

Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Plzni
Gynekologicko-porodnická Klinika Fakultní Nemocnice Plzeň

Využití molekulárně biologické metody **One-Step Nucleic Acid Amplification** (OSNA) při vyšetření sentinelových lymfatických uzlin u pacientek s karcinomem endometria

Doktorandská disertační práce



Autor: MUDr. Jan Kost'un

Školitel: MUDr. Jiří Presl, Ph.D.

Plzeň, 2018

Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Plzni
Gynekologicko-porodnická Klinika Fakultní Nemocnice Plzeň

Využití molekulárně biologické metody **One-Step Nucleic Acid Amplification (OSNA)** při vyšetření sentinelových lymfatických uzlin u pacientek s karcinomem endometria

Doktorandská disertační práce



Autor: MUDr. Jan Kost'un

Školitel: MUDr. Jiří Presl, Ph.D.

Plzeň, 2018

1 Prohlášení o autorství

Dovoluji se předložit k posouzení a obhajobě svoji dizertační práci završující mé doktorandské studium na Lékařské Fakultě Univerzity Karlovy v Plzni.

Čestně prohlašuji, že jsem při psaní této práce čerpal pouze z použité citované odborné literatury a z dat vycházejících z mé vlastní práce. Práci jsem samostatně vypracoval pod vedením svého školitele.

Dále prohlašuji, že tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Plzni dne 16.08.2018

MUDr. Jan Košťun

2 Poděkování

Velice rád bych touto cestou poděkoval svému školiteli, MUDr. Jiřímu Preslovi, Ph.D., za jeho odbornou pomoc a lidský přístup nejen během psaní této disertační práce, ale i během celého mého doktorandského studia a každodenní klinické praxe.

Dále jsem velice vděčný doc. MUDr. Zdeňku Novotnému, CSc., přednostovi Gynekologicko-porodnické kliniky FN Plzeň, za skvělou možnost věnovat se studiu a problematice onkogyneologie na jeho pracovišti. Mé poděkování patří i prof. MUDr. Ondřeji Topolčanovi, CSc. a doc. RNDr. Martinu Peštovi, Ph.D. jejichž zásluhou jsem mohl využít tak unikátní metody, jakou OSNA toho času bezesporu je.

V neposlední řadě chci poděkovat všem svým kolegům z onkogyneologického týmu, kteří mi pomáhali se sběrem dat, aktivně se podíleli na operačních výkonech a účastnili se péče o naše pacientky.

MUDr. Jan Košťun

3 Seznam použitých zkratk

CK 19	cytokeratin 19
ČSÚ	Český Statistický Úřad
EC	endometrial cancer (karcinom endometria)
ESGO	European Society of Gynaecological Oncology (Evropská Společnost pro Gynekologickou Onkologii)
ESMO	European Society of Medical Oncology (Evropská Společnost Klinické Onkologie)
ESTRO	European Society for Radiotherapy and Oncology (Evropská Společnost pro Radioterapii a Onkologii)
H&E	hematoxylin eosin
ICG	indocyanine green (indocyaninová zeleň)
IHC	immunohistochemistry (imunohistochemické vyšetření)
LN	lymph node (lymfatická uzlina)
LVSI	lymphovascular space invasion (lymfovaskulární invaze)
L1CAM	L1 Cell Adhesion Molecule (L1 buněčná adhesivní molekula)
NCCN	National Comprehensive Cancer Network (Všeobecná Národní Síť pro Onkologická Onemocnění)
OSNA	One-Step Nucleic Acid Amplification (metoda amplifikace nukleových kyselin)
PaLND	paraortic lymph node dissection (systematická paraaortální lymfadenektomie)
PLND	pelvic lymph node dissection (systematická pánevní lymfadenektomie)
SLN	sentinel lymph node (sentinelová lymfatická uzlina)
SLNM	sentinel lymph node mapping (detekce sentinelové lymfatické uzliny)

4 Obsah

1	Prohlášení o autorství.....	3
2	Poděkování.....	4
3	Seznam použitých zkratk 5	5
4	Obsah	6
5	Strukturovaný souhrn.....	8
6	Structured abstract	10
7	Současný stav problematiky karcinomu endometria	12
7.1	Epidemiologie.....	12
7.2	Rizikové a protektivní faktory karcinomu endometria.....	15
7.3	Klasifikace karcinomu endometria	17
7.4	Klinický obraz a diagnostické metody	19
7.5	Staging	21
7.6	Terapie	23
7.7	Význam lymfatického systému v kontextu gynekologických malignit.....	27
7.8	Detekce sentinelové uzliny karcinomu endometria.....	29
7.8.1	Obecný úvod	29
7.8.2	Anatomie lymfatického systému ženského genitálu	32
7.8.3	Přehled způsobů detekce sentinelové uzliny u karcinomu endometria.....	34
8	Využití molekulárně biologické metody One-Step Nucleic Acid Amplification (OSNA) při vyšetření sentinelových lymfatických uzlin u pacientek s karcinomem endometria.....	37
8.1	Cíle disertační práce	37
8.2	Výběr pacientek vhodných do studie.....	39
8.3	Metodika studie	40
8.3.1	Mapování sentinelové uzliny	40
8.3.2	Očištění a prokrájení sentinelové uzliny	40

8.3.3	Zpracování sentinelových uzlin patologem.....	41
8.3.4	Zpracování sentinelových uzlin metodou OSNA.....	41
8.3.5	Statistické zpracování dat.....	42
8.4	Výsledky studie	43
8.4.1	Charakteristika pacientek	43
8.4.2	Výsledky detekce sentinelových uzlin	44
8.4.3	Porovnání závěrů metody OSNA s ultrastagingem (H&E a IHC CK19)	44
8.4.4	Porovnání metod ve smyslu schopnosti detekce mikrometastáz či makrometastáz	47
8.4.5	Hodnocení pacientek z hlediska použitých metod	49
8.4.6	Zařazení pacientek do TNM a FIGO klasifikace dle použitých vyšetřovacích metod	50
8.5	Diskuse	51
8.6	Závěr.....	56
9	Použitá literatura	57
10	Publikační a přednášková činnost autora	65
10.1	Publikace s impakt faktorem	65
10.2	Publikace recenzované	65
10.3	Přednášky na konferencích s mezinárodní účastí	66
10.4	Přednášky na národních konferencích.....	67

5 Strukturovaný souhrn

Hypotéza studie

Metoda One-Step Nucleic Acid Amplification by mohla představovat efektivní intraoperativní nástroj detekce metastatického postižení lymfatických uzlin u pacientek s karcinomem endometria na úrovni ultrastagingu.

Cíle práce

Obsahem této práce je ověření využitelnosti molekulárně biologické metody One-Step Nucleic Acid Amplification (OSNA) pro detekci mikrometastatického a makrometastatického postižení sentinelových lymfatických uzlin u pacientek s karcinomem endometria pro klinickou praxi. Primárním cílem práce je srovnání závěrů metody OSNA se závěrem histopatologického ultrastagingu sentinelových uzlin. Mezi sekundární cíle patří vyjádření dopadu této metody na řazení pacientek do stádií dle FIGO klasifikace, vlastní úspěšnost detekce sentinelové uzliny a imunohistochemické potvrzení exprese cytokeratinu 19 primárním tumorem u všech pacientek zařazených do studie.

Pacientky a metody

Pacientky indikované k operační léčbě pro karcinom endometria, které podepsaly informovaný souhlas se zařazením do studie, podstoupily detekci a exstirpaci sentinelových lymfatických uzlin. Ta proběhla pomocí intracervikální aplikace traceru. Uzliny > 5 mm byly prokrájeny po 2 mm paralelně ke krátké ose uzliny. Liché řezy byly vyšetřeny metodou OSNA, sudé hematoxylinem eozinem (H&E) a imunohistochemickým vyšetřením na cytokeratin 19 (IHC CK19), protokolem odpovídajícím ultrastagingu. Uzliny ≤ 5 mm byly podélně rozděleny na dvě stejné části, jedna polovina vyšetřena metodou OSNA, druhá polovina ultrastagingem. Závěry metody OSNA byly porovnány s výsledky ultrastagingu a statisticky zpracovány.

Výsledky studie

Do studie bylo zařazeno 58 pacientek a bylo získáno 135 sentinelových uzlin. U 54 z 58 (93 %) případů pacientek zařazených do studie bylo dosaženo oboustranné detekce, u 4 (7 %) pacientek se podařilo lokalizovat sentinelové uzliny pouze jednostranně. Ultrastaging i OSNA se shodly na 107 negativních a 10 pozitivních výsledcích.

Metoda OSNA navíc detekovala v 18 sentinelových uzlinách mikrometastatické postižení, zatímco histopatologický ultrastaging vyhodnotil tyto uzliny jako negativní. V případě jedné uzliny byl zaznamenán falešně negativní výsledek metody OSNA.

Při srovnání výsledků metody OSNA se závěry ultrastagingu pomocí H&E a IHC CK19 jako referenční metody, bylo dosaženo sensitivity 90,9 %, specificity 85,5 % a konkordance 85,9 %.

Celkem bylo díky metodě OSNA zařazeno do stadia FIGO III o 20,69 % pacientek více. Exprese cytokeratinu 19 primárním nádorem byla imunohistochemicky potvrzena u všech pacientek ve studii.

Závěr

Výsledky metody OSNA vykazují vysokou míru shody s histopatologickým ultrastagingovým vyšetřením. Metoda OSNA navíc vykazovala statisticky vyšší frekvenci záchytu mikrometastáz ($p \leq 0,0033$) a zařadila do III. stadia dle FIGO klasifikace o 20,69 % pacientek více.

6 Structured abstract

Hypothesis

The One-Step Nucleic Acid Amplification method could represent an effective intraoperative tool for detection of metastatic involvement of lymphatic nodes on the level of ultrastaging in endometrial cancer patients.

Objective

Utilization of the One-Step Nucleic Acid Amplification (OSNA) molecular biology method for the detection of the micrometastatic and macrometastatic involvement of sentinel lymph nodes in endometrial cancer patients. The objective is a comparison with the conclusion of the histopathological ultrastaging of sentinel lymph nodes and a description of the clinical consequences of this method.

Methods

Patients indicated for the surgical treatment of endometrial cancer underwent the detection of sentinel lymph nodes that was executed using the intracervical application of a tracer. Nodes larger than 5 mm were cut into sections 2 mm thick parallel to the short axis of the node. Odd sections were examined using the OSNA method, while even ones were examined by hematoxylin and eosin (H&E) and immunohistochemical examination to detect cytokeratin 19 antibody (IHC CK19) based on an ultrastaging-relevant protocol. Nodes of the size of 5 mm and smaller were divided into halves along the longitudinal axis with one half being examined using the OSNA method and the other half by ultrastaging. Conclusions of the OSNA method were compared to results of ultrastaging.

Results:

In total 58 patients were included in the study and a total of 135 sentinel lymph nodes were acquired. Both ultrastaging and OSNA agreed on 107 negative and 10 positive results.

In addition, OSNA detected micrometastatic involvement in 18 sentinel lymph nodes while histopathological ultrastaging evaluated these nodes as negative. In one node a false negative result using the OSNA method was recorded.

When comparing the results of the OSNA method to the conclusions of H&E and IHC CK19 as a reference method, the sensitivity of 90.9%, the specificity of 85.5%, and the concordance of 85.9% was attained. Thanks to the OSNA method, by 20.69% more patients could be included into the FIGO stage III. The expression of cytokeratin 19 was immunohistochemically confirmed in all primary tumours.

Conclusions

The results of the OSNA method show a high level of consistency with histopathological ultrastaging examination. In addition, the OSNA method has shown a higher frequency of the detection of micrometastases and included 20.69% more patients into the FIGO stage III.

Highlights

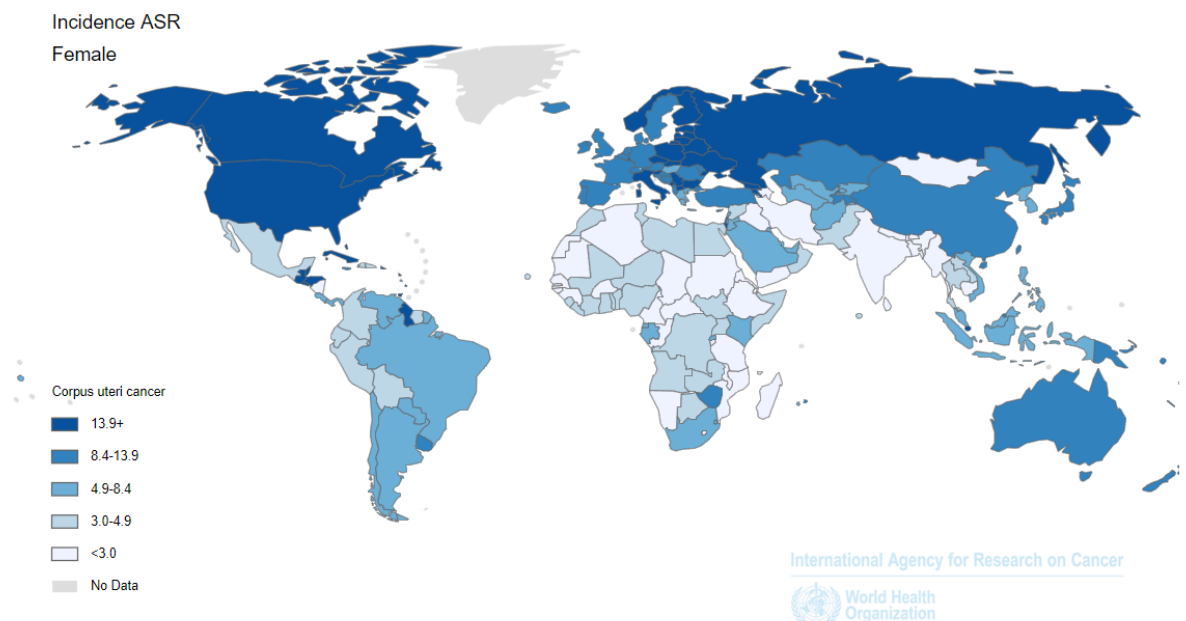
- The OSNA molecular biology method was employed to detect micro- and macrometastases in sentinel lymph nodes of endometrial cancer patients
- Compared to ultrastaging, the OSNA method showed the sensitivity of 90.9%, the specificity of 85.5%, and the concordance of 85.9%
- In our group, the OSNA method shows a higher detection of the micrometastatic involvement of sentinel lymph nodes
- The OSNA method included by 20.69% more patients into the FIGO stage III

7 Současný stav problematiky karcinomu endometria

7.1 Epidemiologie

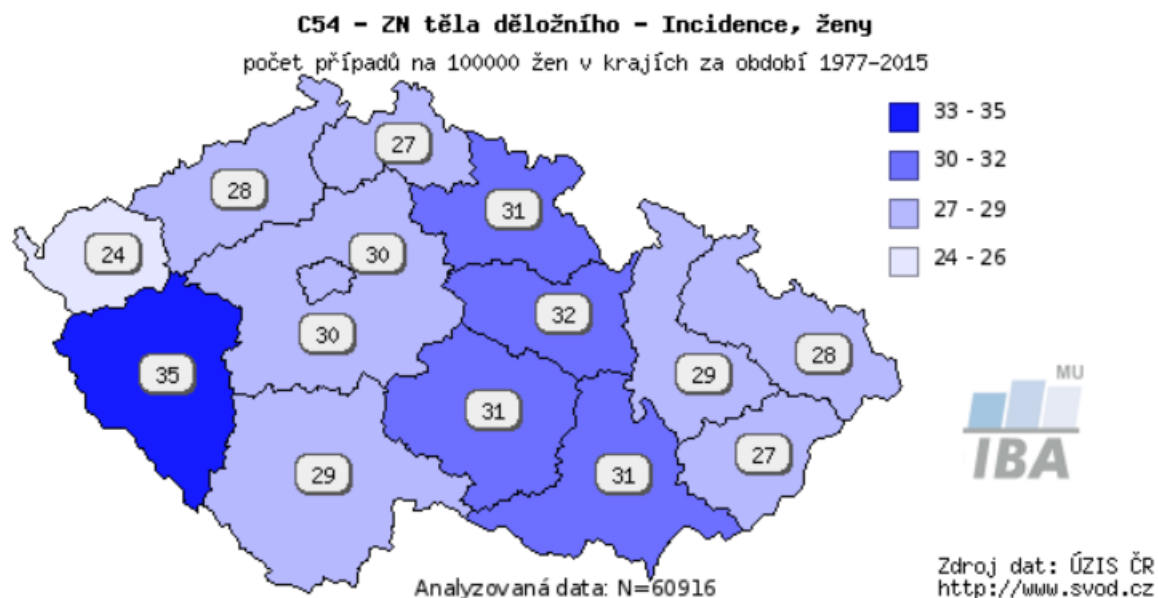
Karcinom děložního těla je v Evropě a severní Americe nejčastější malignitou postihující ženský genitál. V roce 2012 bylo nově diagnostikováno 527 600 žen [78]. V České Republice v roce 2015 nově onemocnělo 1948 žen a 451 žen v důsledku tohoto onemocnění zemřelo. Tato data odpovídají incidenci 36,32/100 000 a mortalitě 8,41/100 000 žen. Česká Republika se tak dlouhodobě řadí k zemím s celosvětově nejvyšší incidencí tohoto onemocnění. V rámci České Republiky v incidenci karcinomu děložního těla dominuje Plzeňský kraj, dále následují Pardubický kraj, Královéhradecký kraj a kraj Vysočina. Grafické znázornění rozložení incidence karcinomu endometria celosvětově a v rámci České Republiky viz Obrázek 1 až 5 [1, 31]

Obrázek 1 Celosvětové rozložení incidence karcinomu děložního těla (GLOBOCAN)

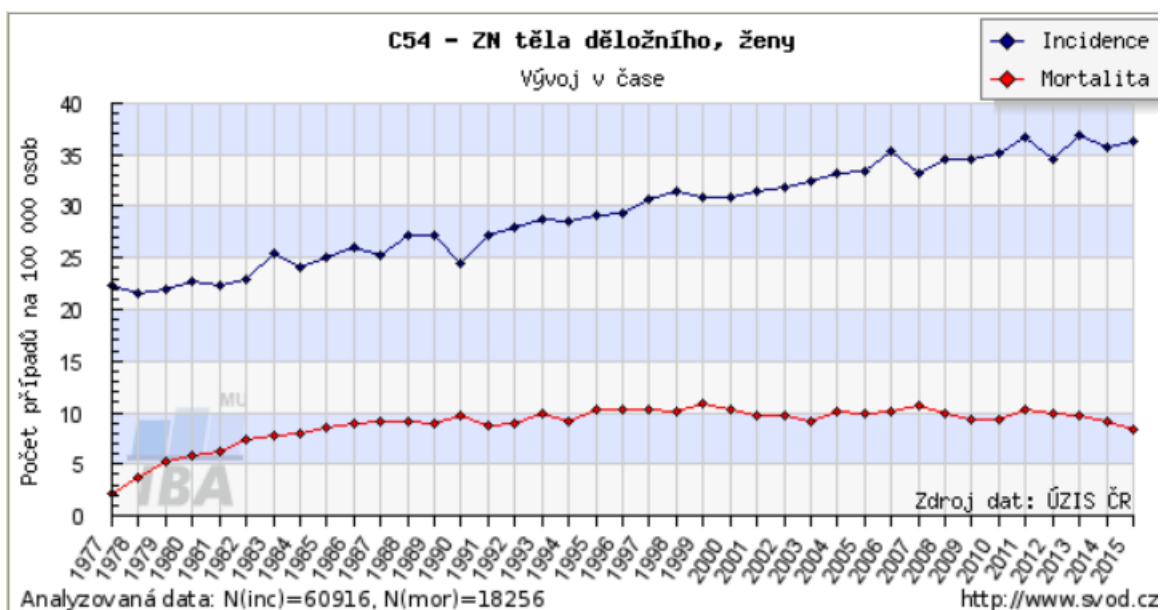


Source: GLOBOCAN 2012 (IARC)

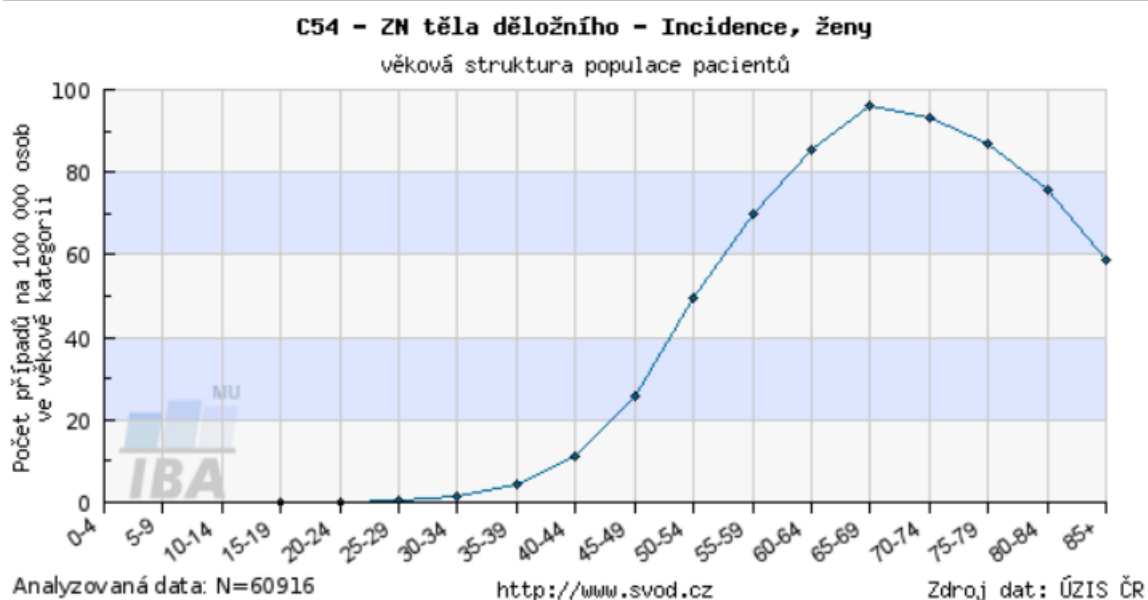
Obrázek 2 Celorepublikové rozložení incidence karcinomu děložního těla (ÚZIS)



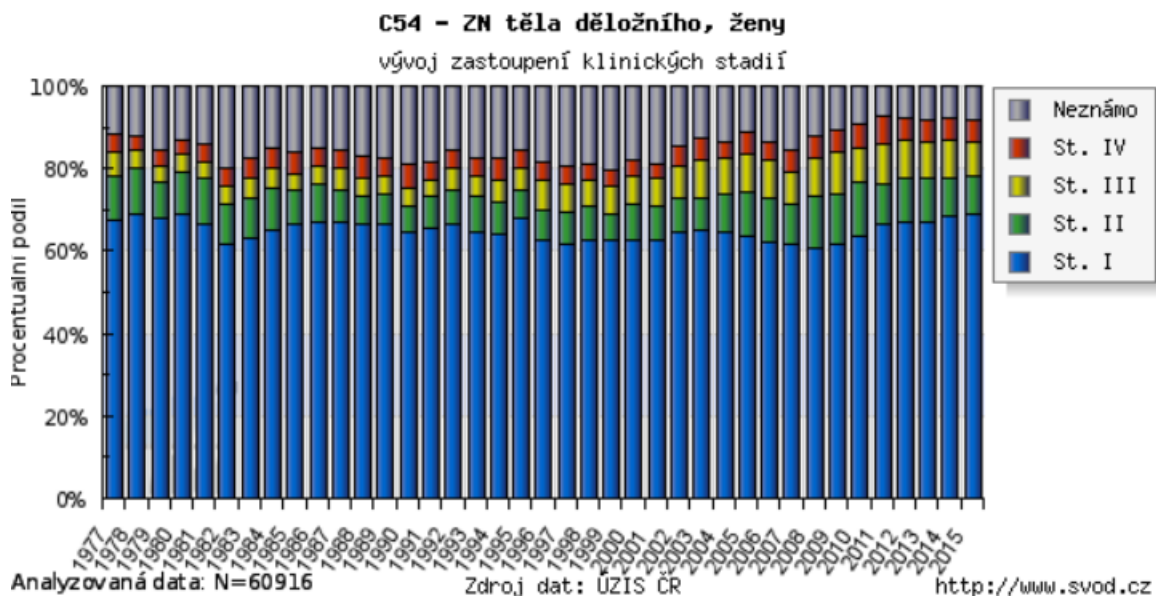
Obrázek 3 Incidence karcinomu děložního těla v ČR v čase (ÚZIS)



Obrázek 4 Rozložení karcinomu děložního těla v ČR dle věku (ÚZIS)



Obrázek 5 Rozložení karcinomu děložního těla v ČR dle stadia onemocnění (ÚZIS)



7.2 Rizikové a protektivní faktory karcinomu endometria

Karcinomy endometria jsou tradičně děleny na typ 1 a typ 2 [14, 73]. Typ 1 představuje častější, méně agresivní, estrogen dependentní formu onemocnění a o jeho rizikových faktorech máme k dispozici větší množství dat. Na stranu druhou, typ 2 karcinomu endometria představuje méně častou, estrogen independentní, agresivní formu a o jeho rizikových faktorech máme k dispozici méně údajů. Vzhledem k narůstající naději dožití u ženské populace, která se dle ČSÚ v poslední době zvedla o 3,5 roku, nabývá včasná identifikace rizikových faktorů na významu.

Endometriální endometroidní adenokarcinomy, karcinomy typu 1, vznikají na podkladě neoponované stimulace sliznice dutiny děložní estrogeny s následným vznikem hyperplazie endometria, vznikem buněčných atypií a postupným přechodem do vlastního karcinomu. Karcinomy typu 2 jsou histologicky nejčastěji popisovány jako serosní a světlobuněčné (clear cell), estrogen independentní, vznikající na podkladě atrofického endometria. Jsou hůře diferencované a mají horší prognózu. Dle dat dostupných z literatury má tento agresivnější typ karcinomu endometria, navzdory své nižší četnosti (typ 2 20% vs. typ 1 80%), výrazný podíl na mortalitě pro diagnózu karcinomu endometria a to asi 40% [51].

Mezi nejčastěji uváděné rizikové faktory, spojované zejména s typem 1 karcinomu endometria, patří věk ≥ 55 let, obezita, zvýšená hladina estrogenů, časná menarche, nuliparita, pozdní menopauza, Lynchův syndrom, užívání Tamoxifenu, tumory s produkcí estrogenů (ovariální tumory z buněk granulocy). Při obezitě souvisí zvýšená hladina estrogenů s periferní konverzí androgenů v tukové tkáni na estrogény aromatázami. Dochází tak k hyperstimulaci děložní sliznice estrogeny a vzniku hyperplazie endometria, která tak může mít atypický průběh s následným vysokým rizikem přechodu do karcinomu endometria. Často je u žen s diagnózou karcinomu endometria přítomen metabolický syndrom či diabetes mellitus. U Lynchova syndromu (autosomálně dominantní syndrom hereditárního nepolypózního kolorektálního karcinomu) existuje riziko vyšší četnosti výskytu rakoviny děložního těla (celoživotní riziko 30-70%), a na jeho podkladě vzniká asi 2% karcinomů endometria [86]. K ostatním rizikům tohoto syndromu patří zvýšený výskyt rakoviny tlustého střeva, ovarií, tenkého střeva, močových cest, jater, slinivky, mozku atd. [46]. Ohledně nosiček BRCA mutací se zatím vyšší riziko výskytu rakoviny děložního těla pouze předpokládá – zejména pro histologickou variantu serózního karcinomu endometria [12, 71]. Raritní autosomálně dominantní Cowdenův

syndrom, s mutacemi v PTEN supresorových genech, představuje krom zvýšeného výskytu mukokutánních lézí, rakoviny ledvin a tlustého střeva také zvýšené riziko pro vznik endometriálního karcinomu a to s celoživotním rizikem asi 13-19% [62].

Význam protektivního vlivu zdravého životního stylu vyplývá již z výčtu většiny výše uvedených rizikových faktorů. Na samotnou, estrogeny hyperstimulovanou, děložní sliznici mají ochranný vliv účinky gestagenů. Užívání hormonální kontracepce po dobu minimálně 12 měsíců působí protektivně po následujících 10 let života ženy. Celoživotní pokles rizika při užívání orálních kontraceptiv se dle literatury udává o 30% [19]. S nízkým rizikem vzniku karcinomu endometria je asociováno i kojení, vyšší věk při posledním porodu a kupodivu i nikotinismus [5].

U karcinomu děložního těla typu 2 je situace ohledně rizikových faktorů dosud nejasná. Podle některých metaanalýz se však většina rizikových faktorů shoduje s častější typ 1 variantou [73].

7.3 Klasifikace karcinomu endometria

Karcinom děložního těla byl historicky (od roku 1983) na základě Bokhmanovy hypotézy, postavené na klinickém a epidemiologickém pozorování, dělen do dvou podtypů, výrazně se odlišujících klinickými a endokrinními vlastnostmi [14]. Karcinom endometria typu 1 je diagnostikován asi v 80% případů. Jedná se o typicky méně agresivní formu s těmito charakteristikami: endometroidní histologie (ev. mucinózní), vysoký stupeň diferenciac tkáně tumoru (grade 1-2) a přítomnost exprese hormonálních estrogenových a progesteronových receptorů. Tento typ tumoru je nejčastěji diagnostikován v šestém deceniu, a asociován s vlivem stimulace endometria estrogeny vznikajícími periferně v tukové tkáni. Tyto pacientky, klinicky se časně prezentující abnormálním děložním krácením, jsou ve většině případů (asi 90%) diagnostikovány v incipientních stádiích s onemocněním omezeným na dělohu a tudíž s dobrou prognózou [2]. Typ 2 zahrnuje histologicky grade 3 endometroidní endometriální adenokarcinom a další nonendometroidní podtypy – serosní, světlobuněčný (clear cell), karcinosarkom či nediferencované karcinomy. Vznikají na podkladě atrofického endometria, jsou agresivní a s horší prognózou [14].

Dosud využívané histopatologické a klinické dělení karcinomu endometria spolu sice z určité části koreluje, nicméně existuje určitá biologická a molekulární heterogenita v rámci obou těchto systémů. O nový řád a přesnější způsob rozlišování jednotlivých podtypů karcinomu endometria se proto v současnosti snaží i genomická klasifikace za účelem přesnější charakteristiky typu onemocnění a následné úpravy léčby takzvaně “na míru“ [53]. Typ 1 karcinomu endometria je častěji spojován s mutacemi PTEN, KRAS, CTNNB1 a PIK 3CA a mikrosatelitní instabilitou. Naproti tomu serosní karcinomy se prezentují často s HER2 amplifikací či TP53 mutacemi.

Genomická klasifikace karcinomu endometria se opírá o data z The Cancer Genome Atlas Research Network (TCGA) [42].

Dle těchto údajů byl karcinom endometria rozčleněn do 4 tříd:

- 1) POLE (ultramutované) tumory, charakteristicky vysoký podíl mutací na polymerase ϵ podílející se na replikaci DNA, vyskytuje se i zvýšená frekvence mutací PTEN, PIK3R1, PIK3CA, FBW7 a KRAS. Tato skupina je asociována s dobrou prognózou.
- 2) MSI- skupina mikrosatelitní instability, vysoký podíl mutací a mikrosatelitní instability díky metylaci MLH1, vyskytují se i KRAS a PTEN mutace. Spíše endometroidní tumory.
- 3) Copy-number low- endometroidní tumory, nízký počet mutací, endometroidní tumory grade 1-2, CTNNB1 mutace.
- 4) Copy-number high- serosní apod. tumory, vysoký počet aberací, mutace TP53, FBXW7, PPP2R1A, PTEN a KRAS. Tato skupina zahrnuje agresivní tumory se špatnou prognózou.

Integrace genomické charakteristiky do již zavedených prognostických faktorů a celkového pojetí karcinomu endometria by měla umožnit lépe identifikovat ty pacientky, které budou profitovat pouze z chirurgické léčby a u nichž je recidiva onemocnění méně pravděpodobná. Zde by použití adjuvantní léčby znamenalo tzv. “overtreatment“. A naopak u pacientek, přesněji identifikovaných všemi dostupnými prognostickými faktory jako vysoce rizikové, začít s včasnou a dostatečně intenzivní adjuvantní léčbu [53].

Poznámka autora: Tato disertační práce se zabývá jen epiteliálními tumory děložního těla, které tvoří naprostou většinu děložních malignit. Pouze asi 3% procenta děložních malignit jsou reprezentována stromálními či mesenchymálními sarkomy [24].

7.4 Klinický obraz a diagnostické metody

Karcinom endometria je nejčastější gynekologické maligní onemocnění žen v rozvinutých zemích. Hlavním klinickým příznakem je abnormální děložní krvácení, tento symptom se vyskytuje u 75-90% pacientek [72]. Právě díky tomuto časnému příznaku je většina pacientek diagnostikována ve stádiu, kdy onemocnění postihuje pouze dělohu či v ideální případě jen děložní sliznici. V některých případech, u jinak asymptomatických žen, jsou atypické změny endometria zachyceny při provedení cervikálního stěru.

Dle dostupných dat je karcinom endometria příčinou atypického děložního krvácení až u 20% žen v postmenopauze, u dalších až 15% je histologicky potvrzena hyperplazie endometria [26]. Typicky se abnormální děložní krvácení objevuje u žen po 55 roce (76,6%), méně často diagnostikujeme toto onemocnění i u žen v premenopausálním období (riziko roste s věkem ženy). Zastoupení tohoto onemocnění v nižších věkových kategoriích je výrazně nižší, 16,3% onemocnění se objevuje ve věku mezi 45-54 lety, 7,1% u pacientek mladších 44 let [55].

Standardním zobrazovacím vyšetřením dělohy a děložní sliznice je ultrasonografické vyšetření, v ideálním případě provedené expertním ultrasonografistou. Ženy v postmenopauze, bez klinických příznaků, s šířkou endometria do 4-5mm mají minimální riziko malignity [32]. V případě, že se šíře endometria přibližuje svojí hodnotou 20mm, je riziko endometriální malignity vysoké [43]. Zvláštní skupinu žen, tvoří pacientky na hormonální léčbě. Například u pacientek léčených tamoxifenem, kdy je endometrium často vyšší, riziková hranice není jasně stanovena. Tyto ženy by měly být sledovány a velký důraz je kladen zejména na klinické symptomy ve formě abnormálního krvácení. V případě jakéhokoliv podezření by měl být proveden odběr histologického vzorku.

K posouzení rozsahu onemocnění lze využít dle možností a zkušeností pracoviště doplňující zobrazovací vyšetření jako CT, PET-CT či PET -MRI k posouzení retroperitoneálních struktur a vnitřních orgánů. Situaci v malé pánvi, v případě USG nejasností (invaze do myometria, stromatu hrdla či parametrií...), může pomoci osvětlit MRI.

Kompletní diagnostika děložních malignit samozřejmě zahrnuje i komplexní gynekologické vyšetření, laboratorní vyšetření a není-li provedeno CT vyšetření hrudníku je doplněn i RTG snímek.

Role nádorových markerů (např. Ca 125 či HE4) není v případě karcinomu endometria dosud jasně stanovena. Ideální nádorový marker pro diagnostiku a follow up tohoto onemocnění zatím nebyl nalezen.

Definitivní diagnóza je stanovena z histopatologického vyšetření vzorku tkáně odebraného při provedení biopsie, frakcionované kyretáže či z preparátu hysterektomie.

7.5 Staging

V klinické praxi je staging karcinomu endometria dle FIGO (International Federation of Gynaecology and Obstetrics) běžně používán již několik dekad. Klinický staging byl používán od roku 1970 a původně se opíral pouze o údaje z fyzikálního vyšetření a diagnostické frakcionované kyretáže. V roce 1988 byl tento původní systém modifikován na základě nově dostupných dat ohledně rozsahu onemocnění z chirurgického stagingu a histologických vlastností tumoru. Do tohoto systému byl tehdy prvně včleněn i prvek zohledňující postižení regionálních pánevních a paraaortálních lymfatických uzlin [11]. V roce 2009 doznala klasifikace opět několika změn, například byla vytvořena vlastní klasifikace pro epitelální tumory a zvláště pro děložní sarkomy [21].

Aktuálně byla v roce 2017 americkou společností AJCC (American Joint Committee on Cancer) provedena poslední revize stagingu karcinomu endometria, která vstoupila v platnost od ledna roku 2018 [6]. Jak lze odečíst z níže uvedené tabulky (Tabulka 1), s přehledovým zobrazením jednotlivých aktualizovaných stadií FIGO včetně jejich popisu a ekvivalentu v TNM klasifikaci, největší změnou bylo začlenění mikrometastatického postižení do obou kategorií IIIC1 i IIIC2 a včlenění konceptu sentinelové uzliny jako samostatné varianty či doplňku systematické pánevní a paraaortální lymfadenektomie v indikovaných případech.

Ukazuje se tedy, že identifikace a následné podrobné zpracování sentinelové uzliny, ať už ultrastagingem či v budoucnu ev. metodou OSNA, má přímý vliv na zařazení pacientky do odpovídajícího stádia onemocnění a na volbu adekvátní adjuvantní léčby. Tato skutečnost je právě s ohledem na téma této práce velice významná, neboť podtrhuje její možný přímý klinický dopad.

Tabulka 1 FIGO a TNM staging karcinomu endometria

TNM	FIGO	Popis
T – tumor		
TX		Primární tumor nelze posoudit
T0		Bez průkazu primárního tumoru
Tis		Karcinom in situ
T1	I	Tumor ohraničený na tělo děložní, včetně postižení endocervikálních žlaz
T1a	IA	Postiženo pouze endometrium, invaze maximálně do 50% tloušťky myometria
T1b	IB	Invaze více nebo rovno 50% síly myometria
T2	II	Nádor invaduje do stromatu cervixu, bez šíření mimo dělohu. Není zahrnuto postižení endocervikálních žlaz.
T3	III	Postižení serózy, adnex, vaginy a parametrií
T3a	IIIA	Nádor postihuje serózu a/nebo adnexa, přímo či jako metastáza
T3b	IIIB	Nádor postihuje vaginu či parametria, přímo či jako metastáza
T4	IVA	Nádor postihuje močový měchýř či rektum
N – regionální mízní uzliny		
NX		Regionální mízní uzliny nelze posoudit
N0		Regionální mízní uzliny bez metastáz
N0(i+)		Zastiženy izolované tumorové buňky, léze ne větší než 0,2mm
N1	IIIC1	Metastázy v regionálních pánevních mízních uzlinách
N1mi	IIIC1	Metastázy v regionálních pánevních mízních uzlinách větší 0,2mm ale menší či rovné 2mm
N1a	IIIC1	Metastázy v regionálních pánevních mízních uzlinách větší 2mm
N2	IIIC2	Metastázy v regionálních paraaortálních uzlinách, bez či s pozitivitou pánevních uzlin
N2mi	IIIC2	Metastázy v regionálních paraaortálních mízních uzlinách větší 0,2mm ale menší či rovné 2mm, bez či s pozitivitou pánevních uzlin
N2a	IIIC2	Metastázy v regionálních paraaortálních mízních uzlinách větší 2mm, bez či s pozitivitou pánevních uzlin
Přípona (sn) je přidána k písmenu N tehdy, když je metastáza identifikována jen v sentinelové uzlině.		
M – vzdálené metastázy		

M0		Bez vzdálených metastáz
M1	IVB	Vzdálené metastázy (včetně metastáz do inguinálních lymfatických uzlin, intraperitoneální diseminace, plic, jater, kostí)
Histologický Grade- stupeň diferenciace tkáně tumoru		
GX	Grade nelze určit	
G1	Dobře diferencovaný	
G2	Středně diferencovaný	
G3	Špatně diferencovaný či nediferencovaný	

7.6 Terapie

Primární terapie karcinomu endometria se opírá o chirurgickou léčbu. Vzhledem k tomu, že většina pacientek má onemocnění omezené na dělohu, je hlavním úkolem operátora odstranit in toto celý orgán – tedy bez morcellace [13, 56]. Ponechání adnex je možné, po zvážení všech okolností u premenopausálních pacientek ve stadiu I [47]. Je respektován laparotomický i laparoskopický přístup [27, 30].

Pacientky můžeme z pohledu chirurgické léčby rozčlenit do tří skupin:

- Pacientky s onemocněním omezeným pouze na dělohu
- Pacientky s předpokládaným masivním postižením děložního hrdla
- Pacientky s mimoděložní diseminací onemocnění

U pacientek s onemocněním limitovaným pouze na dělohu je základním bodem chirurgické léčby extrafasciální hysterektomie s oboustrannou adnexektomií. V případě, že je to s ohledem na rizikové faktory indikováno, je vhodné doplnit operaci i o provedení tzv. chirurgického stagingu ke kompletaci všech dat potřebných k rozhodnutí o rozsahu eventuální adjuvantní léčby. Rozsah operačního výkonu může být limitován zdravotním stavem pacientky.

Součástí chirurgického stagingu je zhodnocení všech intraperitoneálních struktur včetně peritoneálních povrchů. Suspektní struktury by vždy měly být odstraněny či alespoň biopskovány, odběr peritoneální laváže či ascitu na cytologii není již mandatorní součástí chirurgického stagingu. Zvětšené či suspektní lymfatické uzliny by měly být exstirpovány. Systematická pánevní a paraaortální lymfadenektomie, v případě absence klinicky suspektních lymfatických uzlin, je společností ESMO-ESGO-ESTRO doporučována jen v indikovaných případech (Tabulka 2) [20]. V takovém případě jsou uzliny v pánevní oblasti exstirpovány z okolí externích, interních a společných ilických cév a obturatorní fossy. V oblasti paraaortální jsou pak exstirpovány uzliny inframesenterické a subrenální, lokalizované parakaválně, paraaortálně, presakrálně a interaortokaválně. Novou možností představuje využití konceptu mapování a následného podrobného histopatologického vyšetření (ultrastaging) sentinelové uzliny u pacientek s onemocněním omezeným pouze na dělohu. Omentektomie je jako součást chirurgického stagingu rezerována pro pacientky s méně obvyklým histologickým nálezem serosního karcinomu, světlóbuňčného karcinomu (clear cell) či kacinosarkomu [56].

Fertilitu zachovávající léčba může být nabídnuta pacientkám ve stadiu FIGO IA s dobře diferencovaným endometriálním endometroidním adenokarcinomem omezeným pouze na endometrium (potvrzeno expertním ultrasonografickým a MRI vyšetřením). Princip této léčby spočívá v kontinuálním podávání gestagenu (megestrol acetát, medroxyprogesteron, levonorgestrel) s biopskou monitorací stavu endometria každých 6 měsíců. Pacientky, které se pro tuto variantu rozhodnou, by měly být poučeny o rizikovosti tohoto postupu a měli by podstoupit konzultaci v centru asistované reprodukce. Úspěšnost otěhotnění se v tomto případě pohybuje okolo 35%.[33]. Po naplnění rodinných plánů či při selhání léčby by měla být dokončena standardní operační léčba [40].

U pacientek s masivním postižením děložního hrdla je možné zvážit radikální hysterektomii, která může vést ke zlepšení lokoregionální kontroly [69]. Ostatní principy zůstávají shodné. U pacientek s mimoděložním postižením je indikován v rámci výkonu debulking postižených míst, v případě resekability.

Pro pacientky neschopné podstoupit primární chirurgickou léčbu, či s nálezem neresekabilních ložisek nemoci, přichází v úvahu jako varianta teleradioterapie ± brachyterapie, v indikovaném případě pak v kombinaci s chemoterapií. Chemoterapii lze využít i jako neoadjuvanci a operační výkon provést v druhé době v závislosti na léčebné odpovědi. Optimálním cílem je vždy dosažení nulového pooperačního residua tumoru [10].

Tabulka 2 Indikace k systematické pánevní (PLND) a paraaortální lymfadenektomii (PaLND) dle rizikových faktorů dle doporučení společností ESMO-ESGO-ESTRO [20]

Riziková skupina	Charakteristika rizik	PLND+ PaLND
Nízké riziko	Invaze do myometria pod 50% a Histolog. grade 1 či 2	Není doporučena
Střední riziko	Invaze do myometria nad 50% a Histolog. grade 1 či 2	Je ke zvážení za účelem stagingu
	Invaze do myometria pod 50% a Histolog. grade 3	Je ke zvážení za účelem stagingu
Vysoké riziko	Invaze do myometria nad 50% a Histolog. grade 3	Je doporučena

Adjuvantní léčba karcinomu endometria se řídí dle dat získaných stagingem a s přihlédnutím k rizikovým faktorům a zdravotnímu stavu pacientky. Mezi rizikové faktory zasahující do volby adjuvantní léčby patří věk pacientky, histologicky prokázaná lymfovaskulární invaze, velikost tumoru, postižení dolního děložního segmentu, histologický typ tumoru (serosní či světlouněčné tumory), grade 3 endometroidní endometriální karcinomy, hloubka invaze tumoru.

Pooperační adjuvantní radioterapie by měla být zahájena ideálně po zhojení poševního pahýlu – tedy cca za 6-8 týdnů, nejpozději však do 12 týdnů od operace [16, 50]. Radioterapii rozlišujeme na teleradioterapii a brachyterapii. Teleradioterapie je záření podávané zevně do oblasti pánve či oblasti paraaortálních uzlin. K co nejpřesnější distribuci radiační léčby je využíváno plánovacích CT či MRI vyšetření. Brachyterapie je nejčastěji podávána vaginálně na oblast poševního pahýlu, méně často do ponechané dělohy (předoperačně či primárně). Radioterapii lze využít i v rámci neoadjuvantní léčby. V případě primárně inoperabilních tumorů rozhoduje souhrn všech rizikových faktorů (ohledně možné diseminace onemocnění), zda bude k systémové léčbě nasazena samotná brachyterapie či v kombinaci s teleradioterapií.

Adjuvantní chemoterapie, nejčastěji v režimu Carboplatina/Paclitaxel, lze využít u pacientek s onemocněním omezeným na dělohu za přítomnosti významných rizikových

faktorů- například FIGO IB, histologický G3 [35]. Pacientky s prokázaným postižením mimo vlastní dělohu jsou vždy indikovány k adjuvantní léčbě (pakliže neexistuje její kontraindikace např. vzhledem k zdravotnímu stavu). U postižení omezeného čistě na lymfatické uzliny či adnexa je indikována chemoterapie v kombinaci s radioterapií. Je však možné aplikovat pouze radioterapii. U IV. stadia však chemoterapie zcela dominuje a radioterapie představuje její možný doplněk [49, 56, 61].

Ohledně detailního algoritmu adjuvantní terapie karcinomu endometria, která využívá kombinace teleradioterapie, brachyterapie a chemoterapie odkazují na aktuální schémata doporučení společností NCCN[56] a ESMO-ESGO-ESTRO [20]. Tato doporučení se také věnují follow up, paliativní léčbě i využití dalších léčebných metod (antiangiogenní léčba, hormonoterapie ...) a celkově sumarizují přehledným způsobem současné aktuální poznatky lékařské vědy pro praktické využití v běžné klinické praxi. Cílem této práce není detailní popis léčebné strategie, ale porovnání molekulárně biologické metody OSNA s histopatologickým ultrastagingem v diagnostice metastatického postižení sentinelových lymfatických uzlin u pacientek s karcinomem endometria.

7.7 Význam lymfatického systému v kontextu gynekologických malignit

Lymfatický systém je drenážní soustava, která se skládá ze spleti lymfatických kapilár, lymfatických cév a lymfatických uzlin sbíhajících se v ductus thoracicus a ústící do venózního systému. Lymfa hromadí se v mezibuněčných prostorech je tímto způsobem odváděna a recirkulována. Složení lymfy se podobá složení krevní plazmy s vyšším podílem bílkovinné složky a mění se v závislosti na tkáni, ze které pochází. Například lymfa vznikající z trávicí soustavy vykazuje vyšší koncentraci tuků, lymfa z jater má výraznější zastoupení bílkovinné složky atd. Lymfa má schopnost transportu větších částic v porovnání s krevním řečištěm. Lymfatické kapiláry drénují orgány, aby přivedly lymfu do aferentních cév mířících do lymfatických uzlin. Následně teče lymfa eferentními cévami dále směrem k ductus thoracicus a jím do venózního systému. Tumorózním buňkám je tak umožněno do tohoto systému vstupovat a vycestovávat do vzdálenějších lokalit – lymfogenní šíření. Typické oblasti lymfogenního šíření malignit gynekologických orgánů jsou regionální uzliny podél velkých cév v oblastech inguinálních, pánevních a paraaortálních [23].

Karcinomy endometria, ovaria, tuby či primárně peritoneální diseminují zpravidla do oblasti pánevních a paraaortálních uzlin, karcinomy děložního hrdla a pochvy do oblasti pánevních a poté paraaortálních uzlin a karcinomy vulvy diseminují zpravidla do uzlin inguinálních s možností následného zasažení uzlin pánevních [75]. Exstirpace lymfatických uzlin je jedna ze základních operačních dovedností onkogynekologa a je součástí stagingového či terapeutického algoritmu většiny gynekologických malignit. Informace o eventuálním postižení spádových lymfatických uzlin má přímý vliv na určení rozsahu postižení organismu tumorem a na rozsah operační i následné pooperační léčebné strategie. Z uvedeného vyplývá prognostický význam znalosti stavu lymfatického aparátu. Terapeutický význam systematické pánevní i paraaortální lymfadenektomie je nicméně dosud věcí široké diskuse a studií [34, 88].

Rozsah exstirpace lymfatických uzlin může variovat od exstirpace klinicky suspektních uzlin- uzlinový debulking, exstirpace jednotlivých klinicky nesuspektních uzlin předem identifikovaných jako strážné- exstirpace sentinelových uzlin, exstirpace náhodných uzlin z anatomicky dobře dostupných či empiricky predisponovaných lokalit- sampling lymfatických uzlin, až po vyjmutí všech uzlin včetně okolní tukově-lymfatické tkáně z anatomicky přesně definovaných oblastí drénujících postižený orgán – systematická lymfadenektomie (pánevní,

paraaortální, inguinální). Posledně jmenovaná možnost představuje nejradikálnější, technicky nejnáročnější variantu, s největším výskytem peroperačních i pooperačních komplikací [3, 57].

Dle operační techniky rozlišujeme laparotomickou (otevřenou), laparoskopickou či robotickou lymfadenektomií. Operační přístup může být transperitoneální či extraperitoneální [75].

Laparoskopický a laparotomický přístup v operační léčbě pacientek s karcinomem endometria analyzoval Walker et al a publikoval v roce 2012 výsledky studie LAP2 (zařazeno 2616 pacientek) porovnávající obě zmiňované možnosti. Laparoskopická skupina vykazovala sice signifikantně delší operační čas (204 vs. 103 minut), ale na její straně byla výrazně nižší frekvence pooperačních komplikací (14% vs. 21%), kratší doba hospitalizace (o 2 dny) a rychlejší rekonvalescence pacientek po výkonu v porovnání s laparotomickým přístupem [87]. Limitem této studie však bylo vysoké procento (25,8%) pacientek konvertovaných z laparoskopického na laparotomický přístup, například pro nepřehlednost dutiny břišní při laparoskopii.

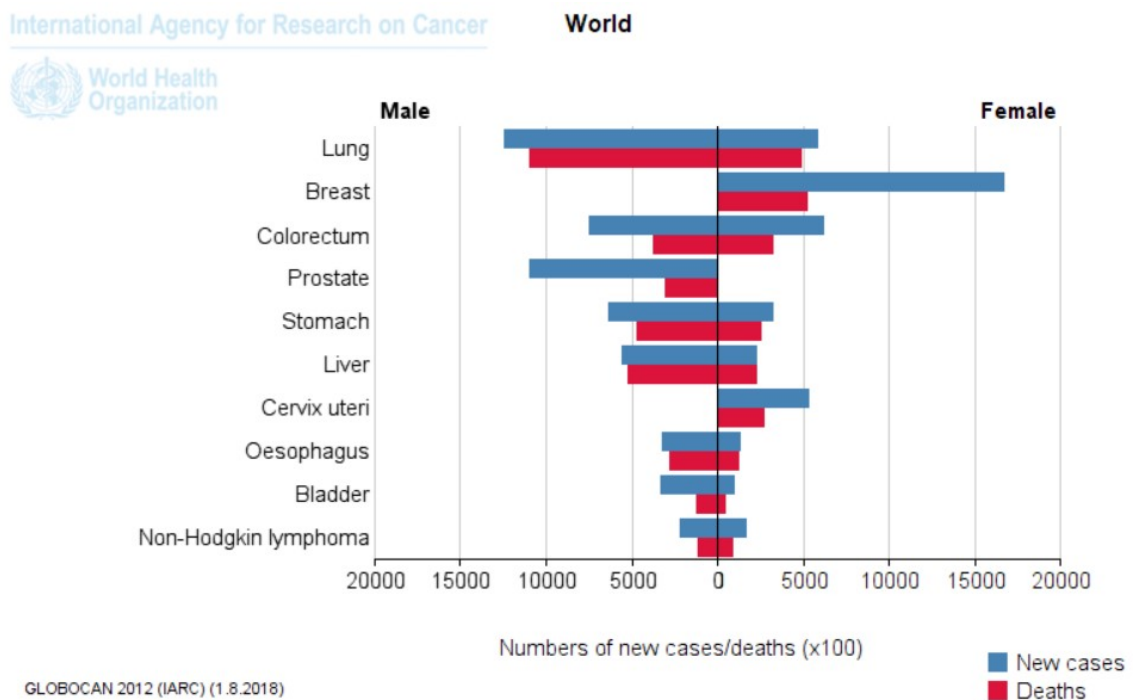
Další meta-analýza dat prokázala shodnou frekvenci výskytu peroperačních komplikací u obou přístupů [89]. Dosud publikovaná data tedy podporují miniinvazivní přístup, který se zdá být efektivně využitelný i u obézních polymorbidních pacientek v pokročilém věku. Právě tato nejohroženější skupina pacientek by z tohoto přístupu měla více profitovat [74, 80].

7.8 Detekce sentinelové uzliny karcinomu endometria

7.8.1 Obecný úvod

Princip konceptu sentinelové uzliny byl zaveden do klinické praxe prvně v sedmdesátých letech dvacátého století. Jednalo se o detekci strážných uzlin u pacientů s karcinomem penisu [17]. Následovalo využití této metody u pacientů s kožními melanomy a v současnosti je zřejmě nejrozšířenější uplatnění této metody u pacientek s karcinomy prsu, jakožto nejčastější ženské malignity vůbec (viz Obrázek 6) [44, 52]. Metoda detekce sentinelové uzliny je využívána (mimo karcinom prsu) u tří gynekologických malignit: karcinom děložního hrdla, karcinom vulvy a karcinom endometria.

Obrázek 6 Deset nejčastějších malignit, celosvětově (GLOBOCAN)



V porovnání se systematickou inguinální, pánevní či paraaortální lymfadenektomií představuje metoda detekce a exstirpace sentinelových uzlin variantu méně invazivní, a tudíž i spojenou s menším procentem peroperačních i pooperačních komplikací. Ukazuje se však, že tento koncept skýtá i výhodu přesnější detekce postižených uzlin, a to i v atypických lokalizacích, detekci makro/mikrometastáz či izolovaných metastatických buněk a v neposlední řadě s pomocí intraoperativního posouzení uzliny i peroperační triáž pacientek s možností upravit léčbu tzv. na "míru" [18].

Detekci sentinelové uzliny lze tedy provést jako samostatný výkon či kombinovat s provedením systematické lymfadenektomie s výsledným efektivním záchytem metastatického postižení s pomocí ultrastagingu.

Detekce strážné uzliny je k stagingu lymfatických uzlin v kombinaci s jejím histopatologickým ultrastagingem využívána u pacientek s diagnózou karcinomu děložního hrdla. Toho času je věcí intenzivního výzkumu, zda u tumorů v incipientním stádiu, omezených na děložní hrdlo, nepostačuje právě jen vyšetření sentinelové uzliny ve srovnání se standardním postupem zahrnujícím systematickou pánevní lymfadenektomii (například právě probíhající studie SENTIX).

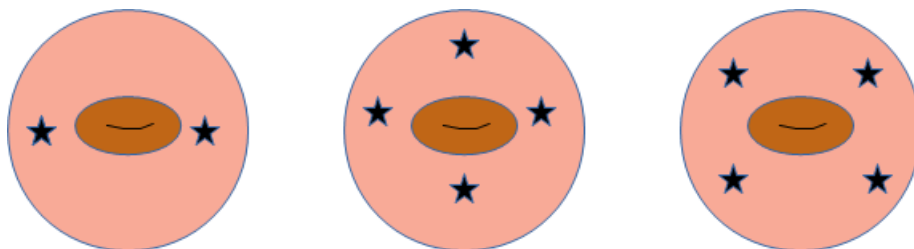
Nejčastějším místem lokalizace sentinelové uzliny v případě karcinomu děložního hrdla je oblast v okolí externích ilických uzlin a v oblasti interilické. V těchto dvou oblastech se nalézají asi 85% pánevních sentinelových uzlin [64]. Míra detekce se dle literatury pohybuje od 55-100% [83, 85]. Schopnost sentinelovou uzlinu detekovat je ovlivněna nejen zkušeností operačního týmu, ale i velikostí tumoru a také typem použitého traceru. Nejvíce se osvědčila aplikace kombinace ^{99m}Tc a patentní modři do tkáně v okolí tumoru- peritumorózně [63]. V poslední době se velice prosazuje využití fluorescenčního traceru indocyaninové zeleně (ICG). Dle dostupných dat se bilaterální detekce sentinelových uzlin touto metodou pohybuje okolo 80% [41].

V roce 2008 byly publikovány výsledky studie GROINS V zabývající se uplatněním konceptu sentinelové uzliny u pacientek s karcinomem vulvy s unifokálním postižením, tumorem menším než 4cm, bez zvětšených či klinicky suspektních uzlin. Na základě těchto dat byl koncept převzat do doporučených postupů onkologických společností a do klinické praxe [84]. Standardním postupem je v tomto případě opět využití kombinace ^{99m}Tc a patentní modři, neboť kombinace obou tracerů vykazuje vyšší úspěšnost detekce než jejich samostatné použití, současně se tato varianta jeví i jako nejefektivnější z hlediska nákladů [76].

U karcinomu endometria použil prvně metodu detekce sentinelové uzliny v roce 1996 autorský tým Burke et al. Jednalo se o subserosní aplikaci isosulfanové modři do myometria během laparotomického výkonu [15].

Aplikace konceptu sentinelové uzliny do běžné klinické praxe je však v případě karcinomu endometria vzhledem ke komplikovaným anatomickým souvislostem složitější, než je tomu v případě karcinomů děložního hrdla či vulvy. Zatím bylo testováno několik druhů tracerů a současně několik způsobů jejich aplikace lišících se jak místem (subserosní, intracervikální, submukozní) tak způsobem (laparoskopicky, laparotomicky, hysteroskopicky, intracervikálně). V současnosti nabývá na převaze intracervikální aplikace traceru či tracerů kombinovaně superficiálně (1-3mm) a do hloubky stromatu děložního hrdla (1-2cm) pro svoji dobrou reprodukovatelnost a uspokojivou schopnost detekce [9, 20, 56]. Aplikace traceru intracervikální cestou probíhá buď do každého kvadrantu zvlášť (4 vpichy) či do dvou vpichů u čísel 3 a 9 (Obrázek 7)

Obrázek 7 Místa intracervikální aplikace tracerů



7.8.2 Anatomie lymfatického systému ženského genitálu

Detailní znalost anatomie lymfatického systému je zásadní pro pochopení problematiky lymfogenního šíření karcinomů. Následující text podává stručný přehled anatomických souvislostí významných pro klinickou praxi [23].

Součástí mízního systému jsou mízní cévy – *vasa lymphatica* a mízní uzliny – *noduli lymphatici*, kterými protéká míza – *lymfa* do žilního systému. Tento lymfatický systém je součástí imunitního systému člověka.

Mezibuněčné prostory vaziva představují počátek tohoto systému, neboť obsahují mízní kapiláry – *vasa lymphocapillaria*, které posléze vytvářejí síť kapilár – *rete lymphocapillare*. Hustota a uspořádání kapilární sítě je specifická pro každý orgán.

Mízní kapiláry mají tenkou stěnu tvořenou jedinou vrstvou endotelových buněk většinou bez *lamina basalis*. Mezi jednotlivými buňkami jsou četné štěrby o šíři až 2 μm. Toto specifické uspořádání umožňuje rychlý průnik lymfy do kapilár, resorpci tuků, bílkovin, větších (i cizích) částic ale také *maligních buněk*. Tímto způsobem je zajištěn návrat tekutin a větších částic zpět do systémového oběhu. Je tak zabráněno otoku, který by nahromaděním tekutin v tkáni vznikl. Stejně jako velké částice pronikají do lymfatických cév i živé buňky některých nádorů. Tímto způsobem pak dochází k jejich metastatickému rozsevu – *lymfogenní šíření*.

Síť kapilár se následně sbíhá v sběrné mízní cévy – *collectores lymphatici*, nebo též *vasa lymphatica*. Tyto cévy mají typicky umístěné chlopně blízko nad sebou a uspořádané do dvojic. Jejich úkolem je usměrnění toku lymfy jedním směrem. Jejich poškození (např. nádorem, zánětem či mechanicky) pak může být příčinou retrográdního šíření infekce či nádorových buněk. Stěna těchto cév je tvořena třemi vrstvami: *tunica intima*, *tunica media* a *tunica adventitia*. Jako *vasa afferentia* jsou značeny cévy vedoucí mízu do lymfatické uzliny, *vas efferens* (zpravidla jen jedna) je pak céva odvádějící mízu z uzliny. Vystupuje v oblasti *hilu* uzliny. *Trunci lymphatici*, tedy mízní kmeny, jsou tvořeny spojením mízních cév a vedou mízu z celých skupin mízních uzlin.

Míza je tvořena zejména tkáňovým mokem, který prostupuje stěnou kapiláry do jejího lumen. Součástí mízy jsou také ve vodě rozpustné i nerozpustné živné látky. Barva mízy je bělavá, nažloutlá či opakní a je odvislá od jejího složení (vysoký obsah tuku dává míze bělavý

nádech). Nedílnou součástí obsah lymfy je vysoký podíl lymfocytů. Hlavní mízovod *ductus thoracicus* má obsah až 40 000 lymfocytů na 1mm³.

Mízní uzlina je orgán ledvinovitého tvaru o velikosti od 1 do 30 mm šedorůžové barvy. Po jejím obvodu vstupují *vasa afferentia* a z jejího *hilu* pak vystupuje jedna *vas efferens*. Skupiny uzlin odvádějící mízu z určité oblasti se nazývají *regionální uzliny*.

Lymfatická uzlina má na svém povrchu pevnou vrstvu *capsulu*, směrem do *hilu* z něj vycházejí vazivové trámce – *trabeculae* z nichž odstupuje *reticulum*. Jedná se o prostorovou síť buněk a vláken. Oblast průtoku lymfy se nazývá *sinus*, míza zde obtéká místa s vysokou koncentrací lymfocytů, lymfatické uzlíky – *folliculi lymphatici*. V centru uzliny se nalézá *medulla*, dřev uzliny s hustou lymfatickou tkání a vysokým počtem plasmatických buněk. Každá mízní uzlina má své tepenné zásobení a žilní drenáž.

Mízní uzlina je důležitou součástí obranného systému organismu a hraje svoji roli nejen v buněčné ale i humorální imunitě. Lymfatickou uzlinu si můžeme představit jako efektivní filtrační systém, který pomocí makrofágů vychytává z mízy nežádoucí částice, ale zároveň zprostředkovává kontakt antigenů s imunokompetentními buňkami, které tak mohou zahájit tvorbu příslušných protilátek. Při masivnější stimulaci uzliny (infekce, tumorové buňky ...) dochází k její výrazné aktivaci a zduření podmíněné proliferací v zárodečných centrech uzliny. Mezi orgány lymfatického systému krom lymfatických uzlin patří i tonsily, slezina a thymus.

V následujícím výčtu bude uvedena vždy skupina uzlin v pořadí, v jakém je míza postupně odváděna i se svoji *tributární oblastí*:

Nodi iliaci externi zabezpečují odvod mízy z dolní končetiny a příslušné pánevní stěny. Částečně drénují i mízu z močového měchýře či klitorisu. Míza pak pokračuje dále do *nodi lymphatici iliaci communes*.

Nodi iliaci interni odvádí mízu z pánevní stěny a pánevního dna. Dále se pak starají o odvod z kyčelních a hýžd'ových svalů a pánevních orgánů. Jejich obsah se vlévá do *nodi lymphatici iliaci communes*.

Nodi sacrales jsou lymfatické uzlíky umístěné po vnitřní ploše pánevní kosti drénující zadní část pánevní stěny, pánevní dno, rektum, děložní hrdlo a poševní klenby. Jejich odtok je pak směřován k *nodi lymphatici iliac interni* či *communes*.

Tributární oblast *nodi lymphatici iliaci communes* viz výše. Z nich pokračuje míza do *nodi lymphatici lumbales* umístěných podél břišní aorty (*paraaortici*) a podél dolní duté žíly (*cavales*). Sem je přijímána, kromě již zmiňovaných oblastí, míza z břišní stěny a z ovarii.

Truncus lumbalis dexter et sinister vzniká stékáním mízy z kraniálnějších lumbálních uzlin, aby se pak spojily v *cisterna chyli*. Z ní posléze mízu vyvádí dále kraniálně *ductus thoracicus*.

Mezi další skupiny lymfatických uzlíků v souvislosti s orgány malé pánve patří: *nodi paravesicales* (tributární oblastí je močový měchýř), *nodi paravaginales* (uložené laterálně při vaginální stěně), *nodi parauterini* (umístěné při hraně děložní, patří mezi ně i Bayerova uzlina v místě křížení ureteru a uterinní arterie), *nodi pararectales* (umístěné po stranách rekta), *nodi rectales superiores* (při dolní mesenterické tepně).

Samostatnou zmínku si v kontextu této práce zaslouží derivace mízy z centrálního orgánu malé pánve – z dělohy. Do *nodi lumbales* je odváděna míza z rohů a hran děložních podél ovarických cév. Z děložního těla je míza odváděna cestou *nodi parauterini* (tedy i Bayerovou uzlinou) do *nodi iliaci interni*. Děložní hrdlo má svůj hlavní odtok cestou *nodi sacrales*, ev. *nodi pararectales* podél sakrouterinního vazů.

7.8.3 Přehled způsobů detekce sentinelové uzliny u karcinomu endometria

Většina nodálního metastatického postižení se nachází v pánevní oblasti. Atypické lokalizace nodálního postižení, jako je například lokalizace presakrální, parametriální či izolované postižení paraaortálních uzlin, se nachází pouze asi ve 2- 10 % případů [18, 68, 79, 82]. Implementace konceptu mapování sentinelové uzliny teoreticky umožňuje detekci nejexponovanějších uzlin nejen v pánevní oblasti, ale zvyšuje pravděpodobnost úspěšné detekce potenciálně postižených uzlin právě i v méně obvyklých lokalizacích.

Zásadním ukazatelem úspěšnosti metody je schopnost oboustranné detekce sentinelových uzlin. Ta se dle dostupné literatury pohybuje okolo 80 % a nejčastěji ji dosahujeme při použití kombinace dvou tracerů – ^{99m}Tc a patentní modři, podobných výsledků dosahuje samostatně i ICG [41, 63]. Otázkou však zůstává i místo aplikace traceru, neboť z anatomické znalosti lymfatické drenáže je jasné, že odtok lymfy je z oblastí děložního těla směřován do několika hlavních směrů (viz pododíl 7.8.2).

Metody detekce můžeme proto rozdělit z pohledu:

- aplikovaného traceru (značkovací látky)

Visuální detekce lymfatických cest a spádových uzlin například pomocí *metylenové modři* či *isosulfanové modři*. Je však třeba vzít v potaz možnost alergické/anafylaktické reakce pacientky na tyto látky, která se pohybuje okolo 1% [4].

Aplikace *radionuklidu 99mTc* a jeho následná předoperační scintigrafická detekce či intraoperační detekce gamma sondou. Častá je jeho kombinace s ostatními typy tracerů k zvýšení míry detekce sentinelových uzlin [66]. Jeho použití však vyžaduje vysokou míru kooperace se specialisty z oboru nukleární medicíny.

Indocyaninová zeleň (ICG) je fluorescenční látka viditelná v infračerveném světelném spektru. Jedná se o látku využitelnou napříč chirurgickými obory, umožňuje kromě detekce sentinelových uzlin například i zobrazení míry prokrvenosti střevních anastomóz či užití v hepatobiliární chirurgii. Míra alergického/anafylaktického rizika je velice nízká (udává se 1/42000) [36]. S výhodou je využití tohoto traceru u obézních pacientů. Nevýhodou je vyšší pořizovací cena vybavení i vlastního traceru [37].

- způsobu a místa aplikace

Hysteroskopickou aplikaci traceru peritumorálně, tedy pod přímou visuální kontrolou, testoval na 60 pacientkách Delaloye et al. Tým dosáhl 82% úspěšnosti [25]. Jedná se však o obtížně zvladatelný, komplikovaný způsob detekce [66].

Subserosní aplikace traceru/tracerů do více míst děložního těla, což by mělo umožnit teoreticky nejpřesnější pokrytí spádových uzlin, představuje druhou možnost. Během laparotomického či laparoskopického výkonu Robová et al demonstrovali na 67 pacientkách tento způsob detekce (kombinace 99mTc a patentní modři), dosáhli tak při 4 místech aplikace do děložního těla 73% úspěšnosti [65].

Nejjednodušší způsob podání značkovací látky je *intracervikální cestou*, tedy stejným způsobem jako v případě mapování sentinelových uzlin karcinomu děložního hrdla. Rozdíl spočívá v aplikaci látky nejen superficiálně (1-3mm hloubka vpichu), ale

následně i do hloubky stromatu děložního hrdla (hloubka vpichu 1-2cm) čímž je zajištěna distribuce této látky i do kraniálních oblastí dělohy. Jako první publikoval tento způsob aplikace Holub et al a dosáhl 84% detekce u 25 pacientek při využití pouze patentní modři [38]. V roce 2012 popsal Barlin et al na souboru 498 pacientek 81% úspěšnost detekce při použití kombinace patentní modři a ^{99m}Tc [9].

8 Využití molekulárně biologické metody One-Step Nucleic Acid Amplification (OSNA) při vyšetření sentinelových lymfatických uzlin u pacientek s karcinomem endometria

8.1 Cíle disertační práce

Hlavním cílem disertační práce je porovnání molekulárně biologické metody OSNA s histopatologickým ultrastagingem při vyšetření sentinelových uzlin karcinomu endometria. Tato nová metoda by mohla vést ke zpřesnění detekce jejich mikrometastatického a makrometastatického postižení.

Jako nejvíce exponovaná součást lymfatického systému byla za tímto účelem vybrána sentinelová uzlina. V současnosti je zlatým standardem zpracování lymfatických uzlin histopatologické vyšetření řezů hematoxylinem eozinem. V případě sentinelových uzlin je k jejich co nejpřesnějšímu vyšetření používán dokonce tzv. ultrastagingový protokol kombinující barvení hematoxylinem eozinem s imunohistochemickým vyšetřením a vyšší četností řezů (například a 150-200 μm). Tímto způsobem je umožněna detekce nejen na úrovni mikrometastáz (nad 0,2 μm – 2mm), ale dokonce i jednotlivých shluků izolovaných tumorových buněk do velikosti 0,2 μm .

Smyslem této práce je vyhodnocení molekulárně biologické metody One-Step Nucleic Acid Amplification (OSNA) v detekci mikrometastáz a makrometastáz v sentinelové uzlině. Metoda je založena na detekci mRNA cytokeratinu 19 při kompletním intraoperativním zpracování sentinelových uzlin u pacientek s karcinomem endometria. Tato metoda zpracovává uzlinu celou, nikoliv jen její vybrané řezy. Výsledek je zpravidla dostupný již intraoperativně a to do 30minut.

Primárním cílem bylo popsat sensitivitu, specificitu a diagnostickou shodu metody OSNA v porovnání s podrobným histopatologickým vyšetřením sentinelových uzlin na úrovni ultrastagingu.

Mezi sekundární cíle studie patřily tyto body:

- Jak by detekce uzlinových metastáz metodou OSNA ovlivnila staging pacientek
- Úspěšnost detekce polohy sentinelové uzliny u karcinomu endometria, a to laparoskopickou i laparotomickou cestou.
- Potvrzení vzájemného vztahu exprese CK 19 primárním tumorem (imunohistochemickým vyšetřením) a zachycením mRNA CK19 metodou OSNA ve vzorku uzliny.

Hypotéza studie:

- Metoda One-Step Nucleic Acid Amplification by mohla představovat efektivní intraoperativní nástroj detekce metastatického postižení lymfatických uzlin na úrovni ultrastagingu.

Je třeba zdůraznit, že metoda OSNA je schopna definitivního výsledku dosáhnout do cca 30 minut. Současné vyšetřovací metody, zejména ultrastagingový protokol, jsou časově náročnější (v řádu několika dnů). Rychlá dostupnost co nejpřesnějšího výsledku vyšetření je s výhodou nejen pro gynekologa operátora, ale i pro pacientku, která tak zásadní informaci o vyšetření sentinelové uzliny získá ihned po operaci, což snižuje její psychickou zátěž [7].

Limitem jakékoliv studie zabývající se právě touto metodou je však fakt, že vzorek zpracovaný metodou OSNA již nelze zpětně histologicky vyšetřit a ověřit tak závěry testované metody. Stejný princip platí i opačně, vzorek zpracovaný histologicky či imunohistochemicky nelze již vyšetřit metodou OSNA. Tuto skutečnost se snažíme v naší studii kompenzovat důmyslným systémem prokrájení uzliny a rovnoměrnou distribucí takto vzniklých řezů mezi zkoumanou metodou OSNA a standardní ultrastagingové vyšetření. Detailněji viz metodika studie.

8.2 Výběr pacientek vhodných do studie

Vstupním kritériem pro zařazení pacientky do studie byl histologicky potvrzený karcinom endometria, posuzováno podle aktuální histologické klasifikace WHO z roku 2014 [58].

Předoperačně bylo u všech pacientek provedeno expertní USG vyšetření břicha a pánve. Expertní USG vyšetření bylo provedeno vždy transvaginálně i transabdominálně. Cílem byl detailní popis děložní dutiny, endometria, myometria, adnex, peritoneálních povrchů, přítomnost volné tekutiny, pánevních a paraaortálních uzlin. Vyšetření bylo provedeno vždy jedním ze dvou certifikovaných USG specialistů a z každého vyšetření byl proveden podrobný záznam dle standardů našeho centra [28, 29]. V případě potřeby bylo doplněno CT vyšetření břicha a pánve k vyloučení šíření tumoru mimo dělohu a retroperitoneálně. Pacientky se zvětšenými nebo suspektně postiženými uzlinami nebyly do studie zařazeny.

Studie byla schválena etickou komisí Plzeňské Lékařské Fakulty UK Praha a Fakultní Nemocnice v Plzni. Všechny pacientky podepsaly informovaný souhlas s dobrovolnou účastí na studii. Studie byla registrována na ClinicalTrials.gov pod ID: NCT02826291.

8.3 Metodika studie

8.3.1 Mapování sentinelové uzliny

Detekce SLNs probíhala několika postupy. U první části pacientek (42; 72,4 %) bylo do všech čtyř kvadrantů děložního hrdla nejprve superficiálně (1-3mm) a poté hlouběji do stromatu děložního hrdla (10-20mm) aplikováno celkem 2ml 1% roztoku Bleu Patente a 8ml roztoku nanokoloidu ^{99m}Tc -albumin o dávce 50MBq. Aplikace proběhla tenkou jehlou o síle 23 gauge.

U ostatních pacientek byla použita stejnou technikou a v identické dávce samostatně Bleu Patente (9; 15,5%; provedeno pro dočasnou nedostupnost Technecia), či aplikace indocyanine green (6; 10,3%) v celkové dávce 2,5mg, ředěno do 2ml Aqua pro injectione. V případě použití indocyanine green (ICG) proběhla aplikace traceru superficiálně a hlouběji do stromatu u č. 3 a 9. V jednom případě (1; 1,7%) byl mapping proveden pouze pomocí Technecia, vzhledem k riziku alergické reakce pacientky na Bleu Patente.

Sentinelové uzliny byly detekovány během operace přímou visualisací (Bleu Patente), pomocí gama sondy (^{99m}Tc) či metodami detekce infračervené fluorescence (ICG).

8.3.2 Očištění a prokrájení sentinelové uzliny

Po vyjmutí byla sentinelová uzlina za sterilních podmínek mechanicky očištěna skalpelem od okolní tukové tkáně. Sentinelové uzliny větší než 5mm byly paralelně ke krátké ose uzliny prokrájeny po 2mm. Sentinelové uzliny velikosti 5mm a méně byly podélně rozkrojeny na dvě stejné poloviny. Byly zachovány sterilní podmínky k zabránění kontaktu tkáně uzliny s epitely a tím potenciální kontaminaci CK19 a možné falešné pozitivivity při vyšetření metodou OSNA.

Liché řezy byly odeslány k vyšetření metodou OSNA, sudé řezy k histopatologickému a imunohistochemickému vyšetření na úrovni ultrastagingu.

8.3.3 Zpracování sentinelových uzlin patologem

Části sentinelové uzliny určené k histopatologickému zpracování o síle 2mm byly fixovány v 10% formalinu, následně zality do parafinových bločků, prokrájeny mikrotomy a vyšetřeny dle ultrastagingového protokolu.

Byly získány vždy dva po sobě následující řezy o síle 2 μm v intervalu 150 μm . První řez byl obarven hematoxylinem eozinem (H&E) a druhý imunohistochemicky vyšetřen detekcí nízkomolekulárními cytokeratiny (CK MNF 116), včetně detekce CK19 pomocí monoklonální protilátky A53-B/A2.26 (Ventana med. systems, protokol automat Ventana).

Imunohistochemická detekce CK19 k potvrzení jeho exprese, proběhla současně i u primárního tumoru.

Z jedné uzliny bylo prohlédnuto v průměru okolo 40 řezů. Uvedený protokol odpovídá ultrastagingovému protokolu zpracování sentinelových uzlin na naší instituci a umožňuje detekci až na úroveň jednotlivých izolovaných tumorových buněk (ITC). Metastatické léze > 2mm byly hodnoceny jako makrometastázy, léze mezi 2mm a více jak 0,2 mm jako mikrometastázy, léze $\leq 0,2\text{mm}$ byly hodnoceny jako izolované tumorové buňky (ITC).

8.3.4 Zpracování sentinelových uzlin metodou OSNA

One-step Nucleic Acid Amplification (OSNA) je metoda zabývající se detekcí mRNA cytokeratinu CK19 v lymfatických uzlinách po homogenizaci vzorku celé uzliny (eventuálně částí uzliny v případě této studie) s využitím techniky reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). Cytokeratin 19 je filamentum cytoskeletu epiteliálních buněk, ale i buněk karcinomů a jejich metastáz. Normální lymfatická tkáň CK 19 neexprimuje.

Pomocí isotermické amplifikace je metoda OSNA schopna detekovat počty kopií mRNA CK19. Zpracována je celá uzlina, nikoliv jen některé její řezy. Výsledek je operátorovi dostupný již během 20-30 minut.

Během našeho vyšetření byly 2mm silné částky uzliny určené k OSNA zpracování homogenizovány a byl vytvořen lyzát. Lyzát byl následně centrifugován a poté vložen do

přístroje RD 100i (Symex, Kobe, Japan), kde proběhla isotermická amplifikace mRNA metodou RT-LAMP [81].

Vyšetření metodou OSNA proběhla standardním způsobem včetně kalibrace přístroje RD-100i (Symex, Kobe, Japan). Pro potřeby studie byly použity cutoff hodnoty metody OSNA zavedené pro popisování mikro či makrometastáz uzlin u karcinomu prsu (zatím tyto hodnoty nejsou pro karcinom endometria pevně stanoveny). Hodnoty < 250 kopií CK19mRNA / μ l jako negativní, od 250 do 4999 kopií CK19mRNA / μ l jako mikrometastázy a 5000 a více kopií CK19mRNA / μ l jako makrometastatické postižení.

Uzlina s hodnotou ≥ 250 kopií CK19 mRNA / μ l byla tedy hodnocena a statisticky zpracována jako pozitivní. Expres CK19 karcinomem endometria byla vždy imunohistochemicky ověřena i v primárním tumoru.

8.3.5 Statistické zpracování dat

Data charakterizující skupinu pacientek zařazených do studie byla zanesena do přehledového tabulkového záznamu (Tabulka 3-6) a Vennova diagramu 1 a 2 (Obrázek 8 a 9), následně proběhlo statistické vyhodnocení dat, s popisem procentuálního zastoupení konkrétních jevů ve zkoumané populaci, či její části. Hlavním cílem byl pak popis sensitivity, specificity a konkordance metody OSNA v porovnání s kombinací histopatologického a imunohistochemického vyšetření na úrovni ultrastagingu.

Statistické vyhodnocení porovnání četností záchytů metastáz, metodou OSNA a ultrastagingem, v sentinelových uzlinách bylo provedeno metodou Chi-square without Yates correction.

8.4 Výsledky studie

8.4.1 Charakteristika pacientek

Celkem bylo do studie zařazeno 58 pacientek operovaných v období do 4/2016 do 1/2018 a dle protokolu studie vyšetřeno 135 SLN (Tabulka č. 3).

Během každého vyšetření patologem byla provedena i imunohistochemická verifikace exprese CK19 v tumorózní tkáni. U všech pacientek byla exprese CK19 tumorem potvrzena.

Tabulka 3			
Charakteristika pacientek N=58, SLN's N =135			
Věk (median)		65,5	(31-81)
BMI (median)		31,8	(17-44,9)
Počet SLN		135	100 %
Oboustranný SLN mapping		54	93,1 %
Počet SLNs na pacientku (median)		2	(1-5)
Histologie karcinomu			
	endometroidní	54	93,1 %
	Světlobuněčný	2	3,4 %
	Serózní	1	1,7 %
	Karcinosarcom	1	1,7 %
Histologický grade			
	1	33	56,9 %
	2	16	27,6 %
	3	9	15,5 %
LVSI			
	Ano	45	77,6 %
	Ne	13	22,4 %
FIGO stadium			
	I	45	77,6 %
	II	7	12,1 %
	III	6	10,3 %

8.4.2 Výsledky detekce sentinelových uzlin

K detekci sentinelové uzliny bylo u většiny pacientů (42; 72,4%) použito intracervikální aplikace kombinace tracerů Bleu Patente a ^{99m}Tc před počátkem operace. U 54 ze 58 (93%) případů patientek zařazených do studie bylo dosaženo bilaterálního mappingu, u 4 (7%) patientek se podařilo lokalizovat sentinelové uzliny pouze jednostranně.

Nejčastěji byla sentinelová uzlina lokalizována v oblasti externího ilického cévního svazku (76,3%), druhou nejčastější lokalitou bylo uložení sentinelové uzliny v obturatorní fosse (14,8%). Všechny nalezené sentinelové uzliny se nacházely v oblasti pánve či presakrálně, během této studie nebyla nalezena žádná sentinelová uzlina v paraaortální oblasti.

8.4.3 Porovnání závěrů metody OSNA s ultrastagingem (H&E a IHC CK19)

Celkem bylo na přítomnost metastatického postižení vyšetřeno 135 uzlin. Jako negativní bylo všemi třemi metodami (H&E a IHC CK19, OSNA) označeno 103 uzlin, zbylých 32 uzlin bylo pozitivních alespoň podle jedné z těchto metod. Pozitivně byla uzlina hodnocena pouze v případě prokázání přítomnosti makro či mikrometastázy, naopak přítomnost ITC byla hodnocena jako negativní. Všechny tři metody se shodly na pozitivitě u 10 (13,5 %) sentinelových uzlin.

Metodou H&E i pomocí IHC CK19 bylo detekováno 11 pozitivních sentinelových uzlin. Metoda OSNA detekovala pozitivitu v dalších 18 uzlinách (>250 kopií CK19 mRNA/ μl), které byly ultrastagingovým přístupem označeny jako negativní. Pouze v jednom případě nastala situace, kdy bylo pomocí H&E a IHC CK19 detekováno metastatické postižení uzliny na úrovni mikrometastázy, zatímco OSNA označila materiál z této uzliny jako negativní (viz Tabulka 4 a Obrázek 8).

Ve třech vzorcích sentinelových uzlin byly patologem detekovány benigní epiteliální inkluze. Jednalo se o primární detekci při imunohistochemickém vyšetření vzorku s následným posouzením morfolgie nálezu v obraze barveném H&E. Všechny tyto tři případy byly patologem definitivně hodnoceny jako benigní nález, tudíž ultrastaging negativní. V případě jedné z těchto tří uzlin byl materiál z této uzliny hodnocen metodou OSNA jako pozitivní na mikrometastázu. Histologická kontrola tohoto vzorku, za účelem rozlišení benigního nálezu epiteliálních inkluzí od metastatického postižení, ale z charakteru metody není možná.

V případě jedné uzliny byly patologem detekovány izolované tumorové buňky (ITC), v rámci studie byla tato uzlina definitivně hodnocena jako ultrastaging negativní. Metoda OSNA tuto uzlinu vyhodnotila jako negativní (Tabulka 4 a Obrázek 8).

Tabulka 4 sumarizuje porovnání pozitivitu a negativitu metody OSNA a ultrastagingu v definitivním hodnocení sentinelových lymfatických uzlin. Na základě těchto výsledků byla počítána sensitivita, specifická a konkordance použitých metod.

Detekce metastatického postižení sentinelových lymfatických uzlin metodou OSNA ve srovnání s ultrastagingem, jako referenční metodou, dosáhla

- **sensitivity 90,9%**
- **specificity 85,5%**
- **concordance 85,9%**

Prokázali jsme, že OSNA má statisticky signifikantně větší podíl záchytu pozitivních sentinelových uzlin (**$p \leq 0,0033$**).

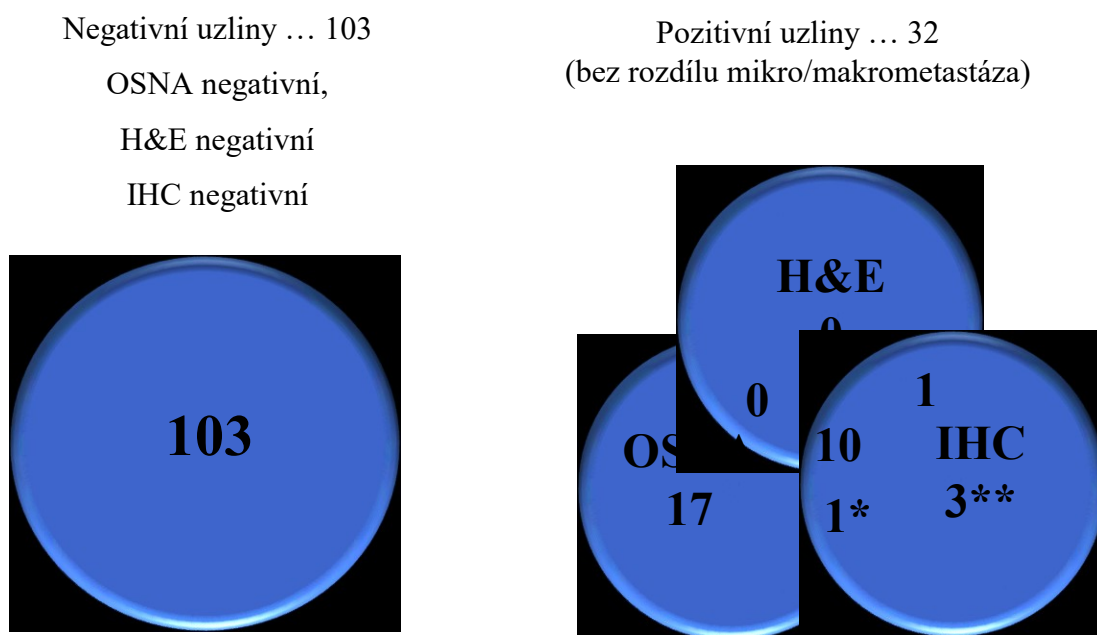
Tabulka 4 Výsledky hodnocení sentinelových uzlin – histopatologický ultrastaging vs. OSNA

Sentinelové uzliny (n=135)	Histopatologický ultrastaging (kombinace H&E+IHC)	
	Ultrastaging pozitivní	Ultrastaging negativní
OSNA pozitivní	10	18*
OSNA negativní	1	106**

* toto číslo obsahuje jednu OSNA pozitivní uzlinu se záchytem benigních epiteliálních inklusí ve vzorku hodnoceném patologem, histopatologicky (ultrastaging) vyhodnocena jako negativní (17+1)

** všechny uzliny definitivně hodnocené ultrastagingem jako negativní, zde obsaženy také 2 uzliny se záchytem benigních epiteliálních inklusí a 1 uzlina s ITC (103+3)

Obrázek 8 Vennův diagram, výsledky vyšetření sentinelových uzlin – vztah metod IHC, H&E a OSNA, Počet uzlin ...135



1*... histopatologicky detekovány benigní intraepitheliální inkluse, v celkovém hodnocení vyhodnoceno jako ultrastaging negativní, OSNA pozitivní
3**... histopatologicky ve dvou případech detekovány benigní intraepitheliální inkluse, v jednom případě ITC, v celkovém hodnocení vyhodnoceno jako ultrastaging negativní, OSNA negativní

8.4.4 Porovnání metod ve smyslu schopnosti detekce mikrometastáz či makrometastáz

Kromě porovnání schopnosti metod detekovat vlastní metastatické postižení uzlin jsme porovnali jednotlivé metody (OSNA, H&E a IHC CK 19) z hlediska schopnosti detekovat mikro či makrometastatického postižení.

V případě 26 sentinelových uzlin bylo popsáno metastatické postižení metodou OSNA ve smyslu makro/mikrometastáza, avšak tento výsledek se neshodoval se závěrem ostatních metod- H&E či IHC. Metody nepřinesly shodu výsledku buď ve smyslu vlastní detekce metastatického postižení uzliny, nebo v míře metastatického postižení – makrometastáza vs. mikrometastáza. Nejedná se tedy o všechny OSNA pozitivní sentinelové uzliny, ale o ty, jejichž závěr z vyšetření OSNA a z ultrastagingu nebyl naprosto identický.

U jedné SLN metoda OSNA zaznamenala negativní výsledek, přestože H&E a IHC CK19 vyšetření bylo pozitivní pro mikrometastatické postižení.

U pěti SLN's všechny metody detekovaly přítomnost metastatického postižení, avšak neshodovaly se v míře jeho rozsahu (mikro či makrometastáza).

Ze 17 SLN's, které byly detekovány jako pozitivní metodou OSNA a negativní metodami H&E a IHC CK19, bylo 14 z nich metodou OSNA pozitivní pro mikrometastázu, zatímco ostatní metody poskytly negativní závěr. U třech SLN's metoda OSNA detekovala dokonce makrometastatické postižení při negativitě H&E a IHC CK19.

V jedné SLN byly patologem popsány ITC, dle metody OSNA byla uzlina pozitivní na mikrometastázu. U dvou SLN's s pozitivitou IHC vs. H&E a OSNA negativitou a jedné SLN s IHC a OSNA pozitivitou vs. H&E negativitou byly popsány ektopické epiteliální inkluse. Tyto případy byly hodnoceny patologem jako 3 falešně pozitivní výsledky. Tyto diskordantní přehledným způsobem sumarizuje Tabulka 5.

Tabulka 5 Charakteristika diskordantních nálezů uzlin

SLN	Histologie	Grade	LVSI	H&E	OSNA	IHC	mRNA CK19 copy/ μ l	komentář
1.	Endometr.	1	Ano	++	+	++	1300	
2.	Endometr.	2	Ne	-	+	-	1400	
3.	Clear cell	3	Ano	++	+	++	620	
4.	Clear cell	3	Ano	++	+	++	270	
5.	Endometr.	2	Ano	-	+	-	270	
6.	Endometr.	2	Ano	-	+	-	620	
7.	Endometr.	1	Ne	-	+	-	620	
8.	Endometr.	1	Ne	-	+	-	270	
9.	Clear cell	3	Ano	-	+	-	410	
10.	Clear cell	3	Ano	-	+	-	270	
11.	Endometr.	2	Ne	-	++	-	35000	
12.	Endometr.	2	Ne	-	+	-	3800	
13.	Endometr.	1	Ne	-	++	+	5200	Epiteliální inkluze
14.	Endometr.	1	Ne	-	-	+	<250	Epiteliální inkluze
15.	Endometr.	1	Ne	-	+	-	710	
16.	Endometr.	1	Ne	-	+	-	470	
17.	Endometr.	3	Ano	++	+	++	710	
18.	Endometr.	2	Ano	-	++	-	13000	
19.	Endometr.	1	Ne	+	-	+	<250	
20.	Endometr.	2	Ne	-	+	-	260	
21.	Endometr.	2	Ne	-	+	-	400	
22.	Endometr.	1	Ano	-	+	+	920	Izolované tumorové bb.
23.	Endometr.	3	Ano	++	+	++	1800	
24.	Endometr.	1	Ne	-	-	+	<250	Epiteliální inkluze
25.	Endometr.	3	Ne	-	+	-	2100	
26.	Serózní	3	Ne	-	+	-	410	
(+) (+) mikrometastáza (++) makrometastáza								

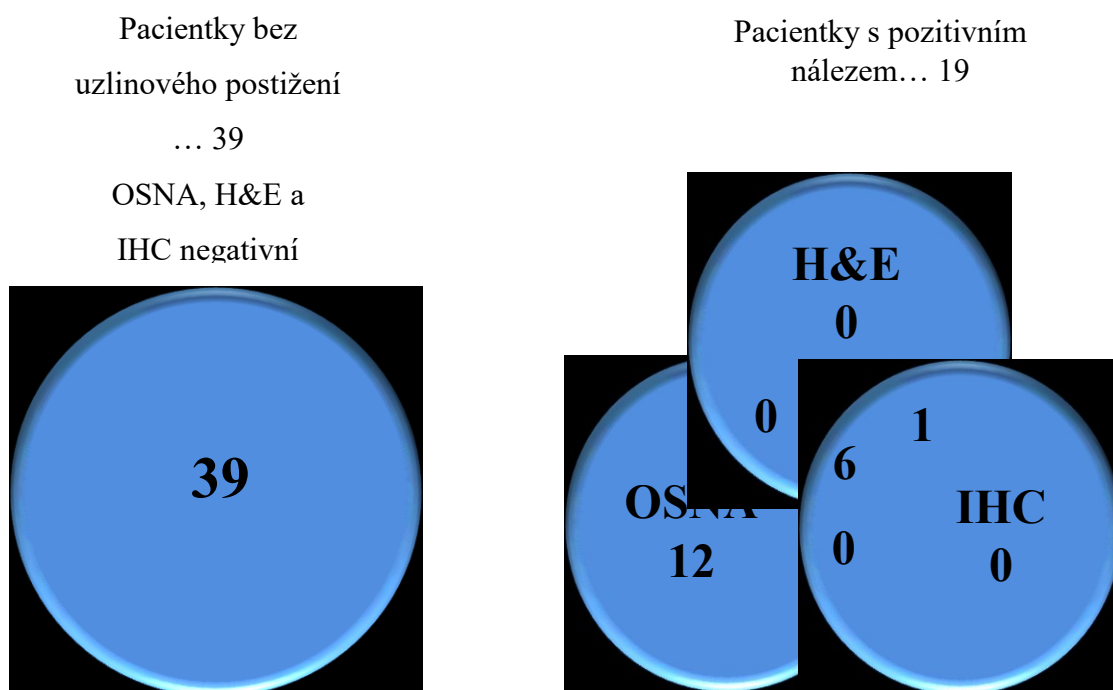
8.4.5 Hodnocení pacientek z hlediska použitých metod

Výsledky metody OSNA a obou standardních metod (H&E a IHC) vztažené k jednotlivým pacientkám zobrazuje Obrázek 9.

Všechny tři metody se shodly u 39 pacientek na absenci metastatického postižení SLN's. U 6 pacientek byla shoda všech tří metod v pozitivitě vyšetřovaných sentinelových uzlin. Metodou OSNA byla navíc u 12 pacientek detekována pozitivita SLN's a u 1 pacientky byla naopak při negativitě metody OSNA detekována pozitivita SLN metodami H&E a IHC CK19.

Falešně pozitivní uzliny stanovené metodami OSNA a IHC CK 19 uváděné ve Vennově diagramu v Obrázku 8 neměly na celkové hodnocení pacientek vliv.

Obrázek 9 Vennův diagram, výsledné hodnocení pacientek vzhledem k výsledkům vyšetření metod IHC, H&E a OSNA, Počet pacientek ... 58



8.4.6 Zařazení pacientek do TNM a FIGO klasifikace dle použitých vyšetřovacích metod

Diagnostika pomocí metody OSNA zařadila 12 pacientek (20,69%) do III. stadia FIGO, zatímco vyšetření sentinelových uzlin ultrastagingem vedlo k jejich zařazení do stadia FIGO I a II viz Tabulka 6.

Jedna pacientka byla na základě vyšetření ultrastagingem zařazena do III. stadia FIGO, zatímco vyšetření SLN's metodou OSNA tuto pacientku zařadilo do I. stadia FIGO.

U 45 pacientek bylo zařazení do TNM a FIGO klasifikace na základě vyšetření SLN's metodami OSNA a ultrastagingem shodné. Tyto pacientky Tabulka 6 nezahrnuje.

Tabulka 6 Změny v TNM a FIGO klasifikaci při hodnocení pacientek metodou OSNA

Cases	ultrastaging		OSNA staging		LVSI	Histology
	TNM	FIGO	TNM	FIGO		
1.	T1aN0M0	IA	T1aN1miM0	IIIC1	No	Endometrioid
2.	T2N0M0	II	T2N1miM0	IIIC1	Yes	Endometrioid
3.	T1aN0M0	IA	T1aN1miM0	IIIC1	No	Endometrioid
4.	T1aN0M0	IA	T1aN1miM0	IIIC1	No	Endometrioid
5.	T2N0M0	II	T2N1miM0	IIIC1	Yes	Clear Cell
6.	T2N0M0	II	T2N1aM0	IIIC1	No	Endometrioid
7.	T1aN0M0	IA	T1aN1aM0	IIIC1	No	Endometrioid
8.	T1aN0M0	IA	T1aN1miM0	IIIC1	No	Endometrioid
9.	T1aN0M0	IA	T1aN1miM0	IIIC1	No	Endometrioid
10.	T1bN0M0	IB	T1bN1miM0	IIIC1	Yes	Endometrioid
11.	T1aN0M0	IA	T1aN1miM0	IIIC1	No	Endometrioid
12.	T1aN0M0	IA	T1aN1miM0	IIIC1	No	Serous
13.	T1bN1mi	IIIC1	T1bN0M0	IB	No	Endometrioid

Pacientkám, u kterých bylo metastatické postižení sentinelových uzlin diagnostikováno jen na základě vyšetření metodou OSNA (tedy současně negativní ultrastaging těchto uzlin), nebyla adjuvantní terapie podána a jsou nadále pečlivě sledovány.

8.5 Diskuse

Tato práce představuje dosud největší soubor pacientek s karcinomem endometria, které byly vyšetřeny s využitím metody OSNA k detekci metastatického postižení sentinelových uzlin. Ve srovnání se standardním ultrastagingem metoda OSNA prokázala častěji metastatické postižení sentinelových uzlin a vedla k upstagingu dokonce u 20,69 % pacientek. Díky tomu by byla signifikantně častěji indikována adjuvantní léčba.

Použitá metodika umožnila, aby každá sentinelová uzlina byla vyšetřena současně ultrastagingem i metodou OSNA a výsledky obou postupů tak mohly být adekvátně porovnány. Vždy jedna polovina řezů byla zpracována metodou OSNA, zatímco druhá polovina pomocí standardního histopatologického ultrastagingu. Zatímco ultrastagingem bylo hodnoceno jako metastaticky postižené 8,15% (11/135) uzlin, metodou OSNA bylo detekováno 20,69% (28/135) metastaticky postižených uzlin. Množství vyšetřených řezů distribuovaných mezi oba způsoby vyšetření (ultrastaging versus OSNA) statisticky nezvýhodňuje žádnou z testovaných metod, a tak lze vyšší záchyt metastaticky postižených uzlin metodou OSNA považovat za statisticky významný ($p \leq 0,0033$). Konkordance metody OSNA s ultrastagingem sentinelových uzlin jakožto referenční metody byla 85,9%. Pouze u jediného případu byla zaznamenána falešná negativita metody OSNA.

Záchyt metastatického postižení uzlin v této práci použitými metodami (H&E, IHC CK19, OSNA) odpovídá incidenci metastatického postižení uzlin napříč stádii karcinomu endometria, a to 10-20 % [20]. Studie navíc potvrzuje, že využití techniky detekce a biopsie sentinelové uzliny vede ke zvýšené detekci postižených uzlin, a tudíž možnému širšímu uplatnění adjuvantní léčby [60]. Dle dostupných dat z literatury je známo, že využití techniky mapování sentinelové uzliny a jejího ultrastagingu vede k upstagingu až u 15% pacientek [8]. Domnívám se, že přesnější detekce metastatického postižení uzlin pomocí metody OSNA by mohla znamenat přesnější indikaci adjuvantní léčby zejména u pacientek dosud řazených do skupiny low-risk a snížit tak riziko recidivy onemocnění (Obrázek 7 a Tabulka 6).

Detekce metastatického postižení lymfatických uzlin metodou OSNA u karcinomu endometria byla zatím použita ve dvou menších studiích publikovaných v impaktovaných časopisech.

V roce 2014 kolektiv japonských autorů jako první využil metody OSNA u 35 pacientek s karcinomem endometria. Vyšetřením 137 sentinelových uzlin detekoval 15 pozitivních (10,95%), jako kontrolní standard bylo využito klasického histopatologického vyšetření s řezy v 2mm intervalu a s barvením H&E. Uzlina byla prokrájena po 2mm, sudé části zpracovány standardním způsobem, liché části metodou OSNA. Přestože v této práci bylo použito méně podrobného histopatologického vyšetření (histopatologické vyšetření v 2 mm intervalu) než v naší studii, byla dosažena vyšší shoda mezi oběma metodami. Byly zde popsány pouze 4 diskordantní nálezy. Concordance metody OSNA se standardním histopatologickým vyšetřením byla 97,1% [54]. Podrobnější ultrastagingový způsob zpracování částí sentinelových uzlin by však posunul porovnání obou metod dále, včetně detekce jevů zahrnujících mikrometastázy, ITC či benigní epiteliální inkluse.

Ve španělské práci autoři vyšetřili metodou OSNA celkem 94 sentinelových uzlin pocházejících od 34 pacientek. Střední 1 mm silnou část uzliny vyšetřili pomocí H&E a IHC CK19, ostatní uzlinová tkáň byla vyšetřena metodou OSNA. V této studii metoda OSNA detekovala 16 metastaticky postižených uzlin a dosáhla tak 88,3% shody s histopatologickým vyšetřením. V rámci této studie bylo detekováno 11 diskordantních výsledků OSNA pozitivních a současně histopatologicky negativních. V případě dvou sentinelových uzlin byly při histopatologickém vyšetření zachyceny benigní epiteliální inkluse, v těchto případech metoda OSNA také poskytla pozitivní výsledek [48]. Třebaže využití metody OSNA doložilo vyšší citlivost pro detekci metastáz, zásadním limitem této studie byla kontrola pouze 1 mm centrální části uzliny podrobným histopatologickým vyšetřením, které nemuselo metastatické postižení dobře detekovat. Porovnání výsledků obou těchto publikovaných prací se závěry naší studie nabízí Tabulka 7.

Tabulka 7 využití metody OSNA při vyšetření sentinelových uzlin karcinomu endometria

Autor	Rok	Počet pacientek	Počet uzlin	Sensitivita	Specifická	Konkordance
Nagai et al	2014	35	137	82,4 %	99,2 %	97,1 %
López-Ruiz et al	2016	34	94	100 %	87,6 %	88,3 %
Košťun et al	2018	58	135	90,9 %	85,5 %	85,9 %
		n=127	n=366	Ø=91,1 %	Ø=90,8 %	Ø=90,4 %

Ani jedna z prací na rozdíl od našeho souboru nehodnotí dopad zvolených detekčních metod na management pacientek participujících ve studii. Vzhledem k vysokému podílu upstagingu v naší práci, považujeme tento fakt za klinicky mimořádně důležitý údaj.

Zásadní problematiku představuje vlastní zpracování sentinelových uzlin. Metoda OSNA se profiluje jako vysoce efektivní metoda srovnatelná s ultrastagingem oproti němuž navíc poskytuje informaci o přítomnosti nádorového postižení z celé uzliny a nikoliv jen z několika řezů. Ze své podstaty však neumožňuje zpětnou kontrolu vzorku patologem. Ve třech uzlinách v naší studii byly nalezeny ve vzorcích z částí těchto uzlin ektopické epiteliální inkluze. Tyto inkluze mohou způsobovat falešnou pozitivitu metody OSNA, protože jde o benigní glandulární epithelové inkluze. Incidence těchto inkluzí v sentinelových uzlinách je velice nízká a v literatuře se udává okolo 1,6 %. Incidence celková, včetně nesentinelových uzlin, pak kolísá okolo 0,1-0,2 % [48]. V našem souboru vyšetřených sentinelových uzlin dosáhla jejich incidence 2,2 % a způsobila jednu falešnou pozitivitu uzliny metodou OSNA. Ta však neměla vliv na konečné hodnocení pacientky, protože ta měla současně pozitivní kontrolaterální sentinelovou uzlinu s nálezem mikrometastázy.

V jednom případě byla sentinelová uzlina hodnocena metodou OSNA jako negativní, přestože ultrastaging hodnotil uzlinu jako pozitivní s mikrometastázou. Tento případ lze vysvětlit způsobem prokrájení uzliny po 2 mm. Je možné, že patolog obdržel ke zhodnocení

část uzliny s mikrometastatickým postižením, zatímco přístroj pro vyšetření OSNA obdržel část uzliny bez metastatického postižení. Identický princip mohl sehrát svou roli i v opačném případě, tedy pozitivita metody OSNA pro mikrometastázu při současné negativitě H&E a IHC. Statisticky signifikantně vyšší incidence těchto případů v našem souboru, celkem 18 pozitivních uzlin s negativním ultrastagingem, ale ukazuje spíše vyšší citlivost metody OSNA pro detekci metastatického postižení v porovnání s histopatologickým a IHC vyšetřením ($p \leq 0,0033$).

Detekce sentinelové uzliny u karcinomu endometria dosud není standardizovaným procesem. Existuje několik způsobů detekce lišících se místem aplikace a kombinací a dávkou tracerů [36, 65]. V této studii byla využita metoda intracervikální aplikace. Kontroverzi představuje i možnost nálezu sentinelových uzlin v paraaortální lokalizaci. Dle literatury je v této oblasti lokalizováno asi 10% sentinelových uzlin [39]. Výskyt izolovaných metastáz v této oblasti, tedy bez postižení pánevních uzlin, se udává asi 1-3% [45, 67].

Neúspěšná detekce izolované metastaticky postižené paraaortální uzliny by mohla vést k volbě neadekvátní adjuvantní léčby. V rámci předoperačního vyšetření lze navíc toto riziko redukovat využitím podrobných zobrazovacích vyšetření (např. CT, PET-CT nebo expertní USG) k identifikaci klinicky suspektních uzlin v této oblasti. Některé dosud publikované práce navíc poukazují na přínos detekce a vyšetření sentinelových uzlin u karcinomu endometria ve srovnání s provedením samotné systematické pánevní a paraaortální lymfadenektomie. Strategie mapování sentinelové uzliny vykazuje vyšší míru detekce postižených pánevních uzlin při možné nižší radikalitě výkonu [60] a How et al popisuje dokonce snížení výskytu pánevní rekurence onemocnění až o 68% [39].

Recentně publikovaná data zabývající se významem lymfovaskulární invaze (LVSI) u pacientek s negativním histologickým vyšetřením uzlin v časném stadiu onemocnění pT1N0 ukazují, že rekurence onemocnění do 5 let proběhne u 4,8 % pacientek s negativními uzlinami a LVSI negativitou a dokonce u 14,1% pacientek s negativními uzlinami a LVSI pozitivitou ($p=0,006$) [22]. Je pravděpodobné, že na uvedené míře rekurence se podílí i další rizikové faktory, které uvedená práce nezohledňuje (např. molekulární charakteristiky tumorů). Nabízí se však otázka, zda tato skutečnost není podmíněna i nízkou senzitivitou standardních testů používaných k detekci metastatického postižení sentinelových uzlin. V našem souboru pacientek metoda OSNA detekovala statisticky signifikantně vyšší počet pozitivních uzlin ($p \leq 0,0033$), což by vedlo k zařazení statisticky signifikantně vyššího počtu pacientek do vyššího

stadia FIGO klasifikace, které by více odpovídalo frekvenci pacientek, u který dojde v časném stadiu onemocnění k recidivě.

Ohledně nákladnosti metody OSNA byly v roce 2014 a 2016 publikovány analýzy, dle kterých se model operační léčby s využitím metody OSNA jeví jako varianta významně redukující náklady na péči o pacientky s karcinomem prsu ve srovnání se standardním postupem využívajícím peroperační histologické vyšetření (frozen section) a následně definitivní histopatologické vyšetření. Zásadním zjištěním bylo, že až u 20% pacientek bylo dosaženo redukce potřeby druhého operačního výkonu, což mělo opět pozitivní vliv na celkové náklady na léčbu [59, 70].

8.6 Závěr

Dle závěrů této studie i dosud publikovaných dat nabízí metoda OSNA, rychlou a přesnou alternativu k podrobnému ultrastagingovému vyšetření. Podle výsledků této studie vykazuje v porovnání s ultrastagingem sensitivitu 90,9%, specificitu 85,5% a concordanci 85,9%.

Metoda OSNA vedla ve srovnání s ultrastagingem k detekci většího počtu metastaticky postižených sentinelových uzlin a tím k upstagingu navíc u 20,69% pacientek. V případě karcinomů prsu a kolorekta se již v průběhu minulých let tato metoda dostatečně etablovala a je v klinické praxi běžně využívána [77].

Využití metody OSNA v kombinaci s technikami detekce a vyšetření sentinelových uzlin u pacientek s karcinomem endometria je do budoucna příslibem vysoce sensitivní detekce metastaticky postižených uzlin a tím adekvátního uplatnění adjuvantní léčby. Další krok studia využití této metody při vyšetření sentinelových uzlin u karcinomu endometria by tak měl obsahovat již vyšetření celých sentinelových uzlin bez nepřímé histologické kontroly v rámci celonárodní či lépe mezinárodní multicentrické prospektivní studie.

9 Použitá literatura

1. C54 - ZN těla děložního. 2018 [cited 2018 12.06.2018]; Available from: <http://www.svod.cz/report.php?diag=C54>.
2. National Cancer Institute. Endometrial cancer treatment, Physician Data Query (PDQ). 2018 (20th June 2018, date last accessed).]; Available from: <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/endometrial/healthprofessional>.
3. ACHOURI, A., HUCHON, C., BATS, A. S., BENSAID, C., NOS, C. a LECURU, F. Complications of lymphadenectomy for gynecologic cancer. *Eur J Surg Oncol*, 2013, **39**(1), 81-86.
4. ALBO, Daniel, WAYNE, Jeffrey D., HUNT, Kelly K., RAHLFS, Tom F., SINGLETARY, S. Eva, AMES, Frederick C., FEIG, Barry W., ROSS, Merrick I. a KUERER, Henry M. Anaphylactic reactions to isosulfan blue dye during sentinel lymph node biopsy for breast cancer. *The American Journal of Surgery*, 2001, **182**(4), 393-398.
5. ALI, A. T. Risk factors for endometrial cancer. *Ceska Gynekol*, 2013, **78**(5), 448-459.
6. AMIN MB, Edge SB, Greene FL, et al, *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed 2017, New York: Springer 2017.
7. ATHWAL, R. K., CLARKE, D., HARRIES, S. a JONES, L. Patient anxiety on the use of one step nucleic acid amplification (OSNA) during breast cancer surgery. *Breast Dis*, 2016, **36**(1), 23-26.
8. BALLESTER, M., DUBERNARD, G., LECURU, F., HEITZ, D., MATHEVET, P., MARRET, H., QUERLEU, D., GOLFIER, F., LEBLANC, E., ROUZIER, R. a DARAI, E. Detection rate and diagnostic accuracy of sentinel-node biopsy in early stage endometrial cancer: a prospective multicentre study (SENTI-ENDO). *Lancet Oncol*, 2011, **12**(5), 469-476.
9. BARLIN, J. N., KHOURY-COLLADO, F., KIM, C. H., LEITAO, M. M., Jr., CHI, D. S., SONODA, Y., ALEKTIAR, K., DELAIR, D. F., BARAKAT, R. R. a ABU-RUSTUM, N. R. The importance of applying a sentinel lymph node mapping algorithm in endometrial cancer staging: beyond removal of blue nodes. *Gynecol Oncol*, 2012, **125**(3), 531-535.
10. BARLIN, J. N., PURI, I. a BRISTOW, R. E. Cytoreductive surgery for advanced or recurrent endometrial cancer: a meta-analysis. *Gynecol Oncol*, 2010, **118**(1), 14-18.
11. BENEDET, J. L., BENDER, H., JONES, H., 3rd, NGAN, H. Y. a PECORELLI, S. FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers. FIGO Committee on Gynecologic Oncology. *Int J Gynaecol Obstet*, 2000, **70**(2), 209-262.
12. BIRON-SHENTAL, T., DRUCKER, L., ALTARAS, M., BERNHEIM, J. a FISHMAN, A. High incidence of BRCA1-2 germline mutations, previous breast cancer and familial cancer history in Jewish patients with uterine serous papillary carcinoma. *Eur J Surg Oncol*, 2006, **32**(10), 1097-1100.

13. BOGANI, G., CLIBY, W. A. a ALETTI, G. D. Impact of morcellation on survival outcomes of patients with unexpected uterine leiomyosarcoma: a systematic review and meta-analysis. *Gynecol Oncol*, 2015, **137**(1), 167-172.
14. BOKHMAN, J. V. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol*, 1983, **15**(1), 10-17.
15. BURKE, T. W., LEVENBACK, C., TORNOS, C., MORRIS, M., WHARTON, J. T. a GERSHENSON, D. M. Intraabdominal lymphatic mapping to direct selective pelvic and paraaortic lymphadenectomy in women with high-risk endometrial cancer: results of a pilot study. *Gynecol Oncol*, 1996, **62**(2), 169-173.
16. BURKE, W. M., ORR, J., LEITAO, M., SALOM, E., GEHRIG, P., OLAWAIYE, A. B., BREWER, M., BORUTA, D., HERZOG, T. J. a SHAHIN, F. A. Endometrial cancer: a review and current management strategies: part II. *Gynecol Oncol*, 2014, **134**(2), 393-402.
17. CABANAS, R. M. An approach for the treatment of penile carcinoma. *Cancer*, 1977, **39**(2), 456-466.
18. CIBULA, D., OONK, M. H. a ABU-RUSTUM, N. R. Sentinel lymph node biopsy in the management of gynecologic cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2015, **27**(1), 66-72.
19. COLLABORATIVE GROUP ON EPIDEMIOLOGICAL STUDIES ON ENDOMETRIAL, Cancer. Endometrial cancer and oral contraceptives: an individual participant meta-analysis of 27 276 women with endometrial cancer from 36 epidemiological studies. *Lancet Oncol*, 2015, **16**(9), 1061-1070.
20. COLOMBO, N., CREUTZBERG, C., AMANT, F., BOSSE, T., GONZALEZ-MARTIN, A., LEDERMANN, J., MARTH, C., NOUT, R., QUERLEU, D., MIRZA, M. R., SESSA, C. a GROUP, Esmo-Esgo-Estro Endometrial Consensus Conference Working. ESMO-ESGO-ESTRO Consensus Conference on Endometrial Cancer: diagnosis, treatment and follow-updagger. *Ann Oncol*, 2016, **27**(1), 16-41.
21. CREASMAN, W. Revised FIGO staging for carcinoma of the endometrium. *Int J Gynaecol Obstet*, 2009, **105**(2), 109.
22. CUSANO, E., MYERS, V., SAMANT, R., SUDAI, T., KELLER, A., LE, T., E, C., GRIMES, S. a XU, Y. Prognostic Significance of Lymphovascular Space Invasion in the Absence of Lymph Node Metastases in Early-Stage Endometrial Cancer. *Int J Gynecol Cancer*, 2018, **28**(5), 890-894.
23. ČIHÁK, RADOMÍR, *Anatomie člověka*. Vol. 3. díl. 1997. 655.
24. D'ANGELO, E. a PRAT, J. Uterine sarcomas: a review. *Gynecol Oncol*, 2010, **116**(1), 131-139.
25. DELALOYE, J. F., PAMPALLONA, S., CHARDONNENS, E., FICHE, M., LEHR, H. A., DE GRANDI, P. a DELALOYE, A. B. Intraoperative lymphatic mapping and sentinel node biopsy using hysteroscopy in patients with endometrial cancer. *Gynecol Oncol*, 2007, **106**(1), 89-93.
26. ESPINDOLA, D., KENNEDY, K. A. a FISCHER, E. G. Management of abnormal uterine bleeding and the pathology of endometrial hyperplasia. *Obstet Gynecol Clin North Am*, 2007, **34**(4), 717-737, ix.

27. FADER, A. N., WEISE, R. M., SINNO, A. K., TANNER, E. J., 3rd, BORAH, B. J., MORIARTY, J. P., BRISTOW, R. E., MAKARY, M. A., PRONOVOST, P. J., HUTFLESS, S. a DOWDY, S. C. Utilization of Minimally Invasive Surgery in Endometrial Cancer Care: A Quality and Cost Disparity. *Obstet Gynecol*, 2016, **127**(1), 91-100.
28. FISCHEROVA, D. Ultrasound scanning of the pelvis and abdomen for staging of gynecological tumors: a review. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2011, **38**(3), 246-266.
29. FISCHEROVA, D., FRUHAUF, F., ZIKAN, M., PINKAVOVA, I., KOCIAN, R., DUNDR, P., NEMEJCOVA, K., DUSEK, L. a CIBULA, D. Factors affecting sonographic preoperative local staging of endometrial cancer. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2014, **43**(5), 575-585.
30. GALA, R. B., MARGULIES, R., STEINBERG, A., MURPHY, M., LUKBAN, J., JEPPSON, P., ASCHKENAZI, S., OLIVERA, C., SOUTH, M., LOWENSTEIN, L., SCHAFFER, J., BALK, E. M. a SUNG, V. Systematic review of robotic surgery in gynecology: robotic techniques compared with laparoscopy and laparotomy. *J Minim Invasive Gynecol*, 2014, **21**(3), 353-361.
31. GLOBOCAN. Uterine cancer, incidence and mortality. 2012; Available from: <http://globocan.iarc.fr>.
32. GOLDSTEIN, S. R., NACHTIGALL, M., SNYDER, J. R. a NACHTIGALL, L. Endometrial assessment by vaginal ultrasonography before endometrial sampling in patients with postmenopausal bleeding. *Am J Obstet Gynecol*, 1990, **163**(1 Pt 1), 119-123.
33. GUNDERSON, C. C., FADER, A. N., CARSON, K. A. a BRISTOW, R. E. Oncologic and reproductive outcomes with progestin therapy in women with endometrial hyperplasia and grade 1 adenocarcinoma: a systematic review. *Gynecol Oncol*, 2012, **125**(2), 477-482.
34. HARTER, Philipp: LION: Lymphadenectomy in ovarian neoplasms - A prospective randomized AGO study group led gynecologic cancer intergroup trial., in *2017 ASCO Annual Meeting* 2017.
35. HOGBERG, T., SIGNORELLI, M., DE OLIVEIRA, C. F., FOSSATI, R., LISSONI, A. A., SORBE, B., ANDERSSON, H., GRENMAN, S., LUNDGREN, C., ROSENBERG, P., BOMAN, K., THOLANDER, B., SCAMBIA, G., REED, N., CORMIO, G., TOGNON, G., CLARKE, J., SAWICKI, T., ZOLA, P. a KRISTENSEN, G. Sequential adjuvant chemotherapy and radiotherapy in endometrial cancer--results from two randomised studies. *Eur J Cancer*, 2010, **46**(13), 2422-2431.
36. HOLLOWAY, R. W., ABU-RUSTUM, N. R., BACKES, F. J., BOGGESE, J. F., GOTLIEB, W. H., JEFFREY LOWERY, W., ROSSI, E. C., TANNER, E. J. a WOLSKY, R. J. Sentinel lymph node mapping and staging in endometrial cancer: A Society of Gynecologic Oncology literature review with consensus recommendations. *Gynecol Oncol*, 2017, **146**(2), 405-415.
37. HOLLOWAY, Robert W., AHMAD, Sarfraz, KENDRICK, James E., BIGSBY, Glenn E., BRUDIE, Lorna A., GHURANI, Giselle B., STAVITZSKI, Nicole M., GISE, Jasmine L., INGERSOLL, Susan B. a PEPE, Julie W. A Prospective Cohort Study Comparing Colorimetric and Fluorescent Imaging for Sentinel Lymph Node Mapping in Endometrial Cancer. *Annals of Surgical Oncology*, 2017, **24**(7), 1972-1979.
38. HOLUB, Z., JABOR, A., LUKAC, J. a KLIMENT, L. Laparoscopic detection of sentinel lymph nodes using blue dye in women with cervical and endometrial cancer. *Med Sci Monit*, 2004, **10**(10), Cr587-591.

39. HOW, J., GAUTHIER, C., ABITBOL, J., LAU, S., SALVADOR, S., GOTLIEB, R., PELMUS, M., FERENCZY, A., PROBST, S., BRIN, S., FATNASSI, A. a GOTLIEB, W. Impact of sentinel lymph node mapping on recurrence patterns in endometrial cancer. *Gynecol Oncol*, 2017, **144**(3), 503-509.
40. HUBBS, J. L., SAIG, R. M., ABAID, L. N., BAE-JUMP, V. L. a GEHRIG, P. A. Systemic and local hormone therapy for endometrial hyperplasia and early adenocarcinoma. *Obstet Gynecol*, 2013, **121**(6), 1172-1180.
41. JEWELL, E. L., HUANG, J. J., ABU-RUSTUM, N. R., GARDNER, G. J., BROWN, C. L., SONODA, Y., BARAKAT, R. R., LEVINE, D. A. a LEITAO, M. M., Jr. Detection of sentinel lymph nodes in minimally invasive surgery using indocyanine green and near-infrared fluorescence imaging for uterine and cervical malignancies. *Gynecol Oncol*, 2014, **133**(2), 274-277.
42. KANDOTH, C., SCHULTZ, N., CHERNIACK, A. D., AKBANI, R., LIU, Y., SHEN, H., ROBERTSON, A. G., PASHTAN, I., SHEN, R., BENZ, C. C., YAU, C., LAIRD, P. W., DING, L., ZHANG, W., MILLS, G. B., KUCHERLAPATI, R., MARDIS, E. R. a LEVINE, D. A. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature*, 2013, **497**(7447), 67-73.
43. KARLSSON, B., GRANBERG, S., WIKLAND, M., YLOSTALO, P., TORVID, K., MARSAL, K. a VALENTIN, L. Transvaginal ultrasonography of the endometrium in women with postmenopausal bleeding--a Nordic multicenter study. *Am J Obstet Gynecol*, 1995, **172**(5), 1488-1494.
44. KRAG, David N., ANDERSON, Stewart J., JULIAN, Thomas B., BROWN, Ann M., HARLOW, Seth P., COSTANTINO, Joseph P., ASHIKAGA, Takamaru, WEAVER, Donald L., MAMOUNAS, Eleftherios P., JALOVEC, Lynne M., FRAZIER, Thomas G., NOYES, R. Dirk, ROBIDOUX, André, SCARTH, Hugh M. C. a WOLMARK, Norman. Sentinel-lymph-node resection compared with conventional axillary-lymph-node dissection in clinically node-negative patients with breast cancer: overall survival findings from the NSABP B-32 randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 2010, **11**(10), 927-933.
45. KUMAR, S., PODRATZ, K. C., BAKKUM-GAMEZ, J. N., DOWDY, S. C., WEAVER, A. L., MCGREE, M. E., CLIBY, W. A., KEENEY, G. L., THOMAS, G. a MARIANI, A. Prospective assessment of the prevalence of pelvic, paraaortic and high paraaortic lymph node metastasis in endometrial cancer. *Gynecol Oncol*, 2014, **132**(1), 38-43.
46. KWON, J. S., SCOTT, J. L., GILKS, C. B., DANIELS, M. S., SUN, C. C. a LU, K. H. Testing women with endometrial cancer to detect Lynch syndrome. *J Clin Oncol*, 2011, **29**(16), 2247-2252.
47. LEE, T. S., LEE, J. Y., KIM, J. W., OH, S., SEONG, S. J., LEE, J. M., KIM, T. J., CHO, C. H., KIM, S. M. a PARK, C. Y. Outcomes of ovarian preservation in a cohort of premenopausal women with early-stage endometrial cancer: a Korean Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol*, 2013, **131**(2), 289-293.
48. LOPEZ-RUIZ, M. E., DIESTRO, M. D., YEBENES, L., BERJON, A., DIAZ DE LA NOVAL, B., MENDIOLA, M., DE SANTIAGO, J. a HARDISSON, D. One-step nucleic acid amplification (OSNA) for the detection of sentinel lymph node metastasis in endometrial cancer. *Gynecol Oncol*, 2016, **143**(1), 54-59.

49. LUM, M. M., BELNAP, T. W., FRANDSEN, J., BROWN, A. P., SAUSE, W. T., SOISSON, A. P., DODSON, M. K., WERNER, T. a GAFFNEY, D. K. Survival Analysis of Cancer Patients With FIGO Stage IIIA Endometrial Cancer. *Am J Clin Oncol*, 2015, **38**(3), 283-288.
50. MEYER, L. A., BOHLKE, K., POWELL, M. A., FADER, A. N., FRANKLIN, G. E., LEE, L. J., MATEI, D., COALLIER, L. a WRIGHT, A. A. Postoperative Radiation Therapy for Endometrial Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Endorsement of the American Society for Radiation Oncology Evidence-Based Guideline. *J Clin Oncol*, 2015, **33**(26), 2908-2913.
51. MOORE, K. N. a FADER, A. N. Uterine papillary serous carcinoma. *Clin Obstet Gynecol*, 2011, **54**(2), 278-291.
52. MORTON, D. L., WEN, D., WONG, J. H. a ET AL. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Archives of Surgery*, 1992, **127**(4), 392-399.
53. MURALI, R., SOSLOW, R. A. a WEIGELT, B. Classification of endometrial carcinoma: more than two types. *Lancet Oncol*, 2014, **15**(7), e268-278.
54. NAGAI, T., NIIKURA, H., OKAMOTO, S., NAKABAYASHI, K., MATODA, M., UTSUNOMIYA, H., NAGASE, S., WATANABE, M., TAKESHIMA, N. a YAEGASHI, N. A new diagnostic method for rapid detection of lymph node metastases using a one-step nucleic acid amplification (OSNA) assay in endometrial cancer. *Ann Surg Oncol*, 2015, **22**(3), 980-986.
55. NATIONAL CANCER INSTITUTE- SURVEILLANCE, Epidemiology, and End Results Program. Cancer Stat Facts: Uterine Cancer. 2018 08.07.2018]; Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/corp.html>.
56. NCCN. Uterine Neoplasms, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines). 2017 [cited 2017 26.03.2017]; Version 1.2018- October 13, 2017:[Available from: https://www.nccn.org/store/login/login.aspx?ReturnURL=https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/uterine.pdf.
57. PAPADIA, A., REMORGIDA, V., SALOM, E. M. a RAGNI, N. Laparoscopic pelvic and paraaortic lymphadenectomy in gynecologic oncology. *J Am Assoc Gynecol Laparosc*, 2004, **11**(3), 297-306.
58. R.J. KURMAN, M.L. Carcangiu, C.S. Herrington, R.H. Young, *WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs*. Vol. fourth ed. IARC. 2014, Lyon.
59. RAIJA-BARJAT, T., TROMBERT, B., KHADDAGE, A., DOUCHET, C., SEFFERT, P., PEOC'H, M., FALK, A. T., MAGNE, N. a CHAULEUR, C. OSNA (one-step nucleic acid amplification) sentinel lymph node intraoperative molecular analysis in breast cancer: a cost-benefit analysis. *Med Oncol*, 2014, **31**(12), 322.
60. RAIMOND, E., BALLESTER, M., HUDRY, D., BENDIFALLAH, S., DARAI, E., GRAESSLIN, O. a COUTANT, C. Impact of sentinel lymph node biopsy on the therapeutic management of early-stage endometrial cancer: Results of a retrospective multicenter study. *Gynecol Oncol*, 2014, **133**(3), 506-511.

61. REN, Y., HUANG, X., SHAN, B., WU, X., HUANG, X., SHI, D. a WANG, H. Adjuvant concurrent chemoradiation followed by chemotherapy for high-risk endometrial cancer. *Gynecol Oncol*, 2016, **140**(1), 58-63.
62. RIEGERT-JOHNSON, D. L., GLEESON, F. C., ROBERTS, M., THOLEN, K., YOUNGBORG, L., BULLOCK, M. a BOARDMAN, L. A. Cancer and Lhermitte-Duclos disease are common in Cowden syndrome patients. *Hered Cancer Clin Pract*, 2010, **8**(1), 6.
63. ROB, L., ROBOVA, H., HALASKA, M. J., HRUDA, M. a SKAPA, P. Current status of sentinel lymph node mapping in the management of cervical cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2013, **13**(7), 861-870.
64. ROB, L., STRNAD, P., ROBOVA, H., CHARVAT, M., PLUTA, M., SCHLEGEROVA, D. a HREHORCAK, M. Study of lymphatic mapping and sentinel node identification in early stage cervical cancer. *Gynecol Oncol*, 2005, **98**(2), 281-288.
65. ROBOVA, H., CHARVAT, M., STRNAD, P., HREHORCAK, M., TABORSKA, K., SKAPA, P. a ROB, L. Lymphatic mapping in endometrial cancer: comparison of hysteroscopic and subserosal injection and the distribution of sentinel lymph nodes. *Int J Gynecol Cancer*, 2009, **19**(3), 391-394.
66. ROBOVA, H., ROB, L., HALASKA, M. J., PLUTA, M. a SKAPA, P. Current status of sentinel lymph node mapping in the management of endometrial cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2013, **13**(1), 55-61.
67. ROSSI, E. C., KOWALSKI, L. D., SCALICI, J., CANTRELL, L., SCHULER, K., HANNA, R. K., METHOD, M., ADE, M., IVANOVA, A. a BOGGESS, J. F. A comparison of sentinel lymph node biopsy to lymphadenectomy for endometrial cancer staging (FIRES trial): a multicentre, prospective, cohort study. *Lancet Oncol*, 2017, **18**(3), 384-392.
68. RUIZ, R., GOROSTIDI, M., JAUNARENA, I., GOIRI, C., AGUERRE, J. a LEKUONA, A. Sentinel Node Biopsy in Endometrial Cancer With Dual Cervical and Fundal Indocyanine Green Injection. *Int J Gynecol Cancer*, 2018, **28**(1), 139-144.
69. SARTORI, E., GADDUCCI, A., LANDONI, F., LISSONI, A., MAGGINO, T., ZOLA, P. a ZANAGNOLO, V. Clinical behavior of 203 stage II endometrial cancer cases: the impact of primary surgical approach and of adjuvant radiation therapy. *Int J Gynecol Cancer*, 2001, **11**(6), 430-437.
70. SARUTA, Y. a PUIG-JUNOY, J. Cost and Budget Impact Analysis of an Accurate Intraoperative Sentinel Lymph Node Diagnosis for Breast Cancer Metastasis. *Appl Health Econ Health Policy*, 2016, **14**(3), 323-335.
71. SAULE, C., MOURET-FOURME, E., BRIAUX, A., BECETTE, V., ROUZIER, R., HOUDAYER, C. a STOPPA-LYONNET, D. Risk of Serous Endometrial Carcinoma in Women With Pathogenic BRCA1/2 Variant After Risk-Reducing Salpingo-Oophorectomy. *J Natl Cancer Inst*, 2018, **110**(2).
72. SEEBACHER, V., SCHMID, M., POLTERAUER, S., HEFLER-FRISCHMUTH, K., LEIPOLD, H., CONCIN, N., REINTHALLER, A. a HEFLER, L. The presence of postmenopausal bleeding as prognostic parameter in patients with endometrial cancer: a retrospective multi-center study. *BMC Cancer*, 2009, **9**, 460.

73. SETIAWAN, V. W., YANG, H. P., PIKE, M. C., MCCANN, S. E., YU, H., XIANG, Y. B., WOLK, A., WENTZENSEN, N., WEISS, N. S., WEBB, P. M., VAN DEN BRANDT, P. A., VAN DE VIJVER, K., THOMPSON, P. J., AUSTRALIAN NATIONAL ENDOMETRIAL CANCER STUDY, Group, STROM, B. L., SPURDLE, A. B., SOSLOW, R. A., SHU, X. O., SCHAIRER, C., SACERDOTE, C., ROHAN, T. E., ROBIEN, K., RISCH, H. A., RICCERI, F., REBBECK, T. R., RASTOGI, R., PRESCOTT, J., POLIDORO, S., PARK, Y., OLSON, S. H., MOYSICH, K. B., MILLER, A. B., MCCULLOUGH, M. L., MATSUNO, R. K., MAGLIOCCO, A. M., LURIE, G., LU, L., LISSOWSKA, J., LIANG, X., LACEY, J. V., Jr., KOLONEL, L. N., HENDERSON, B. E., HANKINSON, S. E., HAKANSSON, N., GOODMAN, M. T., GAUDET, M. M., GARCIA-CLOSAS, M., FRIEDENREICH, C. M., FREUDENHEIM, J. L., DOHERTY, J., DE VIVO, I., COURNEYA, K. S., COOK, L. S., CHEN, C., CERHAN, J. R., CAI, H., BRINTON, L. A., BERNSTEIN, L., ANDERSON, K. E., ANTON-CULVER, H., SCHOUTEN, L. J. a HORN-ROSS, P. L. Type I and II endometrial cancers: have they different risk factors? *J Clin Oncol*, 2013, **31**(20), 2607-2618.
74. SIESTO, G., UCCELLA, S., GHEZZI, F., CROMI, A., ZEFIRO, F., SERATI, M. a BOLIS, P. Surgical and survival outcomes in older women with endometrial cancer treated by laparoscopy. *Menopause*, 2010, **17**(3), 539-544.
75. SLAMA, J. a KOCIAN, R. [Technique of pelvic and paraaortic lymphadenectomy]. *Ceska Gynekol*, **81**(4), 253-264.
76. SUTTON, A. J., BARTON, P., SUNDAR, S., MEADS, C., ROSENTHAL, A. N., BALDWIN, P., KHAN, K. a ROBERTS, T. E. Cost-effectiveness of sentinel lymph node biopsy vs inguinofemoral lymphadenectomy in women with vulval cancer. *Br J Cancer*, 2013, **109**(10), 2533-2547.
77. TAMAKI, Y. One-step nucleic acid amplification (OSNA): where do we go with it? *Int J Clin Oncol*, 2017, **22**(1), 3-10.
78. TORRE, L. A., BRAY, F., SIEGEL, R. L., FERLAY, J., LORTET-TIEULENT, J. a JEMAL, A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*, 2015, **65**(2), 87-108.
79. TOUHAMI, O., GREGOIRE, J., RENAUD, M. C., SEBASTIANELLI, A. a PLANTE, M. Performance of sentinel lymph node (SLN) mapping in high-risk endometrial cancer. *Gynecol Oncol*, 2017, **147**(3), 549-553.
80. TOZZI, R., MALUR, S., KOEHLER, C. a SCHNEIDER, A. Analysis of morbidity in patients with endometrial cancer: is there a commitment to offer laparoscopy? *Gynecol Oncol*, 2005, **97**(1), 4-9.
81. TSUJIMOTO, M., NAKABAYASHI, K., YOSHIDOME, K., KANEKO, T., IWASE, T., AKIYAMA, F., KATO, Y., TSUDA, H., UEDA, S., SATO, K., TAMAKI, Y., NOGUCHI, S., KATAOKA, T. R., NAKAJIMA, H., KOMOIKE, Y., INAJI, H., TSUGAWA, K., SUZUKI, K., NAKAMURA, S., DAITOH, M., OTOMO, Y. a MATSUURA, N. One-step nucleic acid amplification for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast cancer patients. *Clin Cancer Res*, 2007, **13**(16), 4807-4816.
82. TURKMEN, O., BASARAN, D., KARALOK, A., COMERT KIMYON, G., TASCI, T., UREYEN, I., TULUNAY, G. a TURAN, T. Prognostic effect of isolated paraaortic nodal spread in endometrial cancer. *J Turk Ger Gynecol Assoc*, 2018.
83. VAN DE LANDE, J., TORRENGA, B., RAIJMAKERS, P. G., HOEKSTRA, O. S., VAN BAAL, M. W., BROLMANN, H. A. a VERHEIJEN, R. H. Sentinel lymph node detection in early stage uterine cervix carcinoma: a systematic review. *Gynecol Oncol*, 2007, **106**(3), 604-613.

84. VAN DER ZEE, A. G., OONK, M. H., DE HULLU, J. A., ANSINK, A. C., VERGOTE, I., VERHEIJEN, R. H., MAGGIONI, A., GAARENSTROOM, K. N., BALDWIN, P. J., VAN DORST, E. B., VAN DER VELDEN, J., HERMANS, R. H., VAN DER PUTTEN, H., DROUIN, P., SCHNEIDER, A. a SLUITER, W. J. Sentinel node dissection is safe in the treatment of early-stage vulvar cancer. *J Clin Oncol*, 2008, **26**(6), 884-889.
85. VAN OOSTRUM, N. H., MAKAR, A. P. a VAN DEN BROECKE, R. Sentinel node procedures in gynecologic cancers: an overview. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2012, **91**(2), 174-181.
86. VASEN, Hans F A, BLANCO, Ignacio, AKTAN-COLLAN, Katja, GOPIE, Jessica P, ALONSO, Angel, ARETZ, Stefan, BERNSTEIN, Inge, BERTARIO, Lucio, BURN, John, CAPELLA, Gabriel, COLAS, Chrystelle, ENGEL, Christoph, FRAYLING, Ian M, GENUARDI, Maurizio, HEINIMANN, Karl, HES, Frederik J, HODGSON, Shirley V, KARAGIANNIS, John A, LALLOO, Fiona, LINDBLOM, Annika, MECKLIN, Jukka-Pekka, MØLLER, Pal, MYRHOJ, Torben, NAGENGAST, Fokko M, PARC, Yann, PONZ DE LEON, Maurizio, RENKONEN-SINISALO, Laura, SAMPSON, Julian R, STORMORKEN, Astrid, SIJMONS, Rolf H, TEJPAR, Sabine, THOMAS, Huw J W, RAHNER, Nils, WIJNEN, Juul T, JÄRVINEN, Heikki Juhani a MÖSLEIN, Gabriela. Revised guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (HNPCC): recommendations by a group of European experts. *Gut*, 2013, **62**(6), 812-823.
87. WALKER, J. L., PIEDMONTE, M. R., SPIRTOS, N. M., EISENKOP, S. M., SCHLAERTH, J. B., MANNEL, R. S., BARAKAT, R., PEARL, M. L. a SHARMA, S. K. Recurrence and survival after random assignment to laparoscopy versus laparotomy for comprehensive surgical staging of uterine cancer: Gynecologic Oncology Group LAP2 Study. *J Clin Oncol*, 2012, **30**(7), 695-700.
88. ZIVANOVIC, O., SHEINFELD, J. a ABU-RUSTUM, N. R. Retroperitoneal lymph node dissection (RPLND). *Gynecol Oncol*, 2008, **111**(2 Suppl), S66-69.
89. ZULLO, F., FALBO, A. a PALOMBA, S. Safety of laparoscopy vs laparotomy in the surgical staging of endometrial cancer: a systematic review and metaanalysis of randomized controlled trials. *Am J Obstet Gynecol*, 2012, **207**(2), 94-100.

10 Publikační a přednášková činnost autora

10.1 Publikace s impakt faktorem

Presl J, Ovesna P, Novotny Z, Vlasak P, Bouda J, **Kostun J**, et al. Importance of Preoperative Knowledge of the Biomarker HE4 in Early-stage Endometrial Cancer Regarding Surgical Management. *Anticancer Res.* 2017;37:2697-702.

Bartakova A, Michalova K, Presl J, Vlasak P, **Kostun J**, Bouda J. CD44 as a cancer stem cell marker and its prognostic value in patients with ovarian carcinoma. *J Obstet Gynaecol.* 2018;38:110-4.

Ptakova N, Miesbauerova M, **Kostun J**, Grossmann P, Sidlova H, Pavelka J, et al. Immunohistochemical and selected genetic reflex testing of all uterine leiomyosarcomas and STUMPs for ALK gene rearrangement may provide an effective screening tool in identifying uterine ALK-rearranged mesenchymal tumors. *Virchows Archiv : an international journal of pathology.* 2018.

10.2 Publikace recenzované

Jan Kostun, Pavel Vlasák, Jiří Bouda, Denis Berezovskiy, Jiří Presl. Význam chirurgie ovariálního karcinomu. *Actual Gyn.* 2018:10-3.

Kostun J, Bouda J, Vlasak P, Bartakova A, Berezovskiy D, Weinberger V, et al. Incidence of uterine sarcomas in West Bohemia, at the Department of Gynaecology and Obstetrics, University Hospital in Pilsen, Czech Republic. *Ceska Gynekol.* 2017;82:436-42.

Kostun J, Pesta M, Slunecko R, Vlasak P, Bouda J, Berezovskiy D, et al. [One-Step Nucleic Acid Amplification method - what is the future of sentinel lymph node management?]. *Ceska Gynekol.* 2018;83:57-61.

Berezovskiy D, Vlasak P, **Kostun J**, Bouda J, Presl J. [Carcinosarcoma of the endometrium with melanocytic differentiation, case report]. Ceska Gynekol. 2017;82:390-5.

Jiří Bouda JP, Pavel Vlasák, **Jan Kost'un**, Robert Slunéčko. Nový pohled na etiopatogenezi ovariálního karcinomu. Actual Gyn. 2018:19-22.

Jiří Presl JB, Pavel Vlasák, **Jan Kost'un**, Denis Berezovskiy. Hereditární riziko ovariálního karcinomu a profylaktická opatření. Actual Gyn. 2018;10:14-8.

Josef Tihlařík JB, Pavel Vlasák, **Jan Kost'un**, Jiří Presl Fertilitu zachovávající léčba u karcinomu endometria. Acta Medicinæ Gynekologie. 2017.

Pavel Vlasák JB, **Jan Kost'un**, Denis Berezovskiy, Jiří Presl. Nové trendy v systémové léčbě ovariálního karcinomu. Actual Gyn. 2018;10:4-9.

Vlasák P, **Kost'un J**, Berezovskiy D, Presl J, Bouda J. Role ultrazvukem navigované biopsie v managementu pánevních tumorů. Actual Gyn. 2017;9:1-4

10.3 Přednášky na konferencích s mezinárodní účastí

“Děložní sarkomy – aktuální revize poznatků a sarkomy na GPK Plzeň 2005-2015“, **Kost'un J.**, Presl J, Bouda J, Vlasák P. a Novotný Z., Konference SNGP 2015, 26-28.11.2015, Brno

“OSNA & SLNM in endometrial cancer“, **Kost'un J.**, Pešta M., Slunéčko R., Topolčan O, Novotný Z., Vlasák P., Bouda J. and Presl J., XXXVII. Imunoanalytické dny v Plzni, 10-12.4.2016, Plzeň

“Mapování sentinelových uzlin karcinomu endometria a využití metody OSNA“, **Kost'un J.**, Novotný Z., Topolčan O., Slunéčko R., Pešta M., Bouda J, Vlasák P. a Presl J., Konference SNGP 2016, 26-28.11.2016, hotel Zámek Valeč, Vysočina

10.4 Přednášky na národních konferencích

“Překvapivé laparoskopické nálezy v diferenciální diagnostice PID“, **Kost'un J.**, 7. celostátní konference sekce infekčních nemocí v gynekologii a porodnictví ČGPS ČLS JEP, 23.1.2016, Praha

“Venózní tromboembolická choroba onkogynekologických pacientek“, **Kost'un J.**, Woman-Trombosis-Cancer, odborná akce, cyklus přednášek, 4.2.2016 České Budějovice a 15.3.2016 Plzeň,

“Antikoagulační a antiagregační léčba před plánovanými gynekologickými výkony“, **Kost'un J.**, Presl J., Vlasák P, Bouda J., Večer gynekologicko-porodnické kliniky, Spolek lékařů v Plzni, 15.6.2016, Plzeň

“Metody detekce a zpracování sentinelových lymfatických uzlin u karcinomu endometria“, **Kost'un J.**, Vlasák P, Bouda J, Presl J. a Novotný Z., 8. jihlavská onkogynekologická konference: “Radikální onkogynekologická operativa“, 16.3.2017, Jihlava

“OSNA a SLNM (projekt sledování sentinelových uzlin) u karcinomu děložního těla“, **Kost'un J.**, Bouda J., Presl J., Večer gynekologicko-porodnické kliniky, Spolek lékařů v Plzni, 13.6.2018, Plzeň