

UNIVERZITA KARLOVA PRAHA

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

DISERTAČNÍ PRÁCE

MUDr. Jiří Sláma

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

Praha 2009

UNIVERZITA KARLOVA PRAHA

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

DISERTAČNÍ PRÁCE

MUDr. Jiří Sláma

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

OBOROVÁ RADA: Experimentální chirurgie

ŠKOLITEL: MUDr. Pavel Dundr, Ph.D.

Praha 2009

CHARLES UNIVERSITY PRAGUE
1st MEDICAL SCHOOL

DISSERTATION THESIS

Jiří Sláma, MD

Significance of detection of human papillomaviruses in
draining lymph nodes in cervical cancer patients

WORK SUPERVISOR: Pavel Dunder, MD, Ph.D.

Prague 2009

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že předložená disertační práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně. Veškerou literaturu a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, v práci řádně cituji a jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

V Praze dne 30.4.2009

MUDr. Jiří Sláma

PODĚKOVÁNÍ

Veliké díky zaslouží moji školitelé a všichni spolupracovníci, kteří se na podíleli na realizaci projektu:

MUDr. Pavel Dundr, Ph.D.,

Prof. MUDr. David Cibula, CSc.,

RNDr. Marcela Draždáková,

Prof. MUDr. Tomáš Zima, DrSc., M.B.A.,

MUDr. Daniela Fischerová, Ph.D.,

MUDr. Michal Zikán, Ph.D.,

MUDr. Jiří Svárovský,

MUDr. Ivana Pinkavová,

Doc. MUDr. Pavel Freitag, CSc.,

MUDr. Miloslav Janoušek,

a MUDr. David Pavlišta, Ph.D.

Nezměrný dík patří mé rodině za podporu a trpělivost.

ANOTACE

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 zisku 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.

Souhrn: 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.

ANNOTATION

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.

Conclusion: 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

OBSAH

ÚVOD.....	8
SHRNUTÍ PROBLEMATIKY	
1. Prevalence HPV v lymfatických uzlinách.....	9
2. Metodika studií.....	13
3. Prognostický význam HPV v lymfatických uzlinách.....	15
4. Souhrn publikovaných dat.....	19
VLASTNÍ PRÁCE	
5. Cíle a hypotézy výzkumu.....	23
6. Metodika.....	24
6.1 Charakteristika souboru.....	24
6.2 Sběr materiálu k vyšetření.....	24
6.3 Amplicor HPV test.....	25
6.4 Histopatologické a imunohistochemické vyšetření	25
6.5 Statistická analýza.....	26
7. Výsledky.....	27
8. Diskuse.....	31
ZÁVĚR.....	34
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	35
SEZNAM PŘÍLOH.....	39

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.

Poprvé popsal přítomnost genomu HPV v metastaticky postižené uzlině Lancaster, od té doby byla publikována řada prací, většinou retrospektivních, které se lišily zastoupením stádií onemocnění, počtem pacientek, počtem detekovaných genotypů HPV, zastoupením metastaticky postižených a HPV pozitivních uzlin [Lancaster, 1986]. Cílem teoretické části práce je podat přehled současných znalostí o prevalenci a významu přítomnosti HPV v lymfatických uzlinách.

SHRNUTÍ PROBLEMATIKY

1. Prevalence HPV v lymfatických uzlinách

Prevalence HPV DNA ve spádových lymfatických uzlinách u pacientek s karcinomem děložního hrdla je v literatuře uváděna v širokém rozmezí 25 – 80% [Coutant, 2007; Lee, 2007]. Pozitivita je závislá na řadě faktorů, zejména způsobu získávání materiálu k analýze, metodice detekce, selekci kohorty pacientek a výsledku histopatologického vyšetření lymfatických uzlin. Většina prací prokazuje, že metastatické postižení pánevních uzlin je provázeno jejich současnou HPV pozitivitou. Práce, které tuto asociaci neprokazovaly, vykazovaly nepřesnosti v metodice a zahrnovaly malý počet pacientek.

Hernádi, který vyšetřoval 39 pacientek s HPV 16 pozitivními nádory, prokázal ve 100% DNA HPV 16 v metastaticky postižených lymfatických uzlinách, naproti tomu v nepostižených uzlinách detekoval DNA HPV 16 jen ve 35,7% ($p = 0,001$) [Hernádi, 2003]. Největší prospektivní studie, která zjistila velmi častou přítomnost HPV v pánevních lymfatických uzlinách (69,8%), zahrnovala 40% pacientek ve stádiu II s velmi častým nálezem (více než 60%) jejich metastatického postižení [Lukaszuk, 2007]. V jiné recentní studii, ve které převažovala časná stádia (IB1 = 50,9%), mělo dokonce 80% pacientek (44 / 55) prokázánu DNA HPV v lymfatických uzlinách. Metastázy v pánevních uzlinách byly nalezeny u 19% pacientek a pozitivní lymfatické uzliny ve 100% obsahovaly DNA HPV [Lee, 2007].

Některé starší studie souhlas mezi nálezem DNA HPV a metastatickým postižením LN nepotvrdily. V malém souboru s časnými stádii onemocnění (24 pacientek = IB) byla HPV DNA prokázána pouze u 2 ze 4 pacientek s histologicky pozitivními uzlinami [Hording, 1995]. Jiným příkladem může být práce Baaye, který však ve svém souboru analyzoval u 35 pacientek s HPV 16 pozitivním primárním tumorem vždy jen jednu uzlinu z levé obturatorní fosy. U 19 pacientek byla zjištěna DNA HPV v histopatologicky negativních uzlinách, z toho u 7 případů byly zároveň

prokázány metastázy v jiných uzlinách. Na druhou stranu 8 pacientek s metastázou nemělo ve vyšetřované uzlině DNA HPV [Baay, 1997]. Velké rozdíly v detekci HPV v lymfatických uzlinách, včetně absence HPV DNA v pozitivních uzlinách, jsou pravděpodobně způsobeny rozdíly a nepřesnostmi v metodice. Té se věnuje samostatná kapitola.

Omezená data jsou publikována o nálezu HPV DNA v sentinelových lymfatických uzlinách (SLN). Pravděpodobným důvodem je, že vyšetření SLN není dosud součástí standardního managementu časných stádií karcinomu děložního hrdla. Stratifikace na SLN a ostatní pánevní uzliny může u časných stádií onemocnění zvýšit validitu vyšetření, neboť peroperační odběr k analýze HPV DNA je jinak možný pouze z makroskopicky patrných uzlin. Pouze dvě studie zohlednily rozdělení spádových uzlin na SLN a ostatní lymfatické uzliny, všechny další publikace hovoří souhrnně o pánevních uzlinách [Coutant, 2007; Lee, 2007]. Obě studie také potvrzují vyšší prevalenci HPV DNA v metastaticky postižených SLN. Lee dokonce prokázal, že využití detekce HPV vedlo ke zvýšení senzitivity biopsie SLN. Při histopatologické pozitivitě non-SLN pánevních uzlin byla v takových případech nalezena HPV DNA i u falešně negativních SLN [Lee, 2007].

Malý výskyt HPV u 25,4% pacientek (15 / 59) popsál Coutant, který vyšetřoval pouze SLN v souboru s častým zastoupením stádia II (37,3%). Přesto zaznamenal signifikantně vyšší prevalenci HPV DNA v histopatologicky pozitivních SLN než v negativních SLN ($p < 0,0001$). Frekvence HPV positivity v SLN se navíc neodlišovala v závislosti na nálezu makrometastázy, mikrometastázy nebo izolovaných nádorových buněk [Coutant, 2007]. V jiné práci hodnotil Lee výsledky peroperačního histopatologického vyšetření a současné detekce DNA HPV u celkem 79 SLN získaných od 57 pacientek. HPV DNA byla zjištěna v 77,2% SLN, pouze v 10 případech (17,6%) byla diagnostikována v SLN metastáza. DNA HR HPV byla přítomna u všech metastaticky postižených lymfatických uzlin, včetně případu s falešně negativním výsledkem peroperačního vyšetření SLN, u kterého však byl HPV test pozitivní nejen v metastaticky postižené non – SLN pánevní uzlině, ale i v SLN bez metastázy. Doplnění peroperačního vyšetření SLN o detekci HPV DNA dávalo při kombinaci negativity obou vyšetření 100% negativní predikci metastatického postižení všech spádových uzlin [Lee, 2007].

Dostupná data překvapivě ukazují na častější průkaz DNA HPV v lymfatických uzlinách u časných stádií onemocnění. V některých publikacích je HPV pozitivita lymfatických uzlin spojena navíc i s větším objemem nádoru a s průkazem HPV DNA v nádoru. Výsledky hodnocení dalších rizikových faktorů (věk pacientky, histologický typ nádoru, grade nádoru, hloubka stromální invaze, šíření na pochvu, invaze do parametrií a lymfovaskulární invaze) nebyly pro predikci HPV DNA positivity v lymfatických uzlinách podle většiny autorů signifikantní.

Retrospektivní práce zahrnující 63% (94/150) pacientek v pokročilých stádiích IIA – IIIB prokazovala DNA HPV v lymfatických uzlinách u 44,1% časných a 38% pokročilých karcinomů ($p = 0,042$). Příčinou je pravděpodobně méně častá přítomnost HPV DNA v pokročilém nádoru, která klesá díky kumulaci genetických aberací a narůstajícímu počtu buněčných klonů nezávislých na proliferativním působení onkoproteinů HPV [Fülle, 2006]. Přítomnost HPV DNA v primárním tumoru je některými autory považována za důležitou podmínku pro současnou pozitivitu HPV v lymfatických uzlinách. Průkaz HPV v tumoru je významně spojen nejen s HPV pozitivitou spádových uzlin ($p = 0.039$), ale také s predikcí jejich metastatického postižení ($p = 0.019$) [Cavuslu, 1997]. Identické závěry přináší i největší prospektivní studie, kde nebyl zaznamenán žádný případ HPV negativního tumoru s HPV pozitivními uzlinami. HPV DNA byla v lymfatických uzlinách detekována u 67 (82,8%) pacientek v časných stádiích a pouze u 14 (70%) pacientek s pokročilým nádorem invadujícím do parametria. Významným prediktivním faktorem pro přítomnost HPV v lymfatických uzlinách byl také objem primárního nádoru. HPV DNA byla zjištěna v uzlinách u 60 (74%) pacientek s objemem nádoru $> 2 \text{ cm}^3$ oproti 21 (26%) pacientkám s menším objemem [Lukaszuk, 2007].

Přestože je ve většině prací prokazována úzká souvislost mezi současnou detekcí DNA HPV a metastatickým postižením, je vždy popisováno 5,6 – 61,8% metastaticky negativních, ale HPV DNA pozitivních uzlin [Lukaszuk, 2004]. Důvod vysoké prevalence HPV DNA v metastaticky nepostižených lymfatických uzlinách zůstává dosud nejasný. Zmiňována je možná heterogenita jejího původu [Fülle, 2006; Lukaszuk, 2007]. Část by mohla představovat klinicky významnou skupinu dosud histopatologicky ani imunohistochemicky nepoznaného mikrometastatického postižení,

část velmi pravděpodobně pochází z desintegrovaných buněk nádoru pasivně zanesených lymfou nebo aktivně transportovaných prostřednictvím imunokompetentních fagocytických buněk. Volné HPV částice mohou být navíc fagocytovány i buňkami endotelu [Fülle, 2006]. Častější nález HPV v lymfatických uzlinách zaznamenaný u pacientek s HPV pozitivními tumory by mohl souviset také s celkovou vyšší virovou náloží v primárním nádoru [Garzetti, 1998; Chan, 2005].

Velmi malá pozornost byla dosud věnována korelaci jednotlivých genotypů HR HPV nalezených v lymfatických uzlinách s genotypy primárního nádoru. Ve většině publikovaných studií byla hodnocena pouze přítomnost DNA nejčastějších onkogenních genotypů HPV 16 a případně i HPV 18. Při hodnocení většího počtu genotypů představovaly ostatní HPV minoritní podíl. Navíc i v případech koinfekce více genotypy vykazovaly HPV 16 a 18 nejvyšší procento přestupu („transmission rate“) z primárního nádoru do spádových lymfatických uzlin.

Lee, který vyšetřoval dokonce 22 genotypů (14 HR HPV genotypů a 8 LR HPV genotypů), hodnotil HPV v SLN jen u HPV pozitivních nádorů. Nejvyšší shodu našel u HPV 16 (78,7%) a o něco nižší u HPV 18 (60%). V souboru popisoval ve 42% koinfekci více genotypy. Jiné genotypy než HPV 16 a 18 však vykazovaly velmi nízký „transmission rate“ do spádových lymfatických uzlin [Lee, 2007]. Fülle hodnotil zvláště spinocelulární karcinomy a adenokarcinomy. U obou skupin vyšetřoval tři nejčastější HR genotypy HPV 16, 18 a 33. Shodu v genotypu mezi nádorem a lymfatickými uzlinami našel častěji u HPV 16 (33,7% u spinocelulárních karcinomů a 28,9% u adenokarcinomů), ve srovnání s HPV 18 (7,4 % u spinocelulárních karcinomů a 7,8% u adenokarcinomů) a HPV 33 (5,9% u spinocelulárních karcinomů a 0% u adenokarcinomů). HPV 16 vykazoval nejvyšší „transmission rate“ i v případech koinfekce dvěma nebo všemi třemi hodnocenými genotypy. Paradoxně však uvádí, že některé HPV pozitivní uzliny obsahovaly více genotypů než primární tumor, zároveň uvádí 16% (24/150) případů HPV negativních primárních tumorů s HPV DNA pozitivními lymfatickými uzlinami [Fülle, 2006].

Z publikovaných dat lze předpokládat, že transmise HPV DNA z primárního nádoru do spádových lymfatických uzlin vykazuje analogii s transmisí do vzdálených metastáz, protože u HPV pozitivních tumorů se metastázy obvykle manifestují stejným genotypem a identickým integračním vzorem jako primární nádor [Czeglédy, 1995;

Fuchs, 1989; Ikenberg, 1993]. Přítomnost DNA HPV v lymfatických uzlinách u HPV negativních tumorů je nejasná, může souviset s autonomií proliferativního růstu tumoru bez závislosti na HPV, ale může být vysvětlena i chybou v metodice vyšetření.

2. Metodika studií

Jedním z významných rozdílů publikovaných studií je způsob získávání a zpracování vyšetřovaného materiálu. Pouze dva autoři pracovali se soubory prospektivně, ostatní využívali více či méně selektovaných kohort z různě dlouhého retrospektivního období.

Metodika detekce je založena na extrakci a amplifikaci virové DNA z části tkáně. Amplifikována a následně identifikována je oblast onkogenů E6, E7 a/nebo hlavního kapsidového genu L1. Ve dvou publikacích byla použita ke zjištění HPV v lymfatických uzlinách detekce mRNA HPV, kterou je možno prokázat jen ve vitálních buňkách. Podle autorů by mohla nabízet vyšší specifitu závěrů než DNA HPV, kterou lze detekovat i v sekvestrovaných buňkách volně zanesených do spádových uzlin.

V retrospektivních souborech jsou k vyšetření využívány parafínové bločky. Parafín je obvykle odstraněn promytím v xylenu a 96% etanolu, ale k izolaci DNA je použit vždy jen omezený počet plátků (nejčastěji 2 – 5) z jednotlivých tkáňových řezů, zároveň je takto vyšetřen jen omezený počet uzlin. Pouze jednu uzlinu od každé pacientky vyšetřoval Baay, obdobně i Czeglédy limitoval svá vyšetření u každého z 31 případů pouze na 3 až 8 uzlin [Baay, 1997; Czeglédy, 1995]. V další práci sice byly vyšetřeny uzliny ze 3 standardních lokalit (externí a společné ilické cévy a obturatorní fosa), ale bylo hodnoceno vždy jen 6 uzlin od každé pacientky [Fülle, 2006]. Senzitivita ani reprodukovatelnost výsledků vyšetření HPV DNA z parafínových bloček dosud nebyla prospektivně ověřena. Podle Lukaszuka, který vychází z vlastních dlouholetých zkušeností s technikou vyšetření z parafínových bloček i z nativních tkání, je signifikantně vyšší citlivost dosažena při vyšetření z nativních nebo čerstvě zmražených

tkání [Lukaszuk, 2007]. Přesto dosud nebyla doložena žádná komparativní studie, která by prokazovala vyšší senzitivitu vyšetření z nativních tkání.

Velké rozdíly existují i v popsané technice odběru materiálu k molekulárně genetické analýze, která byla v prospektivních studiích podrobně popsána pouze v jediné studii. Lukaszuk z každého odebraného a zmrazeného vzorku tkáně oddělil část o velikosti $25,0 \text{ mg} \pm 5,5 \text{ mg}$ a ponechal ji přes noc při stabilní teplotě $50 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubovat s proteinázou K. Extrahovaná DNA byla posléze amplifikována pomocí PCR. Všechna vyšetření počínaje izolací DNA prováděl vždy opakovaně v odstupu minimálně dvou týdnů a za pozitivní považoval teprve souhlasné závěry. Zamezení iatrogenní kontaminace je považováno ve všech případech za nezbytnou součást manipulace s materiálem [Lukaszuk, 2007].

Kromě dominance retrospektivních prací využívajících parafínových bločků mají studie i další limitace. Problémem metodiky prospektivních studií je výše uvedená vysoká náročnost na dodržení všech součástí protokolu (izolace, amplifikace a detekce DNA HPV), zvláště při nutnosti opakovaného potvrzení positivity testované tkáně, a nebo ztráta podstatné části vyšetřovaného materiálu. Lee identifikované SLN peroperačně půlil, jednu polovinu analyzoval na přítomnost DNA HPV, druhá polovina byla určena k histopatologickému vyšetření. Důsledkem byla ztráta poloviny materiálu pro každou z obou z vyšetřovacích metod [Lee, 2007]. Další pravděpodobná příčina odlišných výsledků může být podmíněna absencí standardizovaného protokolu molekulárně genetického vyšetření HPV DNA v lymfatických uzlinách [Pilch, 2001].

3. Prognostický význam HPV v lymfatických uzlinách

Nejvíce diskutovanou problematikou je význam průkazu HPV DNA v pánevních lymfatických uzlinách pro prognózu onemocnění. Klinický význam přítomnosti HR HPV DNA v negativních uzlinách zůstává nadále nejasný. V některých studiích představovala faktor predikující současné metastatické postižení jiných lymfatických uzlin. Naopak histopatologická i HPV DNA negativita spádových uzlin byla považována za prognosticky příznivou variantu. Pro definitivní hodnocení však byly dosud publikované soubory limitovány počty pacientek a většinou i krátkým obdobím sledování.

V největší prospektivní studii představovala skupina pacientek s HPV v lymfatických uzlinách kohortu s významně horší prognózou. Soubor 116 radikálně operovaných pacientek byl rozdělen na tři skupiny: pacientky s HPV pozitivními a metastaticky postiženými uzlinami, pacientky bez metastatického postižení, ale s HPV pozitivními uzlinami a pacientky bez metastatického postižení a bez přítomnosti HPV v lymfatických uzlinách. Průměrná délka sledování ve skupině HPV negativních uzlin byla 54,8 měsíců a v obou skupinách HPV pozitivních uzlin 39,2 měsíců. Zatímco ve skupině HPV negativních lymfatických uzlin bylo zaznamenáno 9 (25,7%) úmrtí, ve skupinách s HPV pozitivními uzlinami bylo dokonce 49 (60,5%) úmrtí. Při podrobnějším hodnocení skupiny s HPV pozitivními uzlinami nebyl zjištěn rozdíl ($p = 0,06$) mezi přežitím v závislosti na přítomnosti metastatického postižení lymfatických uzlin. Skupina s histopatologickou i HPV DNA negativitou spádových uzlin vykazovala signifikantně lepší přežití ($p < 0,001$) oproti skupinám s HPV DNA pozitivitou. Relativní riziko mortality stanovené pro přítomnost HPV DNA ve spádových

lymfatických uzlinách dosahovalo 2,31, samostatné metastatické postižení uzlin však pouze 1,23 [Lukaszuk, 2007].

Hernádi u 39 pacientek s pozitivitou HPV 16 v lymfatických uzlinách zjistil čtyřikrát častěji recidivu onemocnění než u pacientek s HPV negativními uzlinami (42,9% vs. 11,1%, $p = 0,0009$) [Hernádi, 2003]. Obdobné výsledky prezentovaly i největší retrospektivní studie. Ze souboru 236 pacientek ve stádiu IB – II byly vybrány pouze HPV 16 a/nebo HPV 18 pozitivní tumory, u kterých byla analyzována klinická data za období čtyřletého sledování po radikální operaci. Recidiva onemocnění byla zjištěna za 5 – 42 měsíců u 10 pacientek s histopatologicky negativními uzlinami, u všech kromě 1 byla zároveň prokázána přítomnost HPV DNA v lymfatických uzlinách. Průkaz HPV ve spádových uzlinách byl statisticky významným rizikovým faktorem pro recidivu onemocnění ($p = 0,0004$) [Kobayashi, 1998]. V jiném velkém souboru zahrnujícím 204 pacientek s velmi dlouhým obdobím sledování (průměrně 4,4 roku) byla DNA HPV v nepostižených uzlinách zjištěna jen u pacientek, u kterých byla v jiných uzlinách prokázána metastáza. Přítomnost DNA HPV v lymfatických uzlinách představovala významný rizikový faktor současného metastatického postižení ($RR = 3,1$, $p < 0,0001$) a byla i signifikantní predikcí recidivy onemocnění [Pilch, 2001]. Park hodnotil recidivy onemocnění u 79 pacientek za období tříletého sledování. Ve skupině pacientek s metastaticky postiženými lymfatickými uzlinami zaznamenal v 64,5% (20 / 31) zároveň HPV pozitivitu. Z toho v devíti případech, které byly HPV pozitivní, zjistil recidivu onemocnění. Ze skupiny zbylých 48 případů s metastaticky negativními uzlinami zaznamenal dvě recidivy, obě však u pacientek s přítomností DNA HPV v uzlinách [Park, 1996].

V některých studiích ale nebyl prognostický význam HPV DNA ve spádových lymfatických uzlinách potvrzen. Jednalo se většinou o menší studie nebo práce s nepřesnostmi v metodice. Ve velkém retrospektivním souboru 150 pacientek s průměrnou dobou sledování 48 měsíců a převahou pokročilých stádií nebyla souvislost mezi HPV v lymfatických uzlinách a celkovým přežitím prokázána. Autor však uvádí, že u 16% případů HPV pozitivních uzlin nebyl zjištěn HPV v primárním tumoru a že 35% metastaticky postižených uzlin bylo HPV negativních. Hodnocení bylo navíc limitováno počtem 6 lymfatických uzlin od každé pacientky, které byly vyšetřeny na přítomnost DNA HPV [Fülle, 2006]. Diskrepance mohou být důsledkem

nízké citlivosti PCR techniky prováděné z parafinových bločků, omezeného počtu vyšetřených uzlin, ale i vysokého zastoupení pokročilých stádií onemocnění. I v dalších retrospektivních souborech nebyl prokázán prognostický význam přítomnosti DNA HPV v lymfatických uzlinách. V malém souboru (n = 15) pacientek v časném stádiu byly zjištěny 4 recidivy, 3 u pacientek s HPV v uzlinách, které zároveň byly metastaticky postižené. U žádné ze zbylých 7 pacientek s HPV v histopatologicky negativních uzlinách však nebyla recidiva prokázána [Chan, 2005]. V dalším souboru (n = 24) byla HPV DNA nalezena v negativních lymfatických uzlinách pouze u 2 pacientek z 10, u kterých došlo později k recidivě [Hording, 1995]. Oba soubory jsou však limitovány nejen nízkým počtem recidiv, ale také malým počtem pacientek ve studii.

Průkaz HPV v SLN sice zvyšoval senzitivitu detekce metastatického postižení, ale jako samostatný rizikový faktor neměl v žádné studii význam pro prognózu. Coutant sledoval 53 pacientek v průměrné době 31,6 měsíce. Pouze v jednom případě ze 7 recidiv byla zjištěna DNA HPV v SLN, naopak 9 pacientek s HPV DNA v SLN bylo po celou dobu sledování bez známek recidivy onemocnění [Coutant, 2007]. V jiné studii bylo ve skupině 57 radikálně operovaných žen po třiletém sledování zjištěno 5 případů recidivy, všechny u pacientek s metastatickým postižením SLN. Ve 4 případech byly SLN zároveň HPV pozitivní. Statisticky významný rozdíl (p = 0,001) však byl zjištěn pouze při rozdělení sledovaného souboru na dvě skupiny – pacientky s HPV i histopatologickou negativitou SLN a pacientky s metastázou v SLN bez ohledu na HPV pozitivitu. Kombinace histopatologického vyšetření a detekce HPV v SLN měla v souboru 100% negativní prediktivní význam pro recidivu [Lee, 2007].

Nejasný zůstává také význam přítomnosti jednotlivých genotypů HPV pro prognózu. Většina autorů, kteří tuto problematiku studovali, posuzuje pouze prognostický význam genotypů zjištěných v primárním tumoru. O vztahu mezi prognózou onemocnění a genotypem HPV ve spádových lymfatických uzlinách jsou v literatuře jen omezená data.

Ve studii porovnávající období bez progresu onemocnění u pacientek s HPV 16

pozitivitou byl signifikantní rozdíl mezi skupinou s HPV 16 negativními uzlinami a HPV 16 pozitivními uzlinami (průměrné období bez progresu 46 měsíců vs. 38 měsíců) [Póka, 1997]. Na souboru 4 pacientek byl prezentován význam přítomnosti genotypu HPV 18 v histopatologicky negativních lymfatických uzlinách. Autoři poukazovali na HPV 18 pozitivitu, jako na významný rizikový faktor nejen pro časnou recidivu onemocnění (průměrně 13,3 měsíce), ale i pro její rychlou progresi s krátkým intervalem přežití (průměrně 16 měsíců) [Sapy, 2000]. Podobná data přináší i jiná studie, kde byla zjištěna recidiva u 5 pacientek ze 6 s HPV 18 pozitivními lymfatickými uzlinami [Burnett, 1992]. Kónya dále ukazuje signifikantně častější asociaci HPV 18 s nádory vzniklými u mladších žen před 40. rokem života ($p = 0,029$) a na asociaci s prognosticky nepříznivými histologickými typy (adenokarcinomy a nediferencované karcinomy, $p = 0,032$) [Kónya, 1995]. Podobná, ale statisticky nesignifikantní data přinesla i jiná studie v případě HPV 18 positivity v primárním tumoru a v SLN [Coutant, 2007]. Vysvětlení pro horší prognózu spojenou s HPV 18 pozitivitou je stále nejasné, ačkoliv byly popsány některé molekulární změny, včetně vysoké frekvence integračních příhod a zvýšené fosforylace E7. Diskutuje se i vyšší invazivita HPV 18 pozitivních nádorů s rychlejší progresí do lymfatických uzlin ve srovnání se stejně velkými non - HPV 18 nádory [Im, 2003]. O významu shody mezi genotypy HPV v nádoru a HPV pozitivními lymfatickými uzlinami pro prognózu onemocnění dosud není v literatuře žádná informace.

4. Souhrn publikovaných dat

Stanovení DNA HR HPV ve spádových lymfatických uzlinách u žen s karcinomem děložního hrdla je studováno díky možnému využití v diagnostice „okultního“ metastatického šíření nádoru do pánevních uzlin, které nelze identifikovat při histopatologickém vyšetření. Přehled publikovaných studií uvádí tabulka 1. V literatuře jsou uváděny velké rozdíly v prevalenci HPV v lymfatických uzlinách, která ve většině publikací koreluje s jejich metastatickým postižením. V malých souborech byla prokázána identická korelace i při stanovení HPV v SLN.

Přítomnost HPV DNA ve spádových lymfatických uzlinách je častěji spojena s HPV pozitivitou primárního nádoru, s časným stádiem onemocnění, ale s větším objemem primárního tumoru. Ostatní rizikové faktory nejsou podle většiny autorů signifikantní pro predikci positivity HPV DNA v uzlinách.

Nejednotnost metodiky stanovení HPV DNA ve spádových lymfatických uzlinách však přináší otázky reprodukovatelnosti výsledků podle způsobu získávání

materiálu k vyšetření. Většina dosud publikovaných prací je retrospektivní a využívá parafínové bločky, naopak prospektivní práce využívají nativní nebo čerstvě zmraženou tkáň. Hlavní úskalí vyšetření s využitím parafínových bloček spočívá v omezeném počtu vyšetřovaných uzlin a omezeném počtu vyšetřovaných plátků z tkáňových řezů.

V souborech je prokazován podíl HPV pozitivních, ale histopatologicky negativních lymfatických uzlinách, který by mohl částečně představovat klinicky významnou skupinu dosud histopatologicky ani imunohistochemicky nepoznaného mikrometastatického postižení. Část velmi pravděpodobně pochází z desintegrováných buněk nádoru pasivně zanesených lymfou nebo aktivně transportovaných prostřednictvím imunokompetentních fagocytických buněk

Nejasný zůstává také význam přítomnosti HPV ve spádových uzlinách pro prognózu onemocnění. Největší prospektivní studie prokázala přímou souvislost mezi přítomností HPV v uzlinách a horší prognózou onemocnění, jiné práce však tuto asociaci nepotvrdily. Ve studiích korelujících prognostický význam HPV v SLN nebyl signifikantní rozdíl v počtu recidiv v závislosti na HPV pozitivitě. Kombinace negativity histopatologického vyšetření a detekce HPV v SLN však představovala 100% negativní predikci metastatického postižení všech pánevních lymfatických uzlin.

Na malých souborech byl prezentován význam konkrétních genotypů HPV zjištěných v lymfatických uzlinách pro prognózu. Nejčastěji je poukazováno na HPV 18 pozitivitu jako na významný rizikový faktor pro časnou recidivu onemocnění a její rychlou progresi s krátkým intervalem přežití.

Tab. 1: Přehled studií o HPV v lymfatických uzlinách

Autor	Typ studie	Metodika	Prognostický význam	Počet patientek	Follow-up (měsíce)	FIGO stádium	SLNB	HPV v LN (%)	HPV v pozitivních LN (%)	HPV v negativních LN (%)	Recidivy u pacientek s HPV pozitivními LN (%)	Testované genotypy HPV
Baay	retrospektivní	parafínové bločky	ne	35	47,5	IB = 36 IIA = 9 IIB = 5	ne	38	46.6	63.2	NS	16
Burnett	retrospektivní	parafínové bločky	ano	12	36	IB = 12	né	NS	NS	NS	71.0	6,11, 16, 18, 31, 33, 35
Cavuslu	retrospektivní	parafínové bločky	ano	24	NS	IA = 5 IB = 11 IIA = 3 IIB = 5	ne	58.3	85.7	20	NS	16, 18, 31, 33
Chan	retrospektivní	parafínové bločky	ne	15	39	IB = 14 IIA = 1	ne	66.7	100	58.3	14.3	16, 18, 31, 33, 58
Coutant	retrospektivní	NS	ne	53	31,6	IA = 6 IB1 = 23 IB2 = 8 II = 22	ano	25.4	46.7	13.6	14	16, 18, 31
Czegledy	retrospektivní	parafínové bločky	ne	31	60	IA2 = 27	ne	70.9	90.9	60	27.3	16

						IIA = 2 IIB = 2						
Fulle	retrospektivní	parafínové bločky	ne	150	48	IA2 = 4 IB = 50 IIA = 37 IIB = 54 IIIA = 1 IIIB = 4	ne	61.3	94.2	90.1	NS	16, 18, 33
Hernadi	retrospektivní	NS	ano	39	NS	IB = 20 II = 19	ne	53.8	100	35.7	42.9	16
Hording	retrospektivní	parafínové bločky	ne	24	60	IB = 24	ne	29.2	33.3	27.8	28.6	NS
Kobayashi	retrospektivní	parafínové bločky	ano	236	48	NS	ne	NS			NS	16, 18
Lee	prospektivní	NS	ano	57	36	IB1 = 29 IB2 = 15 IIA = 13	ano	80	100	57.9	11.4	6, 11, 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 69
Lukaszuk	prospektivní	čerstvě zmražená tkáň	ano	116	39	IB = 64 IIA = 32 IIB = 20	ne	69.8	100	36.4	NS	16, 18, 31, 33
Park	retrospektivní	parafínové bločky	ano	79	36	IB = 43 IIA = 25 IIB = 11	ne	25.3	41.9	22.9	45.8	16, 18
Pilch	retrospektivní	parafínové bločky	ano	204	52.7	IB = 10 IIA = 86 IIB = 108	ne	32.4	61.5	8.8	NS	16, 18
Poka	retrospektivní	NS	ano	32	37	NS	ne	NS	NS	NS	NS	16
Sapy	retrospektivní	NS	ano	4	24	IB = 2 IIA = 2	ne	100	25	75	100	18

LN = lymfatické uzliny, SLNB = biopsie sentinelových lymfatických uzlin, NS = nespecifikováno

VLASTNÍ PRÁCE

5. 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 pacientek dominantní zastoupení časných stádií onemocnění. Výsledky studie s transrektálním ultrazvukovým vyšetřením byly navíc samostatně publikovány [Fischerova, 2008].

6. Metodika

6.1 Charakteristika souboru

Do studie byly zařazeno 49 pacientek 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 pacientek 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.

6.2 Sběr materiálu k vyšetření

Na počátku operace byla provedena u všech pacientek 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.

6.3 Amplicor 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 Amplicor 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 amplikon HPV beta - globinu přidavkem denaturačního roztoku chemicky denaturován na jednořetězcovou DNA. Alikvotní podíly denaturovaného amplikonu se odměřily do jamek mikroploten (MicroWellPlates, MWP) potažených HR HPV nebo beta – globin specifickými (B_PCO3) oligonukleotidovými sondami. Biotinem značený amplikon HPV a beta - globinu byl k oligonukleotidovým sondám vázaným na jamky MWP hybridizován. Po skončení hybridizační reakce byl do každé jamky přidán konjugát avidin-křenové peroxidázy. Tento konjugát se na biotinem značený amplikon hybridizovaný k oligonukleotidovým sondám vázaným k MWP navázal a do jamek byl přidán substrátový roztok obsahující peroxid vodíku a 3,3',5,5'-tetrametylbenzidín (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.

6.4 Histopatologické a imunohistochemické vyšetření

Histopatologické vyšetření bylo provedeno standardní technikou. SLN byly celé vyšetřeny podle protokolu popsaném 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).

6.5 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.

7. Výsledky

Charakteristiku souboru shrnuje tabulka 2. 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 negativitě 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 3).

Tab. 2: 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 uziny; LN = lymfatické uzliny; NACT = neoadjuvantní chemoterapie

Tab. 3: 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
IB1	14 (50%)	10 (50%)	(p<0,07)
IB2	9 (32,1%)	5 (25%)	NS
IIA	2 (7,1%)	4 (20%)	NS
IIB	0 (0%)	1 (5%)	NS
Trend	-	-	NS
			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=0,3005 97

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 4). U žádné z 8 žen s HPV negativním primárním tumorem nebyla nalezena HPV pozitivní lymfatická uzlina.

Tabulka 4: 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.

8. 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 soulase 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 stádia 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 stádia 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 postižením 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.

ZÁVĚR

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.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

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, Kommos F, Stanimirovic B, Pflaiderer 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 Gynecol* 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. Papilomarivé 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, Drazdakova 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 PŘÍLOH

Příloha A – Kopie publikovaných prací.....I

Příloha B – Seznam publikací s tematikou vztahující se k disertační práci.....II

Příloha C – Seznam dalších publikací.....III

Příloha D – Seznam posterových a ústních prezentací se vztahem k tématu disertační práce.....IV

BIBLIOGRAFICKÉ ÚDAJE

Jméno autora: MUDr. Jiří Sláma

Obor: Experimentální chirurgie

Forma studia: Kombinovaná

Název práce: Význam lidských papilomavirů pro detekci metastatického postižení
lymfatických uzlin u pacientek s karcinomem děložního hrdla

Rok: 2009

Počet stran: 39

Celkový počet příloh: 4

Počet titulů literatury: 35

Vedoucí práce: MUDr. Pavel Dundr, Ph.D.

Publikace

1. S IF:

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.

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.

Cibula D, Slama J, Fischerova D. Update on radical trachelectomy. *Gynecol. Oncol*. 2008 Nov;111(2 Suppl):S111-5.

Slama J, Drazdakova 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.

2. Bez IF:

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.

Sláma J. Gynekologie. In *Breviř gynekologie, porodnictví a urologie*. Medical Tribune, 2008.

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.

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.

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.

Sláma J, Šoltés M. Standardní versus "hand-pump" vakuumextrakční přístroj. Čes Gynekol. 2004 Nov;69(6):440-3.

Sláma J. Kondylomata accuminata ženského genitálu. Modern Gynekol Porod. 2005;14:231-237.

Sláma J. Projevy syfilis na zevních rodidlech žen. Modern Gynekol Porod. 2005;14:259-263.

Sláma J, Freitag P. Vakcíny proti lidským papilomavirům. Prakt Gynekol 2007;1:30-2.

Sláma J. Papilomarové infekce v gynekologii. Modern Gynekol Porod. 2006;15:397-402.

Sláma J. Prekancerózy v gynekologii. Modern Gynekol Porod 2007;16:462-487.

Sláma J. Cervarix – klinický přehled. Modern Gynekol Porod. 2007; 16(suppl.):795-804.

Sláma J. Bivalentní vakcína proti lidským papilomavirům. Remedia. 2007;17:464-9.

Sláma J. Cervarix – další krok k prevenci karcinomu děložního hrdla. Lékařské listy. 2007; 21: 10-12.

Sláma J. Očkování proti HPV. Klin Farmakol Farm. 2008;22:153-5.

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.

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.

Pařízek A, Sláma J, Zikán M, Koucký M. Pharmindex brevír - Gynekologie a porodnictví. Medical Tribune, Praha 2006.

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.

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.

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

Prezentace na kongresech, sympoziích:

Sláma J, Cibula D, Freitag P, Fischerová D, Janoušek M, Pavlišta D, Strunová M, Zikán M, Jančárková N. Contribution of neoadjuvant chemotherapy for operability of cancers of the uterine cervix. ESGO, Berlin, Germany, 28.10. – 1.11.2007

Sláma J, Cibula D, Freitag P, Fischerová D, Janoušek M, Pavlišta D, Strunová M, Zikán M, Jančárková N. Detection of 13 genotypes of high risk human papillomaviruses in the primary cervical tumor and in the pelvic nodes. ESGO, Berlin, Germany, 28.10. – 1.11.2007

Sláma J, Cibula D, Draždřáková M, Fischerová D, Dundr P, Zikán M, Freitag P. DNA HR HPV in cervical cancer tissue, in sentinel and other pelvic lymph nodes - A correlation with histopathological and immunohistochemical results. HPV in human pathology, Prague, 1. – 3. 5.2008

Sláma J, Cibula D, Draždřáková M, Dundr P, Fischerová D, Zikán M, Freitag P, Pinkavová I, Svárovský J. HPV DNA in the tissue of cervical carcinoma, in sentinel and pelvic lymph nodes – correlation with histopathological findings. IGCS, Bangkok, Thailand, 25. – 28.10.2008

Sláma J, Cibula D, Svárovský J, Fischerová D. Technique of total omentectomy. International video workshop on radical surgery in gynecological oncology, Prague, 29.3. – 1.4.2008

Sláma J, Cibula D. Pánevní exenterace. Gynekologie v onkologii, Brno 2007

Sláma J. Význam neoadjuvantní chemoterapie pro operabilitu karcinomu děložního hrdla. Gynekologie v onkologii, Brno 2007

Sláma J. Cytologická klasifikace. Kolposkopicko ultrazvukový kurz VFN, Praha 2006, 2007, 2008

Sláma J. Prekancerózy endometria a metody konzervativní léčby karcinomu endometria. Onkogynekologický kurz VFN, Praha 2005

Sláma J. Management HG prekanceróz děložního hrdla, metody ošetření. Kolposkopicko ultrazvukový kurz VFN, Praha 2006, 2007, 2008

Sláma J. Nenádorová onemocnění vulvy. Onkogynekologický kurz VFN, Praha 2006

Sláma J. Onkogynekologie vulvy. Kurz ENTOG. FNM, Praha 2005

Sláma J. Management časných stádií ovariálního karcinomu. Onkogynekologický kurz VFN, Praha 2007

Sláma J. Možnosti fertility šetřící léčby v onkogynekologii. XII. Staškův den, Praha 2007.

Sláma J. Přínos neoadjuvantní chemoterapie pro operabilitu karcinomu děložního hrdla. XI. Staškův den, Praha 2006

Sláma J. Obtížné kolposkopické nálezy. Levret 2007.

Sláma J. Vakcíny proti HPV infekci. Levret, Praha 2007.

Sláma J. Možnosti prevence HPV infekce. Brněnské onkologické dny, Brno 2007

Sláma J. Bivalentní vakcína proti HPV infekci – klinický přehled. Kongres ESČGPS, Hradec Králové 2007; Kaňkův den onkogynekologů, 2007