J, Szkorupa M, et al. Detection of minimal residual disease in lung cancer. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2014 Jun;158(2):189-93.
149. Bi M, Wang Z. Advances on micrometastasis of non-small cell lung cancer. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*.2009;12:1041-1043.
150. Zhong C, Jiang G, Tao G. Expression and clinical significance of EGFR mRNA, SP-D mRNA, LUNX mRNA in peripheral blood of lung cancer patients. *Nantong University Journal of Medical Sciences*.2007;27:17-19.
151. Yang HX, Wu YL, Chen G, et al. Transcriptase polymerase chain reaction assay designed for the detection of Lunx-mRNA in peripheral blood to research the micrometastasis in non-small cell lung cancer. *Cancer Research On Prevention and Treatment*. 2004;31:464-466.
152. Benedíková A, Srovnal J, Szkorupa M, Skalický P, Chudáček J, Bohanes T, et al. Biomarkers in the detection of minimal systemic dissemination in lung cancer patients. *Rozhl Chir*. 2012 Apr;91(4):209-15.
153. Burgess T, Coxon A, Meyer S, Sun J, Rex K, Tsuruda T, et al. Fully human monoclonal antibodies to hepatocyte growth factor with therapeutic potential against hepatocyte growth factor/c-met-dependent human tumors. *Cancer Research*. 2006;66:1721-1729.
154. Liska D, Chen CT, Bachleitner-Hofmann T, Christensen JG, Weiser MR. HGF rescues colorectal cancer cells from EGFR inhibition via MET activation. *Clin Cancer Res*. 2011 Feb 1;17(3):472-82.
155. Graham RA, Wang S, Catalano PJ, Haller DG. Postsurgical surveillance of colon cancer: preliminary cost analysis of physician examination, carcinoembryonic antigen testing, chest x-ray, and colonoscopy. *Ann Surg*. 1998 Jul;228(1):59-63.
156. Zhou Q, Shi Y, Chen J, Liu B, Wang Y, Zhu D, et al. Long-term survival of personalized surgical treatment of locally advanced non-small cell lung cancer based on molecular staging. *Zhongguo Fei Ai Za Zhi*. 2011 Feb;14(2):86-106.
157. Turnbull RB, Jr, Kyle K, Watson FR, Watson FR, Spratt J. Cancer of the colon: the influence of the no-touch isolation technic on survival rates. *Ann Surg*. 1967;166:420-427.
158. Hayashi N, Egami H, Kai M, Kurusu Y, Takano S, Ogawa M. No-touch isolation technique reduces intraoperative shedding of tumor cells into the portal vein during resection of colorectal cancer. *Surgery*. 1999;125:369-374.
159. Song PP, Zhang W, Zhang B, Liu Q, DU J. Effects of different sequences of pulmonary artery and vein ligations during pulmonary lobectomy on blood micrometastasis of non-small cell lung cancer. *Oncol Lett*. 2013 Feb;5(2):463-468.
160. Yamashita JI, Kurusu Y, Fujino N, Saisyoji T, Ogawa M. Detection of circulating tumor cells in patients with non-small cell lung cancer undergoing lobectomy by video-assisted thoracic

- surgery: a potential hazard for intraoperative hematogenous tumor cell dissemination. J Thorac Cardiovasc Surg. 2000;119:899–905.
161. Refaely Y, Sadetzki S, Chetrit A, Simansky DA, Paley M, Modan B. The sequence of vessel interruption during lobectomy for non-small cell lung cancer: is it indeed important? J Thorac Cardiovasc Surg. 2003;125:1313–1320.

## 11. Seznam publikací a přednášek autora

### 11.1 Práce související s disertační prací

#### 1. Původní vědecké práce s IF faktorem

Bohanes T, Szkorupa M, Klein J, Neoral C, Zapletalova J, Chudacek J, Vomackova K, Vrba R. Videothoracoscopic identification of chondromatous hamartoma of the lung. Wideochir Inne Tech Malo Inwazyjne. 2013 Jun;8(2):152-7.

Chudacek J, Bohanes T, Klein J, Benedikova A, Srovnal J, Szkorupa M, Skalicky P, Skarda J, Hajduch M, Neoral C. Detection of minimal residual disease in lung cancer. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2014 Jun;158(2):189-93.

#### 2. Původní vědecké publikace in extenso uveřejněné v ostatních recenzovaných časopisech

Szkorupa M, Klein J, Bohanes T, Neoral C, Chudacek J. [Solitary fibrous tumor of pleural cavity]. Rozhl Chir. 2010 Dec;89(12):750-3.

Benedíková A, Srovnal J, Szkorupa M, Skalický P, Chudacek J, Bohanes T, Skarda J, Kolár Z, Hajdúch M, Klein J. [Biomarkers in the detection of minimal systemic dissemination in lung cancer patients]. Rozhl Chir. 2012 Apr;91(4):209-15.

Szkorupa M, Bohanes T, Neoral C, Chudacek J, Langova K. [Surgery of the pulmonary metastases]. Klin Onkol. 2013;26(1):35-41.

Chudacek J, Bohanes T, Szkorupa M., Zalesak B, Neoral C, [ Strategies of the chest wall tumors and our experiences ]. Rozhl Chir. 1/ 2015 přijata do tisku

### 11.2 Ostatní práce

#### 1. Původní vědecké práce s IF faktorem

Neoral C, Horakova M, Aujesky R, Chudacek J, Hanulik V, Chroma M, Kolar M. Infectious complications after esophagectomy. Surg Infect (Larchmt). 2012 Jun;13(3):159-62.

Neoral C, Aujesky R, Skarda J, Vrba R, Chudacek J, Bohanes T, Vomackova K. Thoracoscopic treatment of benign esophageal tumors. Wideochir Inne Tech Malo Inwazyjne. 2012 Dec;7(4):294-8.

Szkorupa M, Bohanes T, Chudacek J, Ctvrtlik F. Anomalous venous drainage of the lung to the brachiocephalic vein. Eur J Cardiothorac Surg. 2013 Oct;44(4):768.

#### 2. původní vědecké publikace in extenso uveřejněné v ostatních recenzovaných časopisech

Lubuska L, Bachleda P, Tichy T, Lubusky M, Utikal P, Hrabalova M, Chudacek J, Janout V. Assessment of renal graft function depending on pre-transplant morphology. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2006 Jul;150(1):171-7.



Klos D, Halama J, Chudacek J, Neoral C. Burkitt's lymphoma of the caecum as a rare cause of acute abdomen: a case report. Rozhl Chir. 2012 Feb;91(2):90-2.

Stašek M, Stašková M, Malý T, Kysučan J, Vomáčková K, Chudáček J. Průjem a náhlá příhoda břišní u dětského pacienta. Pediatr. Praxi 2011; 12(3): 163-166.

### **11.3 Přednášky**

#### **1. Chirurgická problematika chronického traumatického hemotoraxu**

Autoři: Chudáček J, Bohanes T., Szkorupa M., Klein J., Neoral Č.

XVI. Pražské chirurgické dny 14. - 15. května 2009

#### **2. Náhodný nález při laparoskopii pro kontuzi břicha**

Autoři: Chudáček J., Aujeský R., Bohanes T., Malý T., Neoral Č.

Pelhřimovský chirurgický den 7. 11. 2008

#### **3. Chirurgická problematika léčby chronického traumatického hemotoraxu**

Autoři: Chudáček J, Bohanes T., Szkorupa M., Klein J., Neoral Č.

3. setkání hrudních chirurgů v Olomouci - Hrubá Voda 4. 6. 2009

#### **4. Burkittův lymfom**

**Autoři: Chudáček J., Klos D.**

XXIII. Petřivalského - Rapantův Kongres 29. - 30. 4. 2010

#### **5. Chirurgická problematika léčby chronického traumatického hemotoraxu**

Autoři: Chudáček J., Bohanes T.

XXIII. Petřivalského - Rapantův Kongres 29. -30. 4. 2010

#### **6. Mukokéla apendixu**

Autoři: Chudáček J., Aujeský R.,

XXIII. Petřivalského - Rapantův Kongres 29. – 30. 4. 2010

#### **7. Burkittův lymfom jako projev NPB**

Autoři: Chudáček J., Klos D.

Pelhřimovský chirurgický den 14. 11. 2009

#### **8. Chirurgická problematika chronického traumatického hemotoraxu**

Autoři: Chudáček J, Bohanes T., Szkorupa M., Klein J., Neoral Č.

XVI. Pražské chirurgické dny 14. - 15. května 2009

### **9. Náhodný nález při laparoskopii pro kontuzi břicha**

Autoři: Chudáček J., Aujeský R., Bohanes T., Malý T., Neoral Č.

Pelhřimovský chirurgický den 7. 11. 2008

### **10. Chirurgická problematika léčby chronického traumatického hemotoraxu**

Autoři: Chudáček J., Bohanes T., Szkorupa M., Klein J., Neoral Č.

1. setkání hrudních chirurgů v Olomouci - Hrubá Voda 4. 6. 2009

### **11. Detekce minimální reziduální choroby u karcinomu plic**

Autoři: J. Chudáček a kolektiv

XIII. den mladých chirurgů prof. MUDr. Čarského - Senec 7. června 2013

### **12. Minimální reziduální choroba u karcinomu plic**

Autoři: J. Chudáček a kolektiv

Naše chyby a omyly VI: Olomouc 22. 11. 2012

### **13. Detekce minimální reziduální choroby u karcinomu plic a její význam**

Autoři: J. Chudáček a kolektiv

Symposium hrudní chirurgie, Bzenec 11. - 12. dubna 2013

### **14. Detekce minimální reziduální choroby u karcinomu plic**

Autoři: J. Chudáček a kolektiv

Konference vědeckých prací studentů DSP na LF UP v Olomouci 16. - 17. prosince 2013

### **15. Chirurgická léčba tumorů hrudní stěny**

Autoři: J. Chudáček a kolektiv

40. česko-slovenský kongres s mezinárodní účastí Park hotel Plzeň 11. - 13. 9. 2013

**Přednáška oceněna první místem v kategorii autorů do 35 let.**

### **16. Minimální reziduální choroba u karcinomu plic – výsledky**

Autoři: J. Chudáček a kolektiv

Konference vědeckých prací studentů DSP na LF UP v Olomouci, září 2014

### **17. Chirurgická léčba tumorů hrudní stěny a naše zkušenosti**

Autoři: J. Chudáček a kolektiv

XXIII. Moravské dny pneumologie, XII. Tománkův den bronchologie, II. Kongres České pneumologické společnosti ČLS JEP, 18. – 20. 9. 2014 Olomouc