

Jednostopniowa amplifikacja kwasów nukleinowych (ang. One-Step Nucleic Acid Amplification – OSNA) – nowa metoda wykrywania przerzutów guzów litych do węzłów chłonnych

Krzysztof Kaczka¹, Anna Grzegory¹, Lech Pomorski¹

¹ Klinika Chirurgii Ogólnej i Onkologicznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Zgierz

Kaczka K, Grzegory A, Pomorski L. Jednostopniowa amplifikacja kwasów nukleinowych (ang. One-Step Nucleic Acid Amplification – OSNA) – nowa metoda wykrywania przerzutów guzów litych do węzłów chłonnych. Med Og Nauk Zdr. 2015; 21(2): 120–124. doi: 10.5604/20834543.1152906

Streszczenie

Wprowadzenie i cel pracy. Żadna ze stosowanych metod oceny węzłów chłonnych nie jest idealna. Wadą pooperacyjnego badania histopatologicznego jest długi czas oczekiwania na wynik. W przypadku dodatniego wyniku pooperacyjnego badania histopatologicznego węzła wartowniczego zachodzi konieczność przeprowadzenia drugiego zabiegu operacyjnego. Część przerzutów mniejszych niż 2 mm może zostać przeoczona w rutynowym badaniu histopatologicznym. Z kolei, badanie mroźkowe przy stosunkowo wysokiej swoistości ma niższą niż badanie pooperacyjne czułość. Badania molekularne z wykorzystaniem technik PCR, przy wysokiej czułości, charakteryzują się niższą swoistością. Ponadto techniki PCR, poza badaniem w czasie rzeczywistym, nie nadają się do wykorzystania jako badanie śródoperacyjne ze względu na długi czas oczekiwania na wynik. Jedną z nowych metod oceny węzłów chłonnych w guzach litych jest badanie OSNA. Artykuł podsumowuje światowe doniesienia dotyczące zastosowania tej techniki w ocenie węzłów chłonnych pacjentów z guzami litymi.

Opis stanu wiedzy. Badanie OSNA polega na amplifikacji mRNA cytokeratyny 19 (CK19). W chwili obecnej badanie to jest często wykonywane w badaniu węzłów chłonnych u pacjentów z rakiem piersi. W tym przypadku śródoperacyjna ocena węzłów chłonnych wartowniczych za pomocą metody OSNA pozwala na podjęcie decyzji o konieczności lub zaniechaniu wykonania limfadenektomii. W innych nowotworach zastosowanie metody OSNA podlega ewaluacji w licznych badaniach klinicznych.

Podsumowanie. Metoda OSNA być może stanie się rutynową techniką oceny węzłów chłonnych. Przy stosunkowo wysokiej czułości pozwala ona na ocenę węzłów chłonnych w czasie 30 minut, co umożliwi wykorzystanie jej jako badania śródoperacyjnego.

Słowa kluczowe

jednostopniowa amplifikacja kwasów nukleinowych, przerzuty, węzły chłonne, guzy lite

WPROWADZENIE I CEL PRACY

Ocena obecności przerzutów do węzłów chłonnych u pacjentów z guzami litymi stanowi ważny element procesu diagnostyczno-terapeutycznego. Pozwala na ustalenie właściwego stopnia zaawansowania klinicznego choroby, a co za tym idzie podjęcie leczenia dostosowanego do konkretnego pacjenta. Usuwanie węzłów chłonnych może powodować powikłania takie jak: obrzęki, bolesność, ograniczenie ruchomości pobliskich stawów. Może to znacząco obniżyć jakość życia chorego. Dlatego od wielu lat poszukuje się metod, za pomocą których, z jednej strony można by z pewnością usunąć razem z guzem wszystkie zajęte przez nowotwór węzły chłonne, z drugiej jednak strony nie pozbawiać pacjenta węzłów wolnych od komórek nowotworowych. W tym celu wprowadzono biopsję węzła wartowniczego (ang. *sentinel lymph node biopsy* – SLNB). R. Cabanas w 1977 r. w pracy dotyczącej raka prącia przedstawił ideę wykonywania biopsji

węzła wartowniczego [1]. Teorię węzła wartowniczego można zastosować w innych nowotworach. W latach osiemdziesiątych ubiegłego wieku Morton opracował metodę limfoscintygrafii, dzięki której możliwe jest określenie lokalizacji węzła wartowniczego w czerniaku [2]. Następnie znaleziony w ten sposób węzeł chłonny należy ocenić pod kątem obecności przerzutów. Można w tym celu wykorzystać badanie histopatologiczne, ewentualnie w połączeniu z badaniem immunohistochemicznym. W klasycznym badaniu histopatologicznym można nie znaleźć przerzutów mniejszych niż 2mm, co może prowadzić do niedoszacowania zaawansowania nowotworu (ang. *downstaging*) i ewentualnego niedostatecznego leczenia [3].

Podjęcie decyzji o usunięciu węzłów chłonnych w trakcie jednego zabiegu operacyjnego umożliwi badanie mroźkowe. Jednakże ocena śródoperacyjna, w porównaniu z badaniem pooperacyjnym tego samego węzła wartowniczego, przy wysokiej swoistości (99%) ma stosunkowo niską czułość (57–74%) [4]. U części pacjentów ponowna operacja jest konieczna mimo negatywnego wyniku badania śródoperacyjnego. Węzły chłonne mogą być także oceniane za pomocą metod molekularnych, w szczególności przy użyciu różnych odmian łańcuchowej reakcji polimerazy (ang. *polymerase*

Adres do korespondencji: Klinika Chirurgii Ogólnej i Onkologicznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, ul. Parzęczewska 35, 95-100 Zgierz
E-mail: krzysztofkaczka@poczta.fm

Nadesłano: 12 lutego 2014; zaakceptowano do druku: 03 lutego 2015

chain reaction- PCR). Badanie ilościowe qRT-PCR (*quantitative reverse transcriptase – polymerase chain reaction* qRT-PCR) polega na amplifikacji swoistego dla danego nowotworu markera wyizolowanego z materiału z pobranego węzła chłonnego [5]. W ten sposób ocenia się materiał z całego węzła chłonnego, a nie tylko jego część, co może mieć miejsce w przypadku badania histopatologicznego – zdarza się pominięcie części węzła chłonnego, w której znajdują się komórki nowotworowe. Metoda qRT-PCR określa ilość mRNA danego markera na podstawie stopnia natężenia fluorescencji znacznika (tj. produktu ubocznego reakcji) uwalnianego i pobudzanego do świecenia w trakcie łączenia się poszukiwanego mRNA z komplementarnym do niego DNA (cDNA). Natężenie fluorescencji musi być w przypadku komórek nowotworowych wyższe od określonego poziomu progowego odpowiadającego fizjologicznej ekspresji mRNA w komórkach węzła chłonnego. Okazuje się jednak, że qRT-PCR, przy czułości rzędu 78–96%, charakteryzuje się niższą w porównaniu z śródoperacyjnym badaniem histologicznym swoistością [6]. Jedną z najnowszych technik stosowanych do śródoperacyjnej oceny węzłów chłonnych jest metoda OSNA. Celem pracy jest podsumowanie światowych doniesień dotyczących zastosowania metody OSNA u pacjentów z nowotworami: rakiem piersi, jelita grubego i żołądka, płuca oraz rakami z obszaru głowy i szyi.

OPIS STANU WIEDZY

Metoda OSNA polega na amplifikacji mRNA cytokeratyny 19 (CK19). CK19 jest białkiem o masie molekularnej 40 kDa, zaliczanym do grupy cytokeratyn typu I, czyli cytokeratyn kwasowych. Białko to zostało zidentyfikowane jako najlepszy marker guzów litych, ponieważ charakteryzuje się wysokim poziomem ekspresji w węzłach chłonnych z obecnymi przerzutami i niski poziom ekspresji w węzłach bez przerzutów [7]. Najpierw pobrany materiał z węzła jest poddany homogenizacji w specjalnym roztworze buforowym, a następnie krótkiemu odwirowaniu. Tak przygotowany produkt poddaje się pętlowej amplifikacji w stałej temperaturze z wykorzystaniem odwrotnej transkrypcji (RT-LAMP – *reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification*), według oryginalnej metody opracowanej przez Notomi i wsp. [8]. Wykorzystuje ona sześć różnych primerów, które są zaprojektowane specjalnie do rozpoznania ośmiu odrębnych regionów na matrycy. Primery są tak zaprojektowane, aby wykluczyć możliwość amplifikacji pseudogenów CK19. Obecność takich niepożądanych produktów reakcji mogłaby spowodować uzyskanie wyników fałszywie dodatnich. Ponadto, prawdopodobieństwo wystąpienia niepożądanego amplifikacji genomowego DNA jest zredukowane do zera, dzięki niskiemu pH środowiska reakcji (pH=3,5) oraz izotermicznej temperaturze. Specyficzność primerów pozwala na przebieg całej reakcji amplifikacji w stałej temperaturze (65°C) [9, 10]. Odróżnia to metodę OSNA od technik PCR, gdzie trzy etapy amplifikacji przebiegają w trzech różnych temperaturach. Umożliwia to skrócenie badania do 16 minut przy stałej temperaturze 65°C. Taka temperatura zapobiega jednoczesnej amplifikacji DNA obecnego w materiale. Ilość badanego mRNA określa się za pomocą oceny mętności roztworu (liczonej w nefelometrycznych jednostkach mętności), która powstaje na skutek wytrącania pirofosforanu magnezu, produktu ubocznego amplifikacji mRNA CK19 [11].

W przeciwieństwie do badań histopatologicznych, OSNA jest procedurą wysoce zautomatyzowaną, wystandaryzowaną i niezależną od badacza. Specjalnie skonstruowany do odczytywania wyników aparat RD-100i (Sysmex Japonia) podaje wynik metodą półilościową. Za pomocą minusa (-) określa rezultat, jeśli w materiale znajduje się mniej niż 250 kopii mRNA CK19 na μL . Taki wynik wyklucza obecność komórek nowotworowych w danym materiale. Za pomocą (+) oznacza liczbę kopii, która mieści się w przedziale 250–5000 kopii/ μL , co sugeruje obecność mikroprzerzutów do badanego węzła chłonnego), a (++) liczbę kopii > 5000/ μL – wynik typowy dla makroprzerzutów. Waga próbek węzłów nie powinna przekraczać 0,6g. Jeśli węzeł jest cięższy, należy go rozkawałkować i w oddzielnych fragmentach poddać amplifikacji cały materiał. Jak dotąd, w literaturze opisano zastosowanie OSNA w ocenie węzłów chłonnych w raku piersi, jelita grubego, żołądka, płuc oraz głowy i szyi.

Rak piersi

Jako pierwszy, zastosowanie techniki OSNA w raku piersi opisał Tsujimoto z wsp. w 2007r. [12]. Na podstawie metody qRT-PCR do badań metodą OSNA wybrano cytokeratynę 19 – CK19. W części klinicznej badania węzeł chłonny został podzielony na 4 reprezentatywne fragmenty, z których dwa oceniono histopatologicznie i immunohistochemicznie, a dwa pozostałe, położone naprzemiennie, do badania metodą OSNA. Wskaźnik zgodności wyników śródoperacyjnego badania histopatologicznego i badania OSNA wyniósł 98,2% dla wszystkich węzłów chłonnych, w tym dla 96,4% dla węzłów wartowniczych. W grupie 144 węzłów bez wykrytych przerzutów w badaniu histopatologicznym metoda OSNA nie dała ani jednego wyniku fałszywie dodatniego. Według Tsujimoto i wsp. badanie połowy węzła wartowniczego metodą OSNA jest równie wiarygodne, co badanie śródoperacyjne. Podobne badania, ale na większym materiale (346 węzłów chłonnych pochodzących od 32 pacjentek), prowadził Visser i wsp. [13]. Wykryto 18 przypadków niezgodności wyników badania histopatologicznego i metody OSNA. W przypadku 15 węzłów chłonnych uzyskano dodatni wynik badania molekularnego mimo ujemnego rezultatu badania histopatologicznego. Z kolei w przypadku 3 próbek wynik otrzymany metodą OSNA był ujemny mimo pozytywnego wyniku badania histopatologicznego. Tym samym współczynnik zgodności między śródoperacyjnym badaniem histopatologicznym i badaniem OSNA wyniósł 94,8%, natomiast czułość i swoistość techniki OSNA wynosiły odpowiednio: 95,3% i 94,7%. We wszystkich przypadkach niezgodności badania histopatologicznego i OSNA zastosowano dodatkowo badanie qRT-PCR i Western Blot. W przypadku 7(2,02%) węzłów niezgodność wyników uzasadniono błędem pobrania. Do jednego z badań – histopatologicznego lub OSNA – trafiła część węzła zawierająca przerzut, a do drugiego badania część węzła bez komórek nowotworowych. Natomiast w 11(3,02%) węzłach chłonnych potwierdzono niezgodność między badaniami. Tym samym wskaźnik zgodności między badaniem OSNA a badaniem histopatologicznym wyniósł 94,8%. Po wykluczeniu przypadków niezgodności wynikających z błędów pobrania uzyskano 96,8% zgodności wyników między badaniem OSNA a badaniem histopatologicznym. Obliczona ponownie czułość i swoistość dla techniki OSNA wynosiła odpowiednio 95,3% i 97,1%. Ponadto ilość wykrytych kopii mRNA CK19 zależała od wielkości przerzutu określonej na podstawie badania histopatologicznego. Pięćdziesiąt (94,3%) z 53 węzłów uznanych

w badaniu histopatologicznym za makroprzerzuty miało wynik badania OSNA (++) (liczba kopii >5000/μL), pozostałe dwa (+) (liczba kopii między 500 a 5000/μL). Z jednego węzła chłonnego przy dodatnim wyniku badania histopatologicznego uzyskano ujemny wynik badania OSNA. Podobne porównanie badania OSNA z badaniem histopatologicznym przeprowadził Khaddage i wsp. [14]. Uzyskał również wysokie, co w badaniu Tsujimoto, wyniki współczynnika zgodności, czułości i swoistości techniki OSNA.

W metaanalizie Cserni i wsp. uzyskano 96% zgodność wyników pomiędzy badaniem histopatologicznym wspomaganym immunohistochemią a badaniem OSNA [15]. Niewielka liczba wyników fałszywie ujemnych wskazuje, w ocenie autorów, na możliwość stosowania techniki OSNA jako badania śródoperacyjnego. Wysoką czułość badania OSNA w wykrywaniu przerzutów raka piersi potwierdzono także w innym badaniu [16]. Przy użyciu tej techniki znaleziono więcej mikroprzerzutów niż w badaniu mrożakowym węzłów chłonnych podzielonych na dwumilimetrowe fragmenty. Pacjenci po wcześniejszej jakiegokolwiek operacji gruczołu piersiowego nie mogą być badani metodą OSNA. CK 19 jest obecna w komórkach nabłonka skóry. Podczas tworzenia się blizny komórki te migrują do wnętrza ciała. Zjawisko to może być przyczyną fałszywie dodatnich wyników badania OSNA [17]. Jak wskazują badania Guillen-Paredes i wsp., technika OSNA w przypadku raka piersi może stanowić wartościową alternatywę dla standardowego pooperacyjnego badania histopatologicznego również z ekonomicznego punktu widzenia [18]. Autorka obliczyła, że koszty generowane w przypadku zastosowania OSNA były niższe o 319,99 € na pacjenta. OSNA stała się w Hiszpanii realną, alternatywną dla standardowego badania histopatologicznego metodą oceny węzłów chłonnych. Może to ograniczyć negatywne skutki reoperacji pacjentek z rakiem piersi.

Rak jelita grubego

W raku jelita grubego także próbuje się stosować jednostopniową amplifikację kwasów nukleinowych. W przeciwieństwie do raka piersi, korzyść z zastosowania tej metody nie polega na uniknięciu dodatkowej operacji. Być może OSNA w raku jelita grubego pozwoli na precyzyjniejszą ocenę stopnia zaawansowania nowotworu. Standardem w diagnostyce raka jelita grubego jest pooperacyjna ocena co najmniej 12 węzłów chłonnych za pomocą barwienia hematoksyliną i eozyną. Klasyczne badanie histopatologiczne umożliwia ocenę jedynie poszczególnych fragmentów węzła chłonnego. Duża część węzła zostaje niezbadana. Jeśli znajdują się w niej komórki nowotworowe, to mogą zostać przeoczone. Skutkuje to niedoszacowaniem stopnia zaawansowania nowotworu. Obecność komórek nowotworowych w węzłach chłonnych stanowi podstawę do zakwalifikowania chorych do III stopnia zaawansowania, a tym samym do obowiązkowego stosowania chemioterapii adjuwantowej. Zwiększa ona odsetek 5-letnich przeżyć i zmniejsza odsetek nawrotów [19]. Określenie obecności przerzutów w węzłach chłonnych jest więc kluczowe dla podjęcia właściwej terapii. Jak szacuje Croner, nawroty choroby występują u ok. 20% pacjentów, u których za pomocą badania histopatologicznego w węzłach chłonnych nie stwierdzono przerzutów [20]. Liefers i wsp. przebadali 192 węzły chłonne pochodzące od 26 pacjentów z rakiem jelita grubego w II stopniu zaawansowania, tj. bez obecności przerzutów w standardowym badaniu histopatologicznym [21]. Węzły oceniono za pomocą techniki

RT-PCR ukierunkowanej na poszukiwanie mRNA dla CEA. Dodatni wynik badania molekularnego uzyskano u 14 (54%) pacjentów. Grupę badaną obserwowano przez 5 lat. Pięcioletni wskaźnik przeżycia wynosił 36% dla grupy z dodatnim wynikiem badania RT-PCR i 75% dla grupy z wynikiem ujemnym. Autorzy pracy podkreślają, że dodatni wynik badania molekularnego może świadczyć o obecności mikroprzerzutów i powinien być wskazaniem do stosowania chemioterapii adjuwantowej. Croner i wsp. w 2010 r. jako pierwsi ocenili węzły chłonne u pacjentów z rakiem jelita grubego za pomocą metody OSNA [22]. Sto osiemdziesiąt cztery węzły chłonne podzielono na 4 reprezentatywne części. Dwie z nich poddano ocenie za pomocą techniki OSNA, a dwa pozostałe przy użyciu standardowego badania histopatologicznego. Zgodne wyniki uzyskano w 176 (95,7%) węzłach. Pozostałe węzły, z których uzyskano różne wyniki badania histopatologicznego i OSNA, poddano badaniu qRT-PCR. W badaniu stwierdzono, że w przypadku 3 węzłów niezgodność wyników była spowodowana obecnością ognisk przerzutowych tylko we fragmencie poddanemu badaniu molekularnemu lub histopatologicznemu. Ostatecznie uzyskano zgodność wyników na poziomie 97,2% przy czułości i swoistości badania OSNA odpowiednio 94,9% i 97,9%. Podobne badanie, ale na większej grupie pacjentów, opublikował rok później Yamamoto i wsp. [23]. Przebadano łącznie 506 węzłów chłonnych od pacjentów z rakiem jelita grubego. W pierwszym etapie pracy udowodniono, że ocena metodą OSNA nie powoduje wzrostu liczby wyników fałszywie dodatnich, w porównaniu z badaniem histopatologicznym. Wyniki takie niepotrzebnie zwiększają odsetek chorych poddawanych chemioterapii na skutek zawyżonego zaawansowania. W drugiej części badania porównano badanie OSNA z badaniem histopatologicznym. Uzyskane wyniki były zbliżone do tych, które uzyskał Croner i wsp. Współczynnik zgodności wyników wyniósł 97,1%, czułość badania OSNA wynosiła 95,2%, natomiast swoistość 97,7%. Ponadto za pomocą badania OSNA udało się wykryć mRNA dla CK19 w komórkach nowotworowych u wszystkich pacjentów (niezależnie od typu histologicznego raka), nawet jeśli za pomocą techniki qRT-PCR stwierdzono niską amplifikację CK19 mRNA. W chwili obecnej nie ma badań oceniających ryzyko wystąpienia wznowy u chorych z rakiem jelita grubego, których węzły chłonne badano za pomocą badania OSNA.

Rak żołądka

Badanie metodą OSNA próbuje się także wykorzystać do śródoperacyjnej oceny węzła wartowniczego w raku żołądka, zwłaszcza w I stopniu zaawansowania (T1N0M0) [24, 25, 26]. Yaguchi i wsp. opublikowali w 2011 r. wyniki swojego badania [27]. Przebadano 162 węzły pobrane od 32 pacjentów. Każdy węzeł podzielono na 4 części, z których dwie oceniano za pomocą badania histopatologicznego a dwie pozostałe zbadano za pomocą qRT-PCR i OSNA. Oceniono, że CK19 jest najlepszym markerem dla badań molekularnych. Współczynnik zgodności wyników między badaniami wynosił 94,4% przy 88,9% czułości i 96,9% swoistości badania OSNA. Poziom ekspresji mRNA CK19 był wyraźnie wyższy w węzłach objętych przerzutami i korelował z wielkością przerzutu. U pięciu chorych badanie OSNA dało wynik ujemny przy dodatnim wyniku badania histopatologicznego. U 2 z nich stwierdzono obecność mikroprzerzutów, natomiast u 3 pozostałych obecność izolowanych komórek nowotworowych. Chorzy ci mieli stosunkowo niewielką (< 50 kopii/μL) liczbę

kopii mRNA dla CK19. Według ostatnio opublikowanej metaanalizy z czterech ośrodków japońskich, czułość badania OSNA w raku żołądka jest porównywalna z badaniem histopatologicznym [28]. W badaniu oceniono 394 węzły chłonne otrzymane od 61 pacjentów. Zgodność wyników między metodą OSNA a badaniem histopatologicznym wynosiła 94,2%, czułość i swoistość badania OSNA odpowiednio 83,3% oraz 95,9%. Niezgodność zaobserwowano w przypadku 23 (5,8%) węzłów chłonnych. Była ona spowodowana umiejscowieniem komórek nowotworowych tylko we fragmencie wykorzystanym do OSNA i/lub niską ekspresją mRNA CK19. Według autorów, metoda OSNA może być traktowana jako badanie użyteczne w śródoperacyjnej ocenie węzłów chłonnych u pacjentów z rakiem żołądka. W chwili obecnej stosowanie techniki OSNA do oceny węzła wartowniczego w raku żołądka budzi kontrowersje, ponieważ nie istnieje jednolity sposób rozprzestrzeniania się przerzutów w tym nowotworze. Szczególnie jest to widoczne w wyższych stopniach zaawansowania guza [29].

Rak płuc

Inoue i wsp. wykorzystali badanie OSNA do oceny węzłów chłonnych u pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuc [30]. W pierwszym etapie pobrano 165 węzłów chłonnych od 49 pacjentów. Za pomocą RT-PCR wyselekcjonowano dwa markery CK19mRNA i CK7mRNA, które wykazywały największe różnice ekspresji w węzłach zajętych przez przerzuty i wolnych od komórek nowotworowych. W dalszym etapie każdy z węzłów chłonnych przebadano za pomocą standardowego badania histopatologicznego w połączeniu z badaniem immunohistochemicznym oraz metodą OSNA. Zgodność między badaniami wynosiła 98,8% dla CK19 oraz 96,4% dla CK7. Jeden wynik fałszywie ujemny otrzymany w badaniu OSNA wynikał z martwicy komórek nowotworowych. Z kolei jeden wynik fałszywie dodatni badania molekularnego spowodowany był obecnością komórek nowotworowych tylko we fragmencie poddanym badaniu OSNA. Badanie wykazało, że CK19 jest najlepszym markerem. Dodatkowe określenie ekspresji CK7mRNA nie podniosło czułości ani swoistości. Metoda OSNA może stanowić skuteczne narzędzie diagnostyczne węzłów chłonnych w raku niedrobnokomórkowym płuc. Hayama M. i wsp. w pracy z 2013 r. badali zastosowanie metody OSNA u pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuc [31]. Analizowano 149 węzłów chłonnych pobranych w czasie lobektomii od 20 pacjentów. Z grupy badanej wyłączono chorych, którzy otrzymywali chemio- lub radioterapię. Rozbieżności między wynikami OSNA i badania histopatologicznego stwierdzono w 4 stacjach węzłów chłonnych. Przeprowadzono dodatkowe badanie histopatologiczne skrawków o grubości 1 mm wybarwionych H&E. W jednym z czterech przypadków wykryto mikroprzerzuty. Czułość badania OSNA wynosiła 100% a swoistość 91,7%.

Nowotwory głowy i szyi

Matsuzuka T. i wsp. zastosowali metodę OSNA do śródoperacyjnej oceny węzłów chłonnych u pacjentów z płaskonabłonkowym rakiem głowy i szyi [32]. Pobrano 175 węzłów chłonnych od 56 operowanych. W przypadku tego nowotworu przyjęto, że za wyniki dodanie badania OSNA zostaną uznane próbki zawierające minimum 131 kopii/1 μ L dla CK19 mRNA. Przy takich założeniach czułość badania OSNA wynosiła 82,4%, swoistość 99,3% w stosunku

do badania histopatologicznego. W opinii autorów, technika OSNA może być śródoperacyjną metodą oceny węzłów chłonnych w rakach płaskonabłonkowych głowy i szyi. Podkreślają jednak konieczność przeprowadzenia dalszych badań na większej grupie pacjentów przed sformułowaniem ostatecznych wniosków.

Kolejne badania oceniające technikę OSNA w nowotworach głowy i szyi na większej grupie chorych przeprowadził Goda H. i wsp. Badaniu poddano 312 węzłów chłonnych od 65 pacjentów. W 61 (19,6%) stwierdzono obecność przerzutów w pooperacyjnym badaniu histopatologicznym. Uzyskano 94,2% zgodność wyników pomiędzy badaniem OSNA a histopatologią, przy przyjęciu tych samych kryteriów metody OSNA co dla raka piersi. Autorzy pracy przeprowadzili pilotażowe badanie węzłów chłonnych u pacjentów z rakiem rdzeniastym tarczycy. W opinii autorów, badanie molekularne OSNA może być alternatywą dla badania histopatologicznego. Obecnie można je przeprowadzić poszukując mRNA dla CK19. W przypadku raka rdzeniastego byłoby ciekawe porównać „klasyczne” badanie OSNA z badaniami przy użyciu innych markerów, szczególnie kalcytoniny.

PODSUMOWANIE

W ostatnich latach pojawia się coraz więcej doniesień naukowych dotyczących zastosowania techniki jednostopniowej amplifikacji kwasów nukleinowych w ocenie węzłów chłonnych pacjentów z rakami wywodzącymi się z różnych narządów. Zwykle wykazuje ona czułość i swoistość zbliżoną do standardowego badania histopatologicznego. W przeciwieństwie do badania histopatologicznego, metoda OSNA jest wysoce zautomatyzowaną, wystandaryzowaną i niezależną od badacza procedurą. Krótki czas badania umożliwia wykorzystanie jej jako badania śródoperacyjnego.

PIŚMIENICTWO

1. Cabanas RM. An approach for the treatment of penile carcinoma. *Cancer* 1977; 39(2): 456–466.
2. Morton DL, Wen DR, Wong JH, Economou JS, Cagle LA, Storm FK i wsp. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg*. 1992; 127(4): 392–399.
3. Weaver DL. The prognostic importance of isolated tumor cell clusters and micrometastases in sentinel lymph nodes. *Cancer Invest*. 2009; 27(2):121–128.
4. Layfield DM, Agrawal A, Roche H, Cutress RI. Intraoperative assessment of sentinel lymph nodes in breast cancer. *Br J Surg*. 2011; 98(1): 4–17.
5. Primer design Beginner's guide to real-time PCR. Internet: http://www.primerdesign.co.uk/assets/files/beginners_guide_to_real_time_pcr.pdf (dostęp: 2013.12.30).
6. Weaver DL. The prognostic importance of isolated tumor cell clusters and micrometastases in sentinel lymph nodes. *Cancer Invest*. 2009; 27(2): 121–128.
7. Tsujimoto M, Nakabayashi K, Yoshidome K, Kaneko T, Iwase T, Akiyama F i wsp. One-step Nucleic Acid Amplification for Intraoperative Detection of Lymph Node Metastasis in Breast Cancer Patients. *Clin Cancer Res*. 2007; 13(16): 4807–16.
8. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N i wsp. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 2000; 28(12): E63.
9. Eiken Genome Site. About LAMP method. Internet:<http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/index.html> (dostęp: 2013.12.30)
10. Schem C, Maass N, Bauerschlag DO, Carstensen MH, Löning T, Roder C i wsp. One-step nucleic acid amplification—a molecular method for the detection of lymph node metastases in breast cancer patients; results of the German study group. *Virchows Arch*. 2009; 454: 203–210.

11. Cserni G. Intraoperative analysis of sentinel lymph nodes in breast cancer by one-step nucleic acid amplification. *J Clin Pathol.* 2012; 65(3): 193–199.
12. Tsujimoto M, Nakabayashi K, Yoshidome K, Kaneko T, Iwase T, Akiyama F i wsp. One-step nucleic acid amplification for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast cancer patients. *ClinCancerRes.* 2007; 13(16): 4807–4816.
13. Visser M, Jiwa M, Horstman A, Brink AA, Pol RP, van Diest P i wsp. Intra-operative rapid diagnostic method based on CK19 mRNA expression for the detection of lymph node metastases in breast cancer. *Int J Cancer.* 2008; 122(11): 2562–2567.
14. Khaddage A, Berremila SA, Forest F, Clemenson A, Bouteille C, Seffert P i wsp. Implementation of molecular intra-operative assessment of sentinel lymph node in breast cancer. *Anticancer Res.* 2011; 31(2): 585–590.
15. Cserni G. Intraoperative analysis of sentinel lymph nodes in breast cancer by one-step nucleic acid amplification. *J Clin Pathol.* 2012; 65(3): 193–199.
16. Osako T, Iwase T, Kimura K, Yamashita K, Horii R, Yanagisawa A i wsp. Intraoperative molecular assay for sentinel lymph node metastases in early stage breast cancer: a comparative analysis between one-step nucleic acid amplification whole node assay and routine frozen section histology. *Cancer.* 2011; 117(19): 4365–4374.
17. Osako T, Iwase T, Kimura K, Yamashita K, Horii R, Yanagisawa A i wsp. Intraoperative molecular assay for sentinel lymph node metastases in early stage breast cancer: a comparative analysis between one-step nucleic acid amplification whole node assay and routine frozen section histology. *Cancer.* 2011; 117(19): 4365–4374.
18. Guillén-Paredes MP, Carrasco-González L, Chaves-Benito A, Campillo-Soto A, Carrillo A, Aguayo-Albasini JL. [One-step nucleic acid amplification (OSNA) assay for sentinel lymph node metastases as an alternative to conventional postoperative histology in breast cancer: A cost-benefit analysis]. *Cir Esp.* 2011; 89(7): 456–462 (in Spanish).
19. Korniluk J, Wcisło G, Nurzyński P, Stec R, Bodnar L, Obrocka B i wsp. Leczenie uzupełniające raka jelita grubego Adjuvant therapy of colorectal cancer. *Współczesna Onkologia* 2006; 10(3): 139–140.
20. Croner RS, Schellerer V, Demund H, Schildberg C, Papadopoulos T, Naschberger E i wsp. One step nucleic acid amplification (OSNA) – a new method for lymph node staging in colorectal carcinomas. *J Transl Med.* 2010; 8: 83.
21. Liefers GJ, Cleton-Jansen AM, van de Velde CJH, Hermans J, van Krieken JHJM, Cornelisse CJ i wsp. Micrometastases and Survival in Stage II Colorectal Cancer. *N Engl J Med* 1998; 339: 223–228.
22. Croner RS, Schellerer V, Demund H, Schildberg C, Papadopoulos T, Naschberger E i wsp. One step nucleic acid amplification (OSNA) – a new method for lymph node staging in colorectal carcinomas. *J Transl Med.* 2010; 8: 83.
23. Yamamoto H, Sekimoto M, Oya M, Yamamoto N, Konishi F, Sasaki J i wsp. OSNA-based novel molecular testing for lymph node metastases in colorectal cancer patients: results from a multicenter clinical performance study in Japan. *Ann Surg Oncol.* 2011; 18(7): 1891–1898.
24. Tangoku A, Seike J, Nakano K, Nagao T, Honda J, Yoshida T i wsp. Current status of sentinel lymph node navigation surgery in breast and gastrointestinal tract. *J Med Invest.* 2007; 54(1–2): 1–18.
25. Yaguchi Y, Sugawara H, Tsujimoto H, Takata H, Nakabayashi K, Ichikura T i wsp. One-step nucleic acid amplification (OSNA) for the application of sentinel node concept in gastric cancer. *Ann Surg Oncol.* 2011; 18(8): 2289–2296.
26. Kitagawa Y, Saikawa Y, Takeuchi H, Mukai M, Nakahara T, Kubo A, Kitajima M. Sentinel node navigation in early stage gastric cancer – updated data and current status. *Scand J Surg.* 2006; 95(4): 256–259.
27. Takata H, Nakabayashi K, Ichikura T i wsp. One-step nucleic acid amplification (OSNA) for the application of sentinel node concept in gastric cancer. *Ann Surg Oncol.* 2011; 18(8): 2289–2296.
28. Kumagai K, Yamamoto N, Miyashiro I, Tomita Y, Katai H, Kushima R, i wsp. Multicenter study evaluating the clinical performance of the OSNA assay for the molecular detection of lymph node metastases in gastric cancer patients. *Gastric Cancer.* 2014; 17(2): 273–280.
29. Kitagawa Y, Takeuchi H, Takagi Y, Natsugoe S, Terashima M, Murakami N i wsp. Sentinel node mapping for gastric cancer: a prospective multicenter trial in Japan. *J Clin Oncol.* 2013; 31(29): 3704–3710.
30. Inoue M, Hiyama K, Nakabayashi K, Morii E, Minami M, Sawabata N i wsp. An accurate and rapid detection of lymph node metastasis in non-small cell lung cancer patients based on one-step nucleic acid amplification assay. *LungCancer.* 2012; 78(3): 212–218.
31. Hayama M, Chida M, Karube Y, Tamura M, Kobayashi S, Oyaizu T i wsp. One-step Nucleic Acid Amplification for Detection of Lymph Node Metastasis in Lung Cancer. *Ann Thorac Cardiovasc Surg.* 2013 Apr 20. [Praca w druku]
32. Matsuzuka T, Takahashi K, Kawakita D, Kohno N, Nagafuji H, Yamauchi K i wsp. Intraoperative molecular assessment for lymph node metastasis in head and neck squamous cell carcinoma using one-step nucleic acid amplification (OSNA) assay. *Ann Surg Oncol.* 2012; 19(12): 3865–3870.
33. Goda H, Nakashiro K, Oka R, Tanaka H, Wakisaka H, Hato N i wsp. One-step nucleic acid amplification for detecting lymph node metastasis of head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2012; 48(10): 958–963.

One-Step Nucleic Acid Amplification – a new method for the detection of metastases of solid tumours of the lymph nodes

Abstract

Introduction and purpose. None of the applied methods of lymph node assessment is perfect. The need to wait a long time for the results is the disadvantage of postoperative histopathological examination. In the case of a positive outcome of the post-operative histopathology of sentinel lymph node it is necessary to perform a second surgery. Some metastases smaller than 2 mm can be omitted in routine histopathology. In turn, frozen section examination, with relatively high specificity, has lower sensitivity than postoperative histopathology. Molecular assays, using PCR techniques, with high sensitivity, have lower specificity. In addition, except for real-time PCR, all other techniques are not suitable for use as an intraoperative examination due to the long waiting time for the result. OSNA is one of the latest methods of lymph node assessment in solid tumours. The article summarizes world reports on the application of this technique in the evaluation of lymph nodes in patients with solid tumours.

Summary of the state of knowledge. The OSNA test is based on mRNA for cytokeratin 19(CK19) amplification. At present, this test is often performed in the search for lymph nodes metastases in patients with breast cancer. Intraoperative evaluation of sentinel lymph nodes in breast cancer, using the OSNA method, allows deciding whether or not to perform lymphadenectomy. In other cancers, the use of the OSNA method has been evaluated in numerous clinical trials.

Summary. The OSNA method could become a routine technique for the assessment of lymph nodes. It has a relatively high sensitivity and allows evaluation of lymph nodes in 30 minutes, which enables its use as an intraoperative examination.

Key words

One-Step Nucleic Acid Amplification, metastases, lymph nodes, solid tumours