

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Autoreferát disertační práce

Význam detekce lidských papilomavirů ve spádových
lymfatických uzlinách u pacientek s karcinomem děložního
hrdla

MUDr. Jiří Sláma

2009

Doktorské studijní programy v biomedicíně
Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor, předseda oborové rady: Experimentální chirurgie, Prof. MUDr. Jaroslav Živný,
DrSc.

Školící pracoviště: Gynekologicko – porodnická klinika VFN a 1. LF UK

Autor: MUDr. Jiří Sláma

Školitel: MUDr. Pavel Dundr, Ph.D.

Školitel konsultant: Prof. MUDr. David Cibula, CSc.

Oponenti: Doc. MUDr. Bohuslav Svoboda, CSc.,

Doc. MUDr. Jiří Špaček, Ph.D.,

Prim. MUDr. Josef Chovanec, Ph.D.

Autoreferát byl rozeslán dne 18.5.2009

Obhajoba se koná dne 23.9.2009 ve 14,00 hod. v posluchárně Gynekologicko –
porodnické kliniky VFN a 1. LF UK

S disertací je možno se seznámit na děkanátě 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy

OBSAH

Souhrn v Českém jazyce.....	4
Souhrn v Anglickém jazyce.....	5
Kapitoly	
1. Úvod.....	8
2. Cíle a hypotézy výzkumu.....	23
3. Materiál a metodika.....	24
3.1 Charakteristika souboru.....	24
3.2 Sběr materiálu k vyšetření.....	24
3.3 Amplicor HPV test.....	25
3.4 Histopatologické a imunohistochemické vyšetření	25
3.5 Statistická analýza.....	26
4. Výsledky.....	27
5. Diskuse.....	31
6. Závěry.....	34
Použitá literatura.....	35
Seznam publikací.....	39

Souhrn

Úvod: Metastatické postižení pánevních uzlin je důležitým prognostickým parametrem u časných stádií karcinomu děložního hrdla. Asi u 15% pacientek s negativními lymfatickými uzlinami však dojde k recidivě onemocnění, obvykle lokalizované v pánvi. Přítomnost DNA HPV v histopatologicky negativních uzlinách by zde mohla představovat marker jejich subklinického metastatického postižení.

Metodika: Do studie byly zařazeny radikálně operované pacientky v časném stádiu onemocnění. K získání materiálu pro vyšetření byla využita cytobrush technika z nativních tkání, která nevedla ke ztrátě materiálu pro histopatologické vyšetření.

Výsledky: Celkem bylo do studie zařazeno 49 žen. DNA high-risk (HR) HPV byla identifikována v primárním nádoru u 91,8% pacientek a u 49,9% pacientek také v sentinelových nebo ostatních pánevních uzlinách. Z 10 prokázaných genotypů HR HPV byl nejčastěji detekován HPV 16, a to jak v primárním nádoru, tak i v lymfatických uzlinách (66,7% a 71,4%). Všechny metastaticky postižené uzliny byly zároveň HPV pozitivní.

Závěry: Přítomnost HR HPV DNA v sentinelových uzlinách představovala pozitivní predikci metastatického postižení pánevních uzlin. Mohla by být považována za možnou známku časného, dosud subklinického metastatického postižení. Pro stanovení prognostického významu je však potřeba delšího sledování souboru radikálně léčených žen.

KLÍČOVÁ SLOVA

Lidský papilomavirus, karcinom děložního hrdla, prognostický faktor, sentinelová uzlina.

Conclusion

Background: Metastatic involvement of pelvic nodes is the most important prognostic parameter in early-stage cervical cancer. Still, approximately 15% of patients with negative pelvic nodes experience recurrence, majority of them in the pelvis. The presence of HPV DNA in histology-negative pelvic nodes is considered a subclinical metastatic spread.

Methods: Patients with early-stage cervical cancer referred for surgical treatment were enrolled in the study. Cytobrush technique was used for sample collection from the fresh tissue to avoid any loss of material for histology.

Results: Altogether, 49 patients were enrolled in the study. High-risk (HR) HPV was identified in the tumor in 91.8% patients, and in the sentinel node or other pelvic nodes in 49.9% patients. Among the 10 HR HPV genotypes detected, HPV 16 was the most frequently represented in both the tumor and the lymph nodes (66.7% and 71.4%, respectively). All metastatic lymph nodes were HPV positive.

Conclusions: The presence of HR HPV DNA in a sentinel node had a positive predictive value for metastatic involvement of pelvic lymph nodes in our study. This could be considered a sign of an early subclinical metastatic spread; however, the prognostic value has to be evaluated through a longer follow-up.

KEY WORDS

Cervical cancer, human papillomavirus, prognostic factor, sentinel node

1. Úvod

Metastatické postižení spádových lymfatických uzlin je jedním z nejdůležitějších prognostických faktorů u časných stádií karcinomu děložního hrdla. Podle stádia onemocnění snižuje 5-leté přežití o 25 – 60% [Ho, 2004; Lukaszuk, 2007]. Součástí standardního postupu při radikálním operačním výkonu je proto provedení systematické pánevní lymfadenektomie. Průkaz metastatického postižení lymfatických uzlin je posléze nejčastějším kritériem pro indikaci adjuvantní léčby.

I při histopatologické negativitě všech vyšetřených lymfatických uzlin však dojde asi v 10 - 15% případů k recidivě onemocnění, lokalizované až v 60% v pánvi [Sartori, 2007]. Proto jsou hledány markery, které by mohly korelovat s rizikem „okultního“ metastatického postižení spádových uzlin a zvýšeným rizikem recidivy onemocnění [Holmgren, 1995]. Na základě potvrzení kauzální souvislosti mezi perzistentní high risk papilomavirovou (HR HPV) infekcí v děložním hrdle a rozvojem karcinomu je jedna z perspektivních metod stanovení přítomnosti DNA HR HPV v pánevních lymfatických uzlinách.

2. Cíle a hypotézy výzkumu

Hlavním cílem naší studie bylo vyšetření přítomnosti DNA 13 genotypů HR HPV ve tkáni karcinomu děložního hrdla, v SLN a ostatních spádových pánevních lymfatických uzlinách a korelace výsledků s histopatologickým a imunohistochemickým vyšetřením. Šlo o první prospektivní studii, která srovnávala přítomnost konkrétních genotypů HR HPV v SLN a non-SLN regionálních uzlinách [Slama, 2009]. Vstupní hypotézou byl předpoklad, že HPV DNA bude přítomna ve všech metastaticky postižených uzlinách, ale i ve falešně negativních SLN. Informace HPV testu by tak zvýšila senzitivitu biopsie SLN. Současně bylo sledováno zastoupení jednotlivých genotypů HR HPV na úrovni primárního nádoru, SLN a ostatních (non-SLN) pánevních uzlin. Předpokladem bylo, že osa tumor – SLN – non-SLN by měla v případě metastatického šíření vykazovat shodu vždy alespoň v jednom genotypu HPV.

Dalším cílem bylo ověřit praktické využití jednoduché peroperační metodiky odběru vzorků k analýze HPV DNA, která zároveň umožní následné histopatologické a imunohistochemické vyšetření uzlin bez ztráty materiálu. Součástí studie bylo i využití transrektálního ultrazvukového vyšetření v předoperačním stagingu, díky jehož přesnosti vykazoval soubor radikálně operovaných patientek dominantní zastoupení časných stádií onemocnění. Výsledky studie s transrektálním ultrazvukovým vyšetřením byly navíc samostatně publikovány [Fischerova, 2008].

3. Materiál a metodika

3.1 Charakteristika souboru

Do studie byly zařazeno 49 patientek s karcinomem děložního hrdla ve FIGO stádiu IA2 až IIB, u kterých byla v době od 10/2005 do 4/2007 provedena v Onkogynekologickém centru Všeobecné fakultní nemocnice a 1. LF UK v Praze radikální hysterektomie, biopsie SLN a systematická pánevní lymfadenektomie [Benedet, 2000; Cibula, 2008]. U 10 patientek s „bulky“ nádorem větším než 4 cm byly před operací podány 3 cykly neoadjuvantní chemoterapie (ifosfamid ($1,75 \text{ g/m}^2$) / cisplatina (75 mg/m^2)). Všechny pacientky podepsaly informovaný souhlas a provedení studie bylo schváleno etickou komisí Všeobecné fakultní nemocnice a 1. LF UK v Praze.

3.2 Sběr materiálu k vyšetření

Na počátku operace byla provedena u všech patientek identifikace SLN pomocí kombinované techniky využívající radiokoloid a 4 ml patent blau (Patent blau V, Byk Gulden, Konstanz, Germany nebo Bleu patenté V 2,5 %, Guerbet, Roissy, France) aplikované do stromatu hrdla děložního. Technika aplikace byla standardizována podle publikovaných doporučení [Barranger, 2004; Lin, 2005]. Každá SLN byla rozříznuta v podélném průměru na dvě poloviny a z řezu proveden stěr pomocí brush techniky ke stanovení přítomnosti DNA HR HPV do odběrového média. Stěr k detekci HR HPV byl po operaci identicky proveden i ze všech makroskopicky patrných lymfatických uzlin 5 standardních lokalizací získaných systematickou pánevní lymfadenektomií (oblast podél vasa iliaca interna, vasa iliaca externa,

vasa iliaca communis, z fossa obturatoria a presakrální oblasti), zároveň byl proveden stěr z primárního nádoru děložního hrdla. U pacientek po konizaci byl stěr proveden z místa pokonizačního defektu a z cervikálního kanálu. Všechny odběry byly prováděny před fixací a odesláním preparátů k histopatologickému vyšetření. Každý odběr byl izolovaně proveden pomocí cytobrush techniky do nádobek ThinPrep obsahujících transportní médium PreservCyt (Cytoc UK, Crawley West Sussex, UK) tak, aby byla vyloučena možnost kontaminace.

3.3 Amplikor HPV test

Buněčná i HPV DNA byla izolována lýzou vzorků za denaturačních podmínek za zvýšených teplot. Lýza se prováděla za přítomnosti proteinázy K, chaotropního činidla a detergentu. Následovala izolace a čištění uvolněné nukleové kyseliny na sloupcích a eluce činidlem. K analýze byl použit Amplikor HPV test (Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ), který po amplifikaci cílové DNA umožnil pomocí hybridizace nukleové kyseliny detekci 13 genotypů HR HPV - 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 a 68. Po přípravě vzorků byla 165 bp dlouhá část HPV L1 genu a 268 bp dlouhé fragmenty lidského beta – globinového genu koamplifikovány. Po PCR amplifikaci byl amplicon HPV beta - globinu přidavkem denaturačního roztoku chemicky denaturován na jednořetězcovou DNA. Alikvotní podíly denaturovaného ampliconu se odměřily do jamek mikroploten (MicroWellPlates, MWP) potažených HR HPV nebo beta – globin specifickými (B_PCO3) oligonukleotidovými sondami. Biotinem značený amplicon HPV a beta - globinu byl k oligonukleotidovým sondám vázán na jamky MWP hybridizován. Po skončení hybridizační reakce byl do každé jamky přidán konjugát avidin-křenové peroxidázy. Tento konjugát se na biotinem značený amplicon hybridizovaný k oligonukleotidovým sondám vázaným k MWP navázal a do jamek byl přidán substrátový roztok obsahující peroxid vodíku a 3,3',5,5'- tetrametylbenzidin (TMB). Navázaná křenová peroxidáza katalyzovala v přítomnosti peroxidu vodíku oxidaci TMB a vedla k vytvoření barevného komplexu. Reakce se zastavila přidáním slabé kyseliny a automatickou čtečkou mikroploten byla měřena absorbance při 450 nm. Hodnoty absorbance $\geq 0,20$ byly hodnoceny jako pozitivní.

3.4 Histopatologické a imunohistochemické vyšetření

Histopatologické vyšetření bylo provedeno standardní technikou. SLN byly celé vyšetřeny podle protokolu popsáném v jiných studiích [Barranger, 2004]. Průměrně bylo

vyšetřeno 16 řezů z každé SLN barvených hematoxylinem a eosinem a 16 řezů vyšetřených imunohistochemicky. Imunohistochemické vyšetření bylo provedeno technikou avidin-biotinového komplexu (Ventana ES autostainer, Ventana, Medical Systems, Tucson, AZ) s monoklonálními protilátkami proti cytokeratinům AE1-AE3 ((1:50 dilution), Dako, Glostrup, Denmark).

3.5 Statistická analýza

Lineární trend ve výsledcích byl hodnocen pomocí testu lineárního trendu. Posouzení jednotlivých výsledků bylo provedeno pomocí binomiálního modelu. Korelace objemu nádoru a stavu HPV v SLN byla posuzována pomocí Mann-Whitneyho *U* testu.

4. Výsledky

Charakteristiku souboru shrnuje tabulka 1. SLN byly peroperačně detekovány ve 48 případech (97,9%). U 44 (89,8%) pacientek byly detekovány SLN na obou stranách pánve, u 4 (8,2%) pacientek pouze unilaterálně (3x vpravo, 1x vlevo). Přítomnost sekvencí DNA HR HPV byla nalezena ve tkáni 45 (91,8%) primárních tumorů a u 21 (42,9%) pacientek ve spádových pánevních lymfatických uzlinách. U 14 pacientek (28,6%) byla DNA HPV prokázána současně v SLN a v dalších pánevních uzlinách, v 6 případech (12,2%) byla DNA HPV přítomna izolovaně v SLN. Pouze v 1 případě (4,8%) jsem prokázali DNA HPV v non-SLN pánevních uzlinách při negativě stejnostranné SLN. Ve skupině pacientek SLN HR HPV pozitivních byla častěji přítomná lymfangioinvaze, ale zastoupení FIGO stádií ani objem nádorů se nelišil ve srovnání se skupinou SLN DNA HR HPV negativních (tabulka 2).

Tab. 1: Charakteristika souboru

Věk, roky (medián; kvartily)	45 (38 – 54,5)
FIGO stádium (n; %)	
IA2	4 (8,2%)
IB1	24 (48,9%)
IB2	14 (28,6%)
IIA	6 (12,3%)
IIB	1 (2,0%)
Histotyp (n; %)	
Dlaždicobuněčný karcinom	44 (89,8%)
Adenokarcinom	5 (10,2%)
LVSI (n; %)	19 (38,8%)
SLN (celkový počet; medián na pacienta; kvartily)	109 (2; 2 – 2)
LN (celkový počet; medián na pacienta; kvartily)	2097 (43; 33 – 50,5)
NACT (n; %)	10 (20,4%)
Dispenzarizace, měsíce (medián; kvartily)	16 (8 – 20)

LVSI = lymfovaskulární invaze; SLN = sentinelové lymfatické uzliny; LN = lymfatické uzliny; NACT = neoadjuvantní chemoterapie

Tab. 2: Distribuce prognostických faktorů podle přítomnosti HR HPV DNA v SLN

	HR HPV DNA negativní	HR HPV DNA pozitivní	P-value
Počet případů	28	20	NS
FIGO stádium (n; %)			
IA2	3 (10,7%)	0 (0%)	NS (p<0,07)
IB1	14 (50%)	10 (50%)	NS
IB2	9 (32,1%)	5 (25%)	NS
IIA	2 (7,1%)	4 (20%)	NS
IIB	0 (0%)	1 (5%)	NS
Trend	-	-	p=0,0321
LVSI (n; %)	6 (21,4%)	13 (65%)	NS
NACT (n; %)	6 (21,4%)	4 (20%)	NS
Metastatické postižení LN (n; %)	0	6 (30%)	p<0,05
Objem nádoru (cm ³) (medián; kvartily)	3,754 (0,42385 – 13,025)	4,5695 (0,925 – 16,88)	p=0,300597

LVSI = lymfovaskulární invaze; LN = lymfatické uzliny; NACT = neoadjuvantní chemoterapie

Celkem byla prokázána přítomnost 10 (HPV - 16, 18, 31, 33, 35, 39, 52, 58, 59 a 68) ze 13 testovaných genotypů HR HPV. V souladu s publikovanými daty pro evropskou populaci jsme zaznamenali dominanci genotypu HPV 16 (30/45 – tj. 66,7%) ve tkáni primárního nádoru děložního hrdla. U 6 pacientek (13,3%) byla v tumoru přítomna DNA více než jednoho genotypu HPV. Zastoupení genotypů HPV ve spádových lymfatických uzlinách bylo obdobné jako ve tkáni primárního nádoru s dominancí genotypu HPV 16 (15/21 – tj. 71,4%). U 19 pacientek (90,5%) byla absolutní shoda genotypů v primárním tumoru i všech HPV DNA pozitivních uzlinách. 3 pacientky s vícečetnou HPV infekcí měly odlišné zastoupení genotypů – v 1. případě byla v primárním tumoru prokázána infekce více genotypy (HPV 16, 52), ale v uzlinách byl detekován pouze genotyp HPV 16. Ve 2. případě bylo prokázáno více genotypů HPV v SLN (HPV 16, 31, 39, 59) a v primárním nádoru jen HPV 16 a 31. Ve 3. případě nebyla shoda v žádném genotypu – v primárním tumoru byla DNA HPV 31 a 58 a v SLN HPV 16. V HPV pozitivních uzlinách nebyla zjištěna žádná diskrepance v genotypech HPV (tabulka 3). U žádné z 8 žen s HPV negativním primárním tumorem nebyla nalezena HPV pozitivní lymfatická uzlina.

Tabulka 3: Distribuce genotypů HR HPV u případů s HPV DNA pozitivními lymfatickými uzlinami

Případ	Tumor	SLN		Non – SLN	
	HPV genotypy	HPV genotypy	Meta	HPV genotypy	Meta
1	31, 58	16	-	-	-
2	16, 52	16	-	16	+
3	16	16	-	16	-
4	31	31	-	31	-
5	16	-	-	16	-
6	16	16	+	16	-
7	16	16	+	16	-
8	31	31	-	31	-
9	16, 33, 39	16, 33, 39	-	-	-
10	18	18	+ mic	18	-
11	16, 31	16, 31, 39, 59	-	-	-
12	16	16	-	16	+
13	16	16	-	-	-
14	16	16	+ mic	16	-
15	16, 52	16, 52	-	16, 52	-
16	18	18	-	18	-
17	16	16	-	16	-
18	33	33	-	-	-
19	16	16	-	16	-
20	16	16	-	-	-
21	16	16	-	16	-

Meta = metastatické postižení sentinelových uzlin prokázané histologicky a / nebo imunohistochemicky; +mic = mikrometastáza; + = makrometastáza; SLN = sentinelové lymfatické uzliny

U 6 pacientek (12,2%) bylo prokázáno metastatické postižení spádových lymfatických uzlin. Ve 4 případech byla ve spádové SLN nebo příslušné pánevní uzlině nalezena makrometastáza, ve 2 případech mikrometastáza v SLN potvrzená imunohistochemickým vyšetřením cytokeratinů. Dvě makrometastázy byly nalezeny v SLN, zbylé 2 v non-SLN pánevní uzlině při současné falešné negativitě SLN. Všechny metastaticky postižené

lymfatické uzliny byly HPV DNA pozitivní a ve všech případech byla plná shoda mezi genotypem HPV ve tkáni primárního tumoru i v postižené uzlině. 15 pacientek (30,6%) mělo v lymfatických uzlinách zjištěnu DNA HR HPV bez prokázaného metastatického nebo mikrometastatického postižení.

5. Diskuse

Metastatické postižení pánevních uzlin je důležitý prognostický faktor, který zvyšuje riziko recidivy a podle stádia onemocnění signifikantně snižuje přežití pacientek [Ho, 2004; Lukaszuk, 2007]. I při negativním histopatologickém vyšetření však dojde u relativně vysokého počtu radikálně operovaných žen bez metastatického postižení lymfatických uzlin k recidivě onemocnění v pánvi [Sartori, 2007]. Jedním z možných markerů „okultního“ postižení spádových uzlin je průkaz přítomnosti DNA HR HPV.

Zásadní pro zhodnocení přítomnosti DNA HPV v tumoru i v lymfatických uzlinách je metodika získávání materiálu k PCR analýze. Omezená data přináší literatura o vyšetření z nativních nebo čerstvě zmražených preparátů, ve většině případů bylo vyšetření prováděno retrospektivně z parafinových bločků [Fülle, 2006; Hording, 1995]. Pouze ve třech studiích byla detekce DNA HPV prováděna prospektivně. Ve všech byl prováděn odběr ke stanovení DNA až po operaci [Coutant, 2007; Lee, 2007; Lukaszuk, 2007]. Lukaszuk k vyšetření používal čerstvě zmraženou tkáň, zatímco Lee odesílal jednu polovinu SLN k analýze HPV a druhou polovinu k peroperačnímu histopatologickému vyšetření. V naší studii jsme volili k odběru materiálu ze všech lokalit standardně používanou brush techniku. Odběry jsme prováděli peroperačně z nativních tkání do transportního média. Absence znehodnocení či poškození lymfatických uzlin při odběru umožnila současně optimální peroperační i definitivní histopatologické a imunohistochemické vyšetření. Za významné považujeme možnost vyšetření celé SLN podle mikrostagingového protokolu oproti výše popsané metodice, která umožňovala histopatologické vyšetření pouze její jedné poloviny [Lee, 2007].

Průkaz přítomnosti DNA HR HPV ve tkáni primárního nádoru kolísá v literatuře v širokém rozmezí mezi 40 – 99,7% podle metody detekce, typu vyšetřovaného materiálu i zastoupení žen s nádorovým reziduem ve vyšetřovaném vzorku po předchozí biopsii nebo

konizaci [Clifford, 2003; Lee, 2007; Park, 1996]. DNA minimálně 1 genotypu HR HPV v tumoru jsme v našem souboru prokázali u 45 (91,8%) žen. Vysoký „detection rate“ vypovídá o spolehlivosti používané metodiky odběru a stanovení DNA HPV pomocí cytobrush techniky. V souhlase s publikovanými daty byl i v naší studii genotyp HPV 16 převažujícím nálezem v nádoru i v pánevních uzlinách (66,7% a 71,4%), druhý nejčastější HPV 18 byl detekován u 8 pacientek (17,8%) [Clifford, 2003]. Ostatní genotypy HR HPV byly nalezeny izolovaně jen u 6 případů (13,3%). Častěji byly vzácnější genotypy (HPV 31, 33, 39, 52, 59) součástí koinfekce s HPV 16.

Prevalence HR HPV ve spádovém lymfatickém řečišti je v literatuře uváděna v širokém rozmezí 25 - 80% [Coutant, 2007; Lee, 2007]. Literární data ukazují častější nález HPV DNA v metastaticky postižených lymfatických uzlinách a u časných stádií onemocnění s větším objemem primárního tumoru. Zmiňována je i podmínka průkazu HPV pozitivitu v primárním nádoru pro současnou detekci DNA HPV v uzlinách. Význam ostatních rizikových faktorů pro přítomnost HPV v lymfatických uzlinách nebyl prokázán. V největší prospektivní studii byla detekována DNA HPV v pánevních uzlinách u 69,8% žen a u více než 60% byly uzliny zároveň metastaticky postiženy [Lukaszuk, 2007]. Celkem 80% pacientek mělo HPV v lymfatických uzlinách v jiné recentní studii, ve které převažovala časná stadia onemocnění (IB1 = 50,9%), ale pouze u 19% pacientek byly nalezeny v pánevních uzlinách metastázy [Lee, 2007]. Naopak malý výskyt HPV v uzlinách (25,4%) byl popsán ve studii vyšetřující pouze SLN u kohorty s častým zastoupením stadia II (37,3%) [Coutant, 2007]. V našem souboru jsme pozitivitu DNA HR HPV v lymfatických uzlinách zjistili u 42,9% pacientek. Nižší výskyt ve srovnání s většinou studií si vysvětlujeme zejména častějším zastoupením časných stádií (\leq IB1 = 57,1%) a s tím související nižší frekvencí metastatického postižení spádových lymfatických uzlin (12,2%). Důvodem byla především vysoká přesnost předoperačního stagingového transrektálního ultrazvukového vyšetření, které vykazovalo lepší výsledky i v komparativní studii s využitím magnetické rezonance [Fischerova, 2008].

Velmi frekventní přítomnost HPV v negativních uzlinách je diskutována jako možný marker jejich „okultního“ postižení, které není dosud možné histopatologicky ani imunohistochemicky detekovat. Může být způsobena také imigrací imunitních buněk s HPV částicemi, případně jako důsledek lymfogenního rozsevu volných HPV partikulí. V našem souboru byla HPV DNA prokázána u 30,6% případů s histologicky i imunohistochemicky negativními lymfatickými uzlinami. U všech případů s makrometastatickým i

mikrometastatickým postižením lymfatických uzlin však byla DNA HR HPV přítomna v postižené uzlině.

V naší práci jsme, stejně jako v Lee, zaznamenali ve dvou případech metastatické postižení non-SLN při falešné negativitě SLN na stejné straně pánve. Vyšetření přítomnosti DNA HR HPV v tomto případě prokázalo HPV nejen v metastaticky postižené pánevní uzlině, ale i v SLN bez metastázy. Doplnění biopsie SLN o HPV test přineslo v případě kombinace obou vyšetření 100% pozitivní predikci metastatického postižení lymfatických uzlin.

Deseti pacientkám byla v naší studii podána neoadjuvantní chemoterapie s cílem zlepšení lokálních podmínek pro radikální operační výkon [Sláma, 2007]. U žádné sice nebylo později zjištěno metastatické postižení lymfatických uzlin, avšak pozitivita nebo negativita HPV DNA zůstala srovnatelná bez ohledu na podání neoadjuvantní léčby (21,4% resp. 20%; tabulka 3). Data, která by hodnotila vliv neoadjuvantní léčby na stav pánevních uzlin, v literatuře téměř chybí. Pouze Barranger popisuje srovnatelné výsledky detekce SLN (93,3% a 100%) a histopatologické positivity SLN (2/11 a 3/15) v kohortě pacientek s nebo bez neoadjuvantní chemoradioterapie [Barranger, 2004].

Korelacím genotypů nalezených v nádoru a v lymfatických uzlinách se věnovalo jen málo studií. Fülle, který hodnotil zvláště spinocelulární karcinomy a adenokarcinomy, vyšetřoval distribuci HPV 16, 18 a 33. Shodu v genotypu mezi nádorem a lymfatickými uzlinami našel častěji u HPV 16, ve srovnání s HPV 18 a 33, ale bez signifikantního ovlivnění histotypem primárního nádoru. [Fülle, 2006]. V jiné studii, která vyšetřovala 22 genotypů, byla prokázána rovněž nejvyšší transmise z nádoru do lymfatických uzlin u HPV 16 (78,7%) a o něco nižší u HPV 18 (60%) [Lee, 2007]. V naší práci byl ve 44,4% souhlas minimálně jednoho genotypu detekovaného v primárním nádoru. 100% „transmission rate“ byl u vzácněji diagnostikovaného HPV 33. Nejčastěji zastoupený genotyp HPV 16 přestoupil do pánevních uzlin v 50%. Do metastaticky postižených uzlin dosahovala jeho transmise 16,6%. Průkaz DNA HR HPV v metastaticky nebo mikrometastaticky postižené lymfatické uzlině byla vždy provázen shodou mezi genotypem HR HPV ve tkáni tumoru a postižených lymfatických uzlinách. O významu shody mezi genotypy v jednotlivých lokalitách není v dostupné literatuře žádná informace.

V prezentovaném souboru jsme dosud nezaznamenali žádnou lokální recidivu, žádná z žen zařazených do našeho souboru v průběhu sledování nezemřela. Nemůžeme se proto

vyjádřit k významu HR HPV positivity lymfatických uzlin pro prognózu onemocnění. Lze však předpokládat, že skupina žen s negativitou DNA HR HPV i histopatologického vyšetření spádových lymfatických uzlin by mohla představovat kohortu pacientek s výjimečně dobrou prognózou.

6. Závěry

Naše práce je první prospektivní studií zabývající se korelací DNA HR HPV v SLN a v ostatních (non-SLN) pánevních lymfatických uzlinách u pacientek s časným stádiem karcinomu děložního hrdla. Pro získání materiálu k analýze DNA HR HPV ze všech vyšetřovaných lokalit jsme využívali peroperační metodu odběru pomocí cytobrush techniky do transportního média. Její použití je ve srovnání s dosud popisovanými postupy odběrů minimálně stejně citlivé, ale technicky jednodušší. Navíc nevede ke ztrátě žádného materiálu pro histopatologické a imunohistochemické vyšetření.

V lymfatických uzlinách s makrometastatickým nebo mikrometastatickým postižením jsme ve 100% detekovali DNA HR HPV. Průkaz DNA HR HPV v SLN vykazoval 100% pozitivní predikci pro metastatické postižení pánevních uzlin. Zároveň byla v těchto případech shoda mezi alespoň jedním genotypem HR HPV v primárním tumoru, SLN i všech (SLN i non-SLN) metastaticky postižených uzlinách.

HPV 16 byl nejčastěji zastoupený genotyp ve tkáni primárního tumoru i v lymfatických uzlinách. Jeho „transmission rate“ z nádoru dosahoval 50% bez ohledu na histopatologický stav uzlin a 16,6% při jejich současném metastatickém postižení.

Stanovení DNA HR HPV ve spádových lymfatických uzlinách by mohlo být dalším významným prognostickým faktorem, zejména u časných stádií onemocnění s histologicky a imunohistochemicky negativními uzlinami. Význam vyšetření HPV v pánevních lymfatických uzlinách, stejně jako využití dalších prognostických faktorů narůstá spolu s narůstající přesností předoperačních stagingových vyšetření, zejména transrektálního ultrazvuku.

K vyhodnocení významu DNA HPV positivity ve spádových lymfatických uzlinách a

významu konkrétních genotypů HPV pro prognózu však bude nutná nejen standardizace techniky vyšetření, ale i delší období sledování radikálně operovaných žen.

Použitá literatura

1. Baay MF, Koudstaal J, Hollema H, Duk JM, Burger MP, Quint WG, et al. Detection of HPV-16 DNA by PCR in histologically cancer free lymph nodes from patients with cervical cancer. *J Clin Pathol* 1997; 50: 960–961.
2. Barranger E, Cortez A, Commo F, Marpeau O, Uzan S, Darai E, et al. Histopathological validation of the sentinel node concept in cervical cancer. *Ann Oncol* 2004; 15: 870–874.
3. Benedet JL, Bender H, Jones H III., Ngan HYS, Pecorelli S. FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers. *Int J Gynaecol Obstet.* 2000; 70: 209-262.
4. Burnett AF, Barnes WA, Johnson JC, Grendys E, Willet GD, Barter JF, Doniger J. Prognostic significance of polymerase chain reaction detected human papillomavirus of tumors and lymph nodes in surgically treated stage IB cervical cancer. *Gynecol Oncol* 1992; 47:343-7.
5. Cibula D, Slama J, Fischerova D. Update on radical trachelectomy. *Gynecol Oncol* 2008 Nov;111(2 Suppl):S111-5.
6. Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Munoz N, Franceschi S. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2003; 88: 63–73.
7. Coutant C, Barranger E, Cortez A, Dabit D, Uzan S, Bernaudin JF, Darai E. Frequency and prognostic significance of HPV DNA in sentinel lymph nodes of patients with cervical cancer. *Ann Oncol* 2007; 18: 1513-1517.
8. Czegledy J, Josif C, Hanson BG, Evander M, Gergely L, Wadell G. Can a test for E6/E7 transcripts of human papillomavirus type 16 serve as a diagnostic tool for the detection of micrometastasis in cervical cancer? *Int J Cancer* 1995; 64: 211–215.
9. Fischerova D, Cibula D, Stenhova H, Vondrichova H, Calda P, Zikan M, Freitag P, Slama J, Dunder P, Belacek J. Transrectal ultrasound and magnetic resonance imaging in staging of early cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2007 Jul-Aug 24;18(4):766-72.
10. Fuchs PG, Girardi F, Pfister H. Human papillomavirus 16 DNA in cervical cancers and in lymph nodes of cervical cancer patients: a diagnostic marker for early metastases? *Int J Cancer* 1989; 43: 41-4.

11. Fülle T, Csapo Z, Mathe M, et al. Prognostic significance of high-risk HPV status in advanced cervical cancers and pelvic lymph nodes. *Gynecol Oncol* 2006; 100: 570–578.
12. Garzetti G, Ciavattini A, Lucarini G, Goteri G, Menso S, De Nictolis M, Romanini C, Biagini G. The role of human papillomavirus DNAs in cervical carcinoma and risk of lymph node metastasis. Association with 72-kilodalton metalloproteinase immunostaining. *Cancer*, 1998;82: 886-892.
13. Hernádi Z, Szarka K, Sapy T, Krasznai Z, Veress G, Poka R. The prognostic significance of HPV-16 genome status of the lymph nodes, the integration status and p53 genotype in HPV-16 positive cervical cancer: a long term follow up. *BJOG* 2003; 110: 205–209.
14. Ho CM, Chien TY, Huang SH, Wu CJ, Shih BY, Chang SC. Multivariate analysis of the prognostic factors and outcomes in early cervical cancer patients undergoing radical hysterectomy. *Gynecol Oncol* 2004; 93: 458 – 464.
15. Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med* 1995; 1: 149-153.
16. Hording U, Ravn V, Knudsen J, Visfeld J. The use of polymerase chain reaction to detect metastatic cancer cells within lymph nodes in stage I cervical carcinoma. *Int J Gynecol Pathol* 1995; 14: 339–343.
17. Chan PK, Yu MM, Cheung TH, To KF, Lo KW, et al. Detection and quantitation of human papillomavirus DNA in primary tumour and lymph nodes of patients with early stage cervical carcinoma. *J Clin Virol* 2005; 33: 201–205.
18. Ikenberg H, Teufel G, Schmitt B, Kommoss F, Stanimirovic B, Pfeleiderer A. Human papillomavirus DNA in distant metastases of cervical cancer. *Gynecol Oncol*, 1993; 48: 56–60.
19. Im SS, Wilczynski SP, Burger RA, Monk BJ. Early stage cervical cancers containing human papillomavirus type 18 DNA have more nodal metastasis and deeper stromal invasion. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 4145–4150.
20. Kobayashi Y, Yoshinouchi Y, Tianqi M, Nakamura G, Hongo K, Kamimura A, et al. Presence of human papilloma virus DNA in pelvic lymph nodes can predict unexpected recurrence of cervical cancer in patients with histologically negative lymph nodes. *Clin Cancer Res* 1998; 4: 979–983.

21. Kónya J, Veress G, Hernádi Z, Soós G, Czeglédy J, Gergely L. Correlation of human papillomavirus 16 and 18 with prognostic factors in invasive cervical neoplasias. *J Med Virol* 1995; 46: 1-6.
22. Lancaster WD, Castellano C, Santos C, Delgado G, Kurman RJ, Jenson AB. Human papillomavirus deoxyribonucleic acid in cervical carcinoma from primary and metastatic sites. *Am J Obstet Gynecol* 1986; 154: 115-119.
23. Lee YS, Rhim CC, Lee HN, Lee KH, Park JS, Namkoong SE. HPV status in sentinel nodes might be a prognostic factor in cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2007; 105: 351-7.
24. Lin YS, Tzeng CC, Huang KF, Kang CY, Chia CC, Hsieh JF. Sentinel node detection with radiocolloid lymphatic mapping in early invasive cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2005; 15: 273–277.
25. Lukaszuk K, Liss J, Gulczynski J, Nowaczyk M, Nakonieczny M, Piatkowski M, Sliwinski W, Baay M, Wozniak I, Maj B, Lukaszuk M. Predictive value of HPV DNA in lymph nodes in surgically treated cervical carcinoma patients - a prospective study. *Gynecol Oncol* 2007; 104: 721-6.
26. Lukaszuk K, Liss J, Wozniak I, Sliwinski W, Emerich J, Wojcikowski C. HPV and histological status of pelvic lymph node metastases in cervical cancer: a prospective study. *J Clin Pathol* 2004; 57: 472–476.
27. Park JS, Rhyu KS, Kim CJ, Kim HS, Han KT, Ahn HK, et al. Presence of oncogenic HPV DNAs in cervical carcinoma tissues and pelvic lymph nodes associating with proliferating cell nuclear antigen expression. *Gynecol Oncol* 1996; 60: 418–423.
28. Pilch H, Gunzel S, Schaffer U, et al. Human papillomavirus (HPV) DNA in primary cervical cancer and in cancer free pelvic lymph nodes - Correlation with clinico-pathological parameters and prognostic significance. *Zentralbl Gynacol* 2001; 123: 91–101.
29. Póka R, Czeglédy J. HPV- and node status in cervical cancer long-term status. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1997; 71: 169-172.
30. Sapy T, Hernandi Z, Konya Y, Lukacsko L. Poor clinical outcome in early stage cervical cancer with human papillomavirus -18 positive lymph nodes. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000; 90: 93–95.
31. Sartori E, Tisi G, Chiudinelli F, La Face B, Franzini R, Pecorelli S. Early stage cervical cancer: adjuvant treatment in negative lymph node cases. *Gynecol Oncol* 2007; 107(Suppl 1): 170-174.

32. Sláma J. Papilomarové infekce v gynekologii. *Modern Gynekol Porod.* 2006;15:397-402.
33. Sláma J, Cibula D, Freitag P, Fischerová D, Janoušek M, Pavlišta D, Strunová M, Zikán M, Jančárková N. Přínos neoadjuvantní chemoterapie pro operabilitu zhoubných nádorů děložního hrdla. *Čes Gynekol.* 2007 Apr;72(2):116-9.
34. Sláma J, Draždáková M, Fischerová D, Svárovský J et al. Detekce DNA HPV u časných stádií karcinomu děložního hrdla. *Čes Gynekol* 2008 Jul;73(4):217-21.
35. Slama J, Draždakova M, Dundr P, Fischerova D, Zikan M, Pinkavova I, Freitag P, Pavlista D, Zima T, Cibula D. High-risk human papillomavirus DNA in the primary tumor, sentinel, and nonsentinel pelvic lymph nodes in patients with early –stage cervical cancer: a correlation with histopathology. *Int J Gynecol Cancer* 2009;in print.

Seznam publikací

1. Publikace se vztahem k disertační práci

- 1.1. Cibula D, Slama J, Fischerova D. Update on radical trachelectomy. *Gynecol Oncol* 2008 Nov;111(2 Suppl):S111-5. ISSN: 0090 – 8258, IF – 2,614
- 1.2. Fischerova D, Cibula D, Stenhova H, Vondrichova H, Calda P, Zikan M, Freitag P, Slama J, Dundr P, Belacek J. Transrectal ultrasound and magnetic resonance imaging in staging of early cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2007 Jul-Aug 24;18(4):766-72. ISSN: 1048 – 891X, IF – 1,469
- 1.3. Sláma J. Papilomarové infekce v gynekologii. *Modern Gynekol Porod.* 2006;15:397-402.
- 1.4. Sláma J, Cibula D, Freitag P, Fischerová D, Janoušek M, Pavlišta D, Strunová M, Zikán M, Jančárková N. Přínos neoadjuvantní chemoterapie pro operabilitu zhoubných nádorů děložního hrdla. *Čes Gynekol.* 2007 Apr;72(2):116-9.
- 1.5. Slama J, Draždakova M, Dundr P, Fischerova D, Zikan M, Pinkavova I, Freitag P, Pavlista D, Zima T, Cibula D. High-risk human papillomavirus DNA in the primary tumor, sentinel, and nonsentinel pelvic lymph nodes in patients with early –stage cervical cancer: a correlation with histopathology. *Int J Gynecol Cancer* 2009;in print. ISSN: 1048 – 891X, IF – 1,469
- 1.6. Sláma J, Draždáková M, Fischerová D, Svárovský J et al. Detekce DNA HPV u časných stádií karcinomu děložního hrdla. *Čes Gynekol* 2008 Jul;73(4):217-21.

2. Publikace bez vztahu k disertační práci

- 2.1. Fischerova D, Cibula D, Dundr P, Zikan M, Calda P, Freitag P, Slama J. Ultrasound-guided tru-cut biopsy in the management of advanced abdomino-pelvic tumors. *Int J Gynecol Cancer*. 2007 Jul-Aug 24;18(4):833-7.
- 2.2. Sláma J. Prekancerózy v gynekologii. *Onkogynekologie*. Grada, Praha 2009.
- 2.3. Sláma J. Staging. *Onkogynekologie*. Grada, Praha, 2009
- 2.4. Sláma J. Gynekologie. In *Breviř gynekologie, porodnictví a urologie*. Medical Tribune, 2008.
- 2.5. Sláma J, Freitag P, Cibula D, Fischerová D, Janoušek M, Pavlišta D, Strunová M, Zikán M, Jančárková N. Adenoprekancerózy děložního hrdla. *Čes Gynekol*. 2006 Dec;71(6):446-50.
- 2.6. Sláma J, Šoltés M. Standardní versus "hand-pump" vakuumextrakční přístroj. *Čes Gynekol*. 2004 Nov;69(6):440-3.
- 2.7. Sláma J. Kondylomata accuminata ženského genitálu. *Modern Gynekol Porod*. 2005;14:231-237.
- 2.8. Sláma J. Projevy syfilis na zevních rodidlech žen. *Modern Gynekol Porod*. 2005;14:259-263.
- 2.9. Sláma J, Freitag P. Vakcíny proti lidským papilomavirům. *Prakt Gynekol* 2007;1:30-2.
- 2.10. Sláma J. Papilomarové infekce v gynekologii. *Modern Gynekol Porod*. 2006;15:397-402.
- 2.11. Sláma J. Prekancerózy v gynekologii. *Modern Gynekol Porod* 2007;16:462-487.
- 2.12. Sláma J. Cervarix – klinický přehled. *Modern Gynekol Porod*. 2007; 16(suppl.):795-804.
- 2.13. Sláma J. Bivalentní vakcína proti lidským papilomavirům. *Remedia*. 2007;17:464-9.
- 2.14. Sláma J. Cervarix – další krok k prevenci karcinomu děložního hrdla. *Lékařské listy*. 2007; 21: 10-12.
- 2.15. Sláma J. Očkování proti HPV. *Klin Farmakol Farm*. 2008;22:153-5.
- 2.16. Cibula D, Freitag P, Mareš P, Svárovský J, Janoušek M, Fischerová D, Sláma J, Strunová M, Zikán M, Jančárková N. Radikální parametrektomie u žen s invazivním nádorem děložního hrdla po předchozí prosté hysterektomii. *Čes. Gynekol*. 2006 Mar;71(2):122-6.
- 2.17. Cibula D, Freitag P, Fischerová D, Jančárková N, Sláma J, Živný J. Možnosti snížení radikality u pánevních exenterací. *Čes. Gynekol*. 2005 Jan;70(1):50-2.
- 2.18. Pařízek A, Sláma J, Zikán M, Koucký M. *Pharmindex breviř - Gynekologie a porodnictví*. Medical Tribune, Praha 2006.
- 2.19. Pavlišta D, Tesařová P, Janoušek M, Strunová M, Zikán M, Sláma J, Fischerová D, Cibula D. Ductal approaches in mammary diagnostics. *Čes Gynekol*. 2007 May;72(3):213-5.
- 2.20. Zikán M, Pohlerich P, Freitag P, Janoušek M, Pavlišta D, Fischerová D, Jančárková N, Sláma J, Pinkavová I, Cibula D. Inaktivace genů BRCA 1, BRCA 2 and p53 u sporadickém karcinomu ovaria. *Čes Gynekol*. 2008 Oct;73: 298-302.

2.21. Freitag P, Sláma J. Adenocarcinoma in situ děložního hrdla – rozbor 10 případů. Prakt Gynekol. 2009;2: 76-78.