

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

Význam peroperační a pooperační detekce sentinelových lymfatických uzlin pro léčebnou strategii karcinomu děložního hrdla a vulvy. Stanovení prognostického významu submikroskopického postižení uzlin pomocí imunohistochemického určení přítomnosti cytokeratinu

DISERTAČNÍ PRÁCE

MUDr. Marek Pluta

Školitel: prof. MUDr. Lukáš Rob, CSc.

Praha 2009

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

2. LÉKAŘSKÁ FAKULTA

**Postgraduální doktorské studium biomedicíny
při UK a AV ČR v Praze**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Obor experimentální chirurgie

MUDr. Marek Pluta

**Předseda oborové rady
prof. MUDr. Jaroslav Živný, DrSc.**

**Adresa pracoviště
Gynekologicko – porodnická klinika, Universita Karlova v Praze, 2. LF a FN Motol
V Úvalu 84, 150 06 Praha 5
Přednosta: prof. MUDr. Lukáš Rob, CSc.**

Prohlašuji, že jsem předloženou práci vypracoval samostatně a použil jen výsledků vlastní práce a pramenů uvedených v seznamu literatury

Dne 31.05.2009

.....

Marek Pluta

Poděkování

Chtěl bych poděkovat svému školiteli, prof. MUDr. Lukáši Robovi, CSc. za inspiraci a laskavé vedení ve vědecké práci.

Rád bych také poděkoval doc. MUDr. Heleně Robové, Ph.D. za dlouholetou spolupráci na poli onkogynekologie.

Děkuji svým kolegům za podporu.

OBSAH

1. Úvod	6
2. Cíle práce	8
2.1. Prognostický význam peroperační a pooperační detekce sentinelových uzlin u karcinomů vulvy. Význam stanovení mikrometastáz.	8
2.2. Prognostický význam peroperační a pooperační detekce sentinelových uzlin u časných stádií karcinomů děložního hrdla. Význam stanovení mikrometastáz.	8
3. Karcinom vulvy a detekce sentinelových uzlin	9
3.1. Přehled dané problematiky	9
3.2. Metody	10
3.3. Výsledky	13
3.4. Diskuse	17
3.5. Závěr	17
4. Časná stadia karcinomů děložního hrdla a detekce sentinelových uzlin	18
4.1. Přehled dané problematiky	18
4.2. Metody	19
4.3. Výsledky	25
4.3.1. Distribuce sentinelových uzlin	25
4.3.2. Peroperační histologie – výsledky	29
4.3.3. Klinická využitelnost detekce sentinelových uzlin k redukci radikality operační léčby u časných stádií karcinomů děložního hrdla (LAP II protokol)	29
4.4. Diskuse	31
4.4.1. Distribuce sentinelových uzlin	31
4.4.2. Peroperační histologie	32
4.4.3. Klinická využitelnost detekce sentinelových uzlin k redukci radikality operační léčby u časných stádií karcinomů děložního hrdla (LAP II protokol)	33
4.5. Závěr	34
5. Souhrn	35
6. Summary	37
7. Seznam použité literatury	39
8. Seznam publikací se vztahem k tématu práce	44
9. Příloha – publikace	45

1. Úvod

Zhoubné nádory vulvy se vyznačují řadou specifík. Věková distribuce, malá frekvence zhoubných nádorů a zcela rozdílná a vysoce individualizovaná chirurgická léčba odlišují nádory vulvy od ostatních gynekologických malignit. Incidence zhoubných nádorů vulvy se v České republice dlouhodobě pohybuje mezi 3,0 – 4,1/100 000, přičemž mortalita je relativně vysoká - 1,4 – 2,0/100 000. Poměr incidence a mortality je cca 50%. Incidence v ČR v roce 2005 byla 4,1/100 000 a mortalita 2,0/100 000 [35]. V praxi to znamená, že ročně diagnostikujeme 170–200 nových onemocnění a v souvislosti s tímto onemocněním ročně umírá přibližně 75–100 žen! Průměrný věk žen s invazivními nádory je 69 let. Nejčastější invazivní zhoubné nádory jsou epiteliální a v nich jsou v 98 % zastoupeny varianty dlaždicobuněčných karcinomů. Na Gynekologicko porodnické klinice FN Motol ročně léčíme v posledních deseti letech 18 až 29 karcinomů vulvy což nám umožňuje předkládat reprezentativní soubory žen.

Incidence cervikálních karcinomů je v České republice dlouhodobě vysoká (19,1/100 000 v roce 2005 – tj 1003 nových případů), která téměř dvojnásobně převyšuje průměr zemí EU (10,2/100 000). Podobně i mortalita (6,5/100 000 žen v roce 2005 – tj 343 úmrtí) je dvojnásobná s průměrem původních zemí EU [35]. Počet nově diagnostikovaných karcinomů významně narůstá po 30 roce věku, průměrný věk žen s mikrokarcinomy je 41,2 roku a žen s invazivními karcinomy ve stadiu IB je v našem souboru 46,5 roku. Na Gynekologicko porodnické klinice FN Motol ročně léčíme v posledních deseti letech 118 až 139 karcinomů děložního hrdla z toho chirurgicky řešíme 75 až 100 karcinomů ročně. Tato operabilní stadia jsou ale prognosticky velice rozdílnou skupinou a trendem současné chirurgické léčby je využívat minimálně invazivní metody a současně individualizovat léčbu na základě předoperačních a peroperačních prognostických faktorů.

Detekce sentinelových uzlin na kterou jsem se v práci zaměřil je jedním z nejperspektivnějších postupů, který nám může pomoci v bezpečnější, individualizované péči o naše klientky. Sentinelové uzliny jsou ty, které jsou přímo drénovány z oblasti primárního nádoru. Tato definice je výstižnější než často používaná Mortonova definice „SN je první lymfatická uzlina drénovaná přímo z oblasti primárního nádoru“. V řadě případů lze vystopovat pomocí modří lymfatické trunky (kanály), které se od primárního

nádoru samostatně rozbíhají k více regionálním uzlinám. Z gynekologických zhoubných nádorů je nejvíce prací na detekci sentinelových uzlin vulvy [2;5;6;7;9], přibývá prací na detekci sentinelových uzlin u karcinomů děložního hrdla [31;32]. Cílem projektu je přispět k ověření využitelnosti konceptu sentinelových uzlin u karcinomů děložního hrdla a vulvy jako jedné z potencionálních alternativ k zvýšení bezpečnosti individualizované chirurgické léčby.

První část práce se zabývá možnostmi využití peroperační detekce sentinelových uzlin u karcinomů vulvy a současně hodnotí využitelnost tohoto postupu pro praxi. Druhá část práce vyhodnocuje výsledky experimentálního postupu ultrakrátkého protokolu aplikace radiokoloidu a patentové modři, vyhodnocuje využitelnost peroperační detekce sentinelových uzlin u karcinomů děložního hrdla a popisuje experimentální techniku identifikace a exstirpace lymfatických kanálů v paracervixu. Praktickým výstupem je pilotní projekt protokolu LAP II, jehož výsledky byly publikovány v *Gynecologic Oncology* (Pluta a kol. viz. příloha č.1) Experimentální postup méně radikálních operací u časných stadií cervikálních karcinomů (stadium IA1 s angioinvasí, stadium IA2 a stadium IB1 u nádorů do 2 cm v největším rozměru a s infiltrací do poloviny stromatu) je založen na laparoskopické identifikaci sentinelových uzlin kombinací patentové modři a radiokoloidu technetia a na následném peroperačním vyšetření sentinelových uzlin. Následně laparoskopické identifikaci eferentních modrých lymfatických kanálů (trunků), jejich exstirpaci v paracervixu a kompletní pánevní laparoskopické lymfadenektomii. U žen s peroperačně negativními sentinelovými uzlinami je provedena laparoskopicky asistovaná vaginální hysterektomie v rozsahu typ A.

Práce je částí výstupů grantových projektů IGA MZ ČR – NH 6488-3: Prognostický význam peroperační identifikace sentinelových uzlin u karcinomu děložního hrdla a vulvy, řešitel L. Rob, spoluřešitel M. Pluta (řešeno v letech 2001 až 2003) a navazujícího projektu IGA MZ ČR – 8434-3: Význam předoperačních rizikových faktorů, pooperačního hodnocení a ultramikrostagingu sentinelových lymfatických uzlin u časných stadií karcinomů děložního hrdla a vulvy, řešitel L. Rob, spoluředitel M. Pluta (řešeno 2005-2007) – tento grantový projekt byl v roce 2008 oceněn cenou ministra zdravotnictví ČR. Experimentální protokol méně radikálních operací LAP II, byl schválen vědeckou radou FN Motol a etickou komisí jako nový léčebný postup v roce 2000 a jeho aktualizovaný protokol byl schválen v roce 2007.

2. Cíle práce

2.1. Prognostický význam peroperační a pooperační detekce sentinelových uzlin u karcinomů vulvy. Význam stanovení mikrometastáz.

Vyhodnotit jednotlivé experimentální metody detekce sentinelových uzlin a vypracovat optimální časování protokolu aplikace. Vyhodnotit detekční schopnost metody, senzitivitu, specifickou a riziko falešné negativity. Analyzovat distribuci – topografii v inguinofemorální oblasti. Vyhodnotit peroperační histopatologické zpracování a porovnat výsledky s definitivním zpracováním sentinelových a nesentinelových uzlin. Vyhodnotit přínos imunohistochemického zpracování pro detekci mikrometastáz širokospektrovou protilátkou proti cytokeratinu.

2.2. Prognostický význam peroperační a pooperační detekce sentinelových uzlin u časných stadií karcinomů děložního hrdla. Význam stanovení mikrometastáz.

Vyhodnotit jednotlivé experimentální metody detekce sentinelových uzlin a vypracovat optimální časování protokolu aplikace. Vyhodnotit detekční schopnost metody. Analyzovat distribuci – topografii sentinelových uzlin. Vyhodnotit peroperační histopatologické zpracování a porovnat výsledky s definitivním zpracováním sentinelových a nesentinelových uzlin. Vyhodnotit přínos imunohistochemického zpracování pro detekci mikrometastáz širokospektrovou protilátkou proti cytokeratinu. Ověřit klinickou využitelnost detekce sentinelových uzlin k redukci radikality operační léčby u časných stadií karcinomů děložního hrdla (LAP II protokol).

3. Karcinomy vulvy a detekce sentinelových uzlin

3.1. Přehled dané problematiky

Základní léčebnou modalitou je chirurgická léčba, která je výrazně odlišná od ostatních gynekologických malignit a měla by se provádět v onkogynekologických centrech, která se na tuto léčbu specializují [1;2;3]. Pokud máme v ČR ročně 170 až 200 invazivních karcinomů a za minimum pro adekvátní chirurgický training se považuje 10 karcinomů vulvy je logické, že tyto počty mohou splnit pouze centra do kterých jsou tyto ženy referovány. U spinocelulárních karcinomů, které tvoří více než 90% zhoubných nádorů vulvy lze všeobecně říci, že pouze u invazí do 1mm (stadium IA) není třeba provádět inguinofemorální lymfadenektomii. U invazí nad 1 mm je standardním postupem regionální – inguinofemorální lymfadenektomie. Tento postup přináší pro ženy poměrně značnou časnou i pozdní morbiditu. Trend opuštění en block resekce v 80 letech a její nahrazení technikou „tří incizí“ přinesl snížení časné pooperační morbidity. Pozdní morbidita spojená s radikalitou exstirpace regionálních lymfatických uzlin invalidizovala řadu žen. Léčba perzistujících lymfedémů je obtížná a málo efektivní. Myšlenka redukce radikality inguinofemorální lymfadenektomie na pouze superficiální inguinální uzliny byla ověřována v 80 letech multicentrickou studií ve Spojených státech a pro vysoké procento recidiv ve skupině pouhých superficiálních lymfadenektomií byla tato studie předčasně ukončena [3;4]. V 90. letech byl koncept sentinelové uzliny ověřen u karcinomů prsu a melanomů. Je tedy logické že právě detekce sentinelových uzlin u vulvárních karcinomů se stala velice populární. Zhoubné nádory se vulvy staly ke konci milénia třetí nejatraktivnější lokalitou ve které se ověřují možnosti využitelnosti detekce sentinelových uzlin. V počátku 90. let minulého století řada center využívala k detekci pouze lymfotropní modř, následně i radiokoloid.technetia. Aplikace se provádí peritumorosně a aktivní uzliny jsou detekovány v několikahodinovém odstupu gamakamerou a následně peroperačně ruční gama sondou. Získanou „nejrizikovější“ sentinelovou uzlinu je pak možno histopatologicky pečlivěji zpracovat. Je v rutinní praxi nereálné provést sériové zpracování cca 12 uzlin z každé inguiny. Aby bylo možno postup detekce sentinelové uzliny použít v rutinní praxi, bylo třeba rozšířit naše znalosti zejména o nejvhodnějším časování aplikace – detekce gamakamerou – ruční peroperační detekce – exstirpace – identifikace „nejrizikovější“ uzliny – peroperační zpracování a jeho korelace s definitivním zpracováním uzlin.

3.2. Metody

Vlastní prospektivní soubor navazoval na pilotní zkušenosti z let 2001 až 2004 ve kterém jsme u 15 žen použili pouze patentovou modř a následně u 30 žen kombinaci s radiokoloidem technetia. Po pilotních zkušenostech s prvními 30 případy detekce kombinací radiokoloidu ^{99m}Tc v dávce 15 MBq (SENTI-SCINT, Mediradiopharma LTD, Fodor Jozsef NCPH, Maďarsko) a patentové modři jsme v projektu v letech 2005 až do listopadu 2007 zařadili dalších 38 žen, splňující vstupní kriteria: spinocelulární karcinom, stadium T1b a T2 <4 cm, multifokální léze nepřesahující 4 cm, klinicky nesuspektní uzliny v inguinofemorální oblasti, podepsaný informovaný souhlas. Do studie nebyly zařazeny ženy s nádory >4 cm, T3 a T4 nebo s klinicky suspektními uzlinami. Základem je aplikace peritumorosně intradermálně tenkou kožní jehlou. Radiokoloid je ředěn v menším objemu fyziologického roztoku 0.2 – 0.4 ml. U multifokálních lézí provádíme aplikaci identicky u každého ložiska. Po 45 až 60 minutách od aplikace provádíme gama kamerou (Sopha DXT s LEHR kolimátorem) identifikaci aktivity. Místo s nejvyšší aktivitou je označeno na kůži. Modř je aplikována stejnou technikou 3 až 5 minut před incizí inquiny. Peroperačně před incizí ruční gama sondou (NEOPROBE, Johnson and Johnson, USA) identifikujeme aktivitu “horkého” místa (obr. 1, 2, 3, 4). Po odstranění aktivních uzlin jsme pokračovali v kompletní inguinofemorální lymfadenektomii ze samostatných řezů. Výkon na vulvě byl individualizován od radikálních excizí, hemivulvektomií až po radikální vulvektomii.

Histopatologické zpracování sentinelových a nesentinelových lymfatických uzlin. Po exstirpaci je mimo operační pole provedena disekce lymfovaskulární tkáně a měřena aktivita v získaných tkáních. Tím je identifikována lymfatická uzlina s nejvyšší aktivitou. Pro určení „horké-aktivní“ uzliny vyžadujeme minimálně větší aktivitu než je 1/10 aktivity v místě nádoru – aplikace radiokoloidu. Po vypreparování z okolní tukové tkáně je zaslaná nejaktivnější lymfatická uzlina odeslána ke zpracování patologům. Tam je změřena v podélné ose. Uzliny menší než 8 mm jsou zpracovány vcelku, větší lymfatické uzliny jsou podélně rozpůleny a každá část je zpracována samostatně. Peroperační vyšetření materiálu probíhá standardizovaným protokolem, který sestává ze zamražení tkáně v tekutém dusíku a zhotovení 3 – 6 sériových řezů o tloušťce 4 µm, všechny v jedné úrovni řezu. Tkáňové řezy jsou k histopatologické analýze barveny Harrisovým hematoxylinem.

Po peroperačním vyšetření je materiál rozmražen a fixován po dobu 24 hodin ve 4% pufrovaném formaldehydu (pH 7,2). Následně jsou lymfatické uzliny zpracovány běžnými histologickými technikami a zality do parafinových bloků, které jsou sériově prokrajovány v intervalu 200 µm a z každé úrovně je zhotoven jeden řez barvený hematoxylin-eozinem a další řez k imunohistochemickému zpracování.

Imunohistochemicky vyšetřované řezy jsou deparafinizovány v xylenu a rehydratovány v sestupné řadě alkoholů. Endogenní peroxidázová aktivita je blokována standardním postupem po dobu 20 min při pokojové teplotě. Následně jsou tkáňové řezy inkubovány přes noc při teplotě 4°C s primární širokospektrou protilátkou proti cytokeratinu (klon KL1, Immunotech, Marseille, Francie, kat.č. 1918) v ředění 1:100. Imunkomplexy antigenu a primární protilátky jsou vizualizovány univerzálním imunoperoxidázovým polymerním detekčním kitem N-Histofine, Simple Stain MAX PO (Multi) (Nichirei Biosciences, Inc., Tokio, Japonsko, kat. č. 414154F) s využitím 3,3'-diaminobenzidin tetrahydrochlorid dihydrátátu (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Švýcarsko, kat.č. 32750) jako chromogenu.

Ostatní nesentinelové lymfatické uzliny jsou zpracovány rutinními histologickými technikami. Lymfatické uzliny menší než 8 mm jsou vyšetřeny vcelku, větší lymfatické uzliny jsou podélně rozpůleny a každá část zalita do samostatného parafinového bloku. Všechny tkáňové bloky jsou krájeny v jedné úrovni na řezy tloušťky 4 µm, které jsou dále barveny hematoxylin-eozinem.

Výsledky získané v jednotlivých skupinách jsme porovnávali χ^2 testem nezávislosti s Yatesovou korekcí pomocí čtyřpolních kontingenčních tabulek a v případě malého počtu případů dvoustranným Fisherovým exaktním testem pro srovnání rozdílů mezi skupinami s použitím počítačového programu GraphPad InStat, verze 3.05 – (GraphPadSoftware, San Diego, California). Vedle pravděpodobnosti p jsme počítali interakci (odds ratio = OR), 95% intervaly spolehlivosti (CI 95%). Výsledky byly statisticky významné, jestliže hodnota pravděpodobnosti p byla menší než 0.05.

3.3. Výsledky

Výsledky

Do projektu bylo zařazeno 38 žen splňující vstupní kritéria u kterých byla použita technika kombinace radiokoloidu a modři. Srovnání se skupinou pouze modři bylo využito u skupiny 16 žen z pilotního projektu. Průměrný věk byl 76.5 let (nejmladší 28 let, nejstarší 94 let). Ve skupině 38 žen (Tc + patent) bylo 24 centrálních nádorů (9 T1 nádory a 15 T2 nádory) a 14 laterálních nádorů (6 T1 nádory a 8 T2 nádorů). Oboustranná inguinofemorální lymfedektomie byla provedena u všech centrálně lokalizovaných nádorů a u 4 lateralizovaných nádorů. Průměrně bylo odstraněno 7.4 uzliny (3 - 13) v jedné inquina. Identifikovali jsme 92 sentinelových uzlin v 66 inquinách, což je průměrně 1.4 SLN na inquina. Tc aktivity “horké” a modré zbarvení vykazovalo 77 uzlin (83.6%), 14 uzlin (15.2%) mělo pouze Tc aktivitu a jedna uzlina (1.1%) byla pouze “modrá” bez Tc activity. Tab. 1, 2 a 3 shrnuje výsledky.

Tab. 1 – skupina detekce SLN – modř (kontrolní skupiny)

Skupina I – modř						
Nádory vulvy (spinoceulární)	Počet	SLN oboustranně	SLN jednostranně	Detekce na pacientku (DR)	Detekce na stranu (SSDR)	Falešná negativita
Centrální	6	1	3	66.7%	12/5 - 41.7%	1 (16.7%)
Lateralizované	10	0	7	70.0%	10/7 - 70.0%	0
Celkem	16	1	10	68.8%	22/12 - 54.5%	1(6.25%)

Tab. 2 – skupina detekce SLN - kombinace modř a radiokoloid

Skupina II – kombinace modř a Tc						
Nádory vulvy (spinocelulární)	Počet	SLN oboustranně	SLN jednostranně	Detekce na pacientku (DR)	Detekce na stranu (SSDR)	Falešná negativita
Centrální	24	24	0	100%	48/46 – 95.8%	0
Lateralizovaný	14	4	10	100%	18/18 - 100%	0
Celkem	38	28	10	100%	66/64 – 97.0%	0

Tab. 3 – Výsledky peroperační histologie a definitivních nálezů

Detection rate	38 žen, 100% detekce na pacientku
Frosen section	37 žen, 90 uzlin (u jedné ženy s bilat. detekcí nebylo FS provedeno) 90 vyšetřených uzlin FS – 64 inquit u celkem 37 žen 13 žen FS pozitivní (14 uzlin) 1 žena falešná negativita FS (7.1%) HE pozitivní 1 žena – pozitivní izolované nádorové buňky ITC (7.1 %)
Pozitivní uzliny	38 žen / 14x pozitivní – 36.8% pozitivita

Pozitivní lymfatické uzliny: lymfatické uzliny s metastatickým postižením jsme detekovali u 14 z 38 žen (36.8%). Pouze v sentinelové uzlině jsme detekovali metastatické postižení u 9 žen. U 5 žen byla metastáza kromě sentinelové uzliny i v dalších 1 až 3 uzlinách. U jedné ženy seriové prokrájení s HE prokázalo mikrometastázu sentinelové uzliny do vel. 2 mm a u jedné ženy v jedné sentinelové uzlině imunohistochemicky (IHC) prokázané izolované nádorové buňky (Isolated Tumor Cells - ITC).

Distribuce a topografie sentinelových uzlin

Velkým přínosem pro poznání problematiky in vivo drenáže byla naše výsledky distribuce sentinelových uzlin. Topograficky jsme inquitální prostor rozdělili na mediální, střední a laterální část (obr. 5). Hluboké femorální uzliny jsme definovali jako uzliny lokalizované mediálně a v těsném kontaktu s femorální vénou (obr. 6). Zde jsme identifikovali 16,1% sentinelových uzlin. To vysvětluje, že nestačí odstranit pouze superficiální systém ale že cca 10-15% uzlin tzv. sentinelových tedy s predilekční drenáží se nachází v hlubokém systému tzv. „femorální - hluboké uzliny“.

3.4. Diskuze

Kombinace radiokoloidu a modři je jednoznačně nejsenzitivnější metodou. Naše dílčí zkušenosti, techniku jsme publikovali v našem písemnictví Rob L. et al.: Detekce sentinelových uzlin u karcinomu vulvy –metody a technika (příloha č. 9). V předloženém souboru disertace jsme dosáhli 100% detekce na pacientku (DR) a 96% detekci na stranu (SSDR). U karcinomu vulvy byla konsenzem expertů v únoru 2008 v Sydney doporučena detekce a exstirpace sentinelové uzliny jako alternativa standardní inguinofemorální lymfadenektomie [54]. Naše publikace [46] byla jednou z deseti prací, která byla experty vybrána jako metodicky zcela vyhovující a o které se panel expertů opíral ve svém rozhodnutí. Podmínkou je, aby se tento postup používal u časných stadií (nádory do 4 cm a nesuspektní spádové uzliny - palpačně a jednou ze zobrazovacích metod s kterou má pracoviště zkušenosti - UZ event. CT event. MRI ev PET – CT). Techniku může používat pouze pracoviště se zkušenostmi v detekci sentinelových uzlin (doporučeno ověření techniky na minimálně 20 případech) a s minimální frekvencí 10 případů ročně. Dále je podmínkou úzká spolupráce onkogynekologů, oddělení nukleární medicíny a patologie. Detekce sentinelové uzliny nám v dnešní době přináší jednak možnost peroperační histologie. Sami patříme k zastáncům této techniky i s vědomím, že v cca 10-15% bude výsledek falešně negativní [12]. Námi užívanou technikou ale vždy šlo o metastatická ložiska menší než 2 mm tedy o tzv.mikrometastázy. V žádném případě, jsme nenašli pozitivitu v další uzlině pokud byla v sentinelové uzlině pouze mikrometastáza.

3.5. Závěr

Detekce kombinací radiokoloidu a modři je metodou volby.

V praxi se osvědčil protokol s 3 hodinovým odstupem mezi aplikací a chirurgickou detekcí.

Sériové zpracování s vyšetřením HE sami považujeme v dnešní době za dostačující k detekci mikrometastáz [16;11], význam ITC a IHC musí ověřit daleko větší a multicentrické studie. Přínos IHC vyšetření cytokeratínem v našem souboru neměl žádný klinicky relevantní přínos.

Na Gynekologicko porodnické klinice FN Motol jsme zavedli od roku 2008 detekci a exstirpaci sentinelové uzliny u informovaných a poučených žen s nádory do 3 cm bez suspektních lymfatických uzlin (klinicky a UZ vyšetřením). Zařazení metody sentinelové

uzliny na vulvě bylo diskutováno v aktualizaci doporučených postupů ČGPS v roce 2009 vznikl konsensus, který je ve shodě s mezinárodním doporučením, které je nyní v tisku [54].

4. Časná stadia karcinomů děložního hrdla a detekce sentinelových uzlin

4.1. Přehled dané problematiky

Koncept radikálního odstranění primárního nádoru s odstraněním paracervixu a se současně provedenou systematickou regionální lymfadenektomií byl u nádorů děložního hrdla využíván a zdokonalován více než 100 let. Představy o lymfatické drenáži vycházely z prací na kadaverech a byly dále rozšiřovány histopatologickými výsledky mnoha generací chirurgů a řadou prací radiodiagnostiků [20;21]. U časných stadií operabilních karcinomů děložního hrdla je však pozitivita regionálních uzlin pouze v 5 až 25%. Teoreticky lze říci, že u 75 až 95% žen je radikální systematická lymfadenektomie výkonem „zbytečným“ [17;18;19]. U časných stadií karcinomů děložního hrdla je v posledních 15 letech zřetelná snaha využívat méně invazivní a méně radikální postupy, které umožní snižovat časnou i pozdní morbiditu a současně dosahovat stejných nebo lepších onkologických výsledků. Do těchto postupů spadá i detekce tzv. „sentinelových“ neboli „strážných“ lymfatických uzlin. Sentinelové lymfatické uzliny (SLN) jsou ty, které jsou první a přímo drénovány z oblasti primárního nádoru. V řadě případů lze vystopovat díky metodice peroperačního mapování pomocí modří lymfatické trunky (kanály), které se od primárního nádoru samostatně rozbíhají k jedné nebo více regionálním uzlinám. Přestože se vedou spory o autorství názvu „sentinelová uzlina“, je prvenství díky přesné definici přisuzováno Cabañasovi který nazval a popsal v roce 1977 sentinelovou uzlinu u karcinomu penisu. Nejčastější histologické varianty spinocelulárních karcinomů a adenokarcinomy děložního hrdla se šíří v časných stadiích ve více než 99% lymfogenně, hematogenní metastazování je u těchto nejčastějších histopatologických typů raritní. To vyvolalo poměrně intenzivní zájem o možnost využít techniku mapování a detekci sentinelových uzlin. Předložené výsledky jsou dnes desetiletou systematickou prací poměrně širokého mezioborového kolektivu (gynekologických onkologů, patologických anatomů, pracovníků nukleární medicíny a radiodiagnostiků).

4.2. Metody

Pro vyhodnocení distribuce sentinelových uzlin jsme použili výsledků pilotních zkušeností se 183 karcinomy, které jsme publikovali [43] a následně bylo do projektu

zařazeno v letech 2005 až 2007 dle plánu dalších 166 žen (deset bylo z projektu vyřazeno – pro zjištění pokročilejších nálezů, neprovedení peroperační histologie z technických důvodů a u dvou žen odstoupením od projektu). Celkem tedy distribuci hodnotíme u 339 žen na 915 sentinelových uzlinách. Data byla vedena dle protokolu LAP I (prospektivní studii mapování sentinelových uzlin s použitím kombinace radiokoloidu technecia a patentové modři u časných stadií invazivních karcinomů) [39;40;41;42]. Využitelnost peroperační identifikace s peroperačním vyšetřením pomoci mražených řezů jsme hodnotili na prospektivním souboru 156 žen (453 sentinelových uzlin). Pro ověření klinické využitelnosti detekce sentinelových uzlin k redukci radikality operační léčby u časných stadií karcinomů děložního hrdla byl etickou komisí schválen v prosinci 2000 „konzervativní“ protokol léčby časných invazivních nádorů děložního hrdla (LAP II protokol). Do tohoto protokolu bylo v letech 2001 až 2007 zařazeno 60 žen, které souhlasily s méně radikální operační léčbou – laparoskopickou identifikací sentinelových uzlin a v případě negativních sentinelových uzlin v peroperačním vyšetření byla provedena laparoskopická systematická pánevní lymfadenektomie a vaginální hysterektomie. V případech že byl vizualizovatelný eferentní lymfatický kanál v parametriu byla vypracována experimentální technika selektivní exstirpace těchto kanálů s případnou exstirpací parametrálních lymfatických uzlin. Do protokolu byly zařazeny pacientky s karcinomem děložního hrdla stádia IA1 s lymfangioinvazí, stádia IA2 a stádia IB1 s maximální velikostí do 20mm a menším než ½ stromatu děložního hrdla a negativním SCC tu markerem v případě spinocelulárních karcinomů. Velikost stromální invaze byla ověřena expertním UZ vyšetřením nebo zobrazením pomocí MRI [26;49]. V případě pozitivity peroperačního histologického vyšetření sentinelových uzlin byla operace konvertována na otevřený operační přístup a byla provedena radikální hysterektomie v rozsahu Wertheim III (příloha č. 1). Viz. graf 1

V chirurgické části jsme zaznamenávali dle protokolu přesnou lokalizaci detekovaných sentinelových uzlin, lokalizaci hlavních lymfatických kanálů, komplikace a dle sjednocených pravidel byly psány operační protokoly. Prvním krokem nového chirurgického postupu je aplikace lymfotropní látky radiokoloidu technecia 99 a patentové modři. K detekci sentinelových uzlin jsme použili patentovou modř v množství 2 ml ředěnou v 2 ml fyziologického roztoku (BLEU PATENTÉ V 2.5 %, Guerbet, Francie) a od roku 2002 standardně podáváme radiokoloid ^{99m}Tc v dávce 20 MBq (SENTISCINT, Mediradiopharma LTD, Fodor Jozsef NCPH, Maďarsko) a 2 ml patentové modři. Radiokoloid ^{99m}Tc je naředěn do objemu 2 ml fyziologického roztoku a je aplikován technikou 4 kvadrantů (obr. 7) peritumorosně po úvodu do celkové anestezie. Patentovou modř aplikujeme intracervikálně stejnou technikou po předchozí vizualizaci malé pánve. První fáze operace spočívá v identifikaci sentinelových uzlin, vizuální detekci průběhu lymfatických kanálů a jejich exstirpaci (obr. 8, 9, 10, 11, 12). Histopatologické zpracování sentinelových a nesentinelových lymfatických uzlin bylo prováděno jednotnou metodikou jako u karcinomů vulvy. Po exstirpaci je mimo operační pole provedena disekce lymfovaskulární tkáně a měřena aktivita v získaných tkáních. Tím je identifikována lymfatická uzlina s nejvyšší aktivitou. Pro určení „horké-aktivní“ uzliny vyžadujeme minimálně větší aktivitu než je 1/10 aktivity v místě nádoru – aplikace radiokoloidu. Po vypreparování z okolní tukové tkáně mimo operační pole je zasláná nejaktivnější lymfatická uzlina odeslána ke zpracování patologům. Tam je změřena v podélné ose. Uzliny menší než 8 mm jsou zpracovány vcelku, větší lymfatické uzliny jsou podélně rozpůleny a každá část je zpracována samostatně. Peroperační vyšetření materiálu probíhá standardizovaným protokolem, který sestává ze zamražení tkáně v tekutém dusíku a zhotovení 3 – 6 sériových řezů o tloušťce 4 μm , všechny v jedné úrovni řezu. Tkáňové řezy jsou k histopatologické analýze barveny Harrisovým hematoxylinem.

Po peroperačním vyšetření je materiál rozmražen a fixován po dobu 24 hodin ve 4% pufrovaném formaldehydu (pH 7,2). Následně jsou lymfatické uzliny zpracovány běžnými histologickými technikami a zality do parafinových bloků, které jsou sériově prokrajovány v intervalu 200 μm a z každé úrovně je zhotoven jeden řez barvený hematoxylin-eozinem a další řez k imunohistochemickému zpracování.

Imunohistochemicky vyšetřované řezy jsou deparafinizovány v xylenu a rehydratovány v sestupné řadě alkoholů. Endogenní peroxidázová aktivita je blokována standardním postupem po dobu 20 min při pokojové teplotě. Následně jsou tkáňové řezy inkubovány přes noc při teplotě 4°C s primární širokospektrou protilátkou proti cytokeratinu (klon KL1, Immunotech, Marseille, Francie, kat.č. 1918) v ředění 1:100. Imunkomplexy antigenu a primární protilátky jsou vizualizovány univerzálním imunoperoxidázovým polymerním detekčním kitem N-Histofine, Simple Stain MAX PO (Multi) (Nichirei Biosciences, Inc., Tokio, Japonsko, kat. č. 414154F) s využitím 3,3'-diaminobenzidin tetrahydrochlorid dihydrátu (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Švýcarsko, kat.č. 32750) jako chromogenu.

Ostatní nesentinelové lymfatické uzliny jsou zpracovány rutinními histologickými technikami. Lymfatické uzliny menší než 8 mm jsou vyšetřeny vcelku, větší lymfatické uzliny jsou podélně rozpůleny a každá část zalita do samostatného parafinového bloku. Všechny tkáňové bloky jsou krájeny v jedné úrovni na řezy tloušťky 4 µm, které jsou dále barveny hematoxylin-eozinem.

Základem pro definitivní histopatologické zpracování byla úzká spolupráce operatéra, který dělohu a parametria na operačním sále topograficky orientoval s parametrii na polystyrénovou desku a sentinelové uzliny i ostatní uzliny jsou samostatně identifikovány dle jednotlivých topografických oblastí. Důsledná topografie lokalizace sentinelových a dalších exstirpovaných uzlin byla i u laparoskopických operací, kde po odstranění jedné oblasti byly tyto uzliny extrahovány z dutiny břišní. Výsledky získané v jednotlivých skupinách jsme porovnávali χ^2 testem nezávislosti s Yatesovou korekcí pomocí čtyřpolních kontingenčních tabulek a v případě malého počtu případů dvoustranným Fisherovým exaktním testem pro srovnání rozdílů mezi skupinami s použitím počítačového programu GraphPad InStat, verze 3.05 – (GraphPadSoftware, San Diego, California). Vedle pravděpodobnosti p jsme počítali interakci (odds ratio = OR), 95% intervaly spolehlivosti (CI 95%). Výsledky byly statisticky významné, jestliže hodnota pravděpodobnosti p byla menší než 0,05

4.3. Výsledky

4.3.1. Distribuce sentinelových uzlin

Detekci sentinelových uzlin je třeba udávat u cervikálních karcinomů nejenom na pacientku ale vzhledem k tomu, že děloha má oboustrannou pánevní drenáž, je třeba vždy udávat tzv. SSDS (specific side detection rate – tedy detekci na jednu stranu pánve). Zásadní závěry této práce jsou, že je statisticky významně lepší detekce při užití kombinace radiokoloid a modř než pouze modř, vysoké senzitivity i specificity jsme dosáhli u nádorů s menším rozměrem, detekční schopnost se snižuje u objemných nádorů a nádorů po neoadjuvantní chemoterapii (příloha č. 3). Tyto výsledky nám dovolily otevřít provokativní otázku s pilotními výsledky „Sentinel lymph node identification (SLNI) in the management of conservative surgery in early cervical cancer“ Rob a kol. (příloha č. 2).

Do listopadu 2007 jsme spolu s pilotním projektem a současným projektem shromáždili zatím největší soubor detekce sentinelových uzlin publikovaný z jednoho pracoviště. Tato data aktuálně připravujeme do další publikace. Distribuce 915 sentinelových uzlin u celého souboru 339 žen je na obr. 13, na obr. 14 je distribuce 77 pozitivních sentinelových uzlin u 63 žen. Tyto výsledky jasně ukazují, že pro časná stadia cervikálních karcinomů je krátký protokol radiokoloidu Technetia a modři a vysoce efektivní.

V tab. 4 jsou shrnuta vlastní aktualizovaná data 339 žen. Statisticky je vysoce významný rozdíl mezi užitím pouze modři a kombinace radiokoloidu a modři ($P < 0.0001$). Nejlepších výsledků se dosahuje u nádorů do 20 mm, kdy jsme exaktně schopni radiokoloid i modř aplikovat peritumorózně. U pokročilejších nádorů klesá detekční schopnost stejně tak i u žen po předchozí neoadjuvantní chemoterapii.

Tab. 4. Srovnání detekce patentové modři a kombinace radiokoloidu a modři (FN Motol)

	Počet žen	Stadium	Detekce (DR%)	Stranová detekce (SSDR%)
Patent blue	103	st I<20mm	91,2%	83,6%
		IB1>20mm	80,0%	70,0%
		IB2 (NAC)	60,0%	50,0%
Technecium + patent blue	236	st I<20mm	99,1%	95,5%
		IB1>20mm	95,8%	92,4%
		IB2 (NAC)	92,6%	89,9%

4.3.2. Peroperační histologie – výsledky

Dalším úkolem bylo po pilotních zkušenostech vyhodnotit využitelnost peroperační identifikace s peroperačním vyšetřením pomocí mražených řezů. Vyhodnotili jsme distribuci 453 sentinelových uzlin u 156 žen a distribuci 33 pozitivních uzlin a u všech žen této skupiny bylo provedeno peroperační vyšetření sentinelových uzlin. Distribuce těchto sentinelových uzlin je shodná s předchozími výsledky. Spolehlivé peroperační vyšetření považujeme vzhledem k lokalizaci regionálních uzlin v retroperitoneu za klíčové pro další rozvoj této techniky.

Tab. 5 Výsledky peroperačních histologií a definitivního seriového zpracování uzlin

156 žen	celkem 453 sentinelových uzlin
28 žen pozitivní uzliny (17,95%)	celkem 33 sentinelových uzlin pozitivních
FS pozitivní	u 27 žen – 31 uzlin
1 žena FS negativní	supraobturatorní definitivní histologie mikrometastáza vel. 2x1mm způsob detekce - HE
1 žena vlevo FS pozitivní zevní il. vpravo FS zevní ilika negativní	definitivní histologie mikrometastáza vel. 1x1mm způsob detekce - IHC

Námi použitá technika peroperační histologie detekovala 31 z 33 následně vyhodnocených pozitivních uzlin (Tab. 5). Detekovala všechna metastatická ložiska v sentinelových uzlinách větší než 2 mm. U 4 žen FS detekovala mikrometastázy (ložiska do 2 mm) v periferních splavech uzlin, ve dvou případech FS nedetekovala mikrometastázu. U jedné ženy se jednalo o jedinou mikrometastázu, ostatní uzliny byly negativní a u druhé ženy byla v pravostranné uzlině nedetekována mikrometastáza, ale na kontralaterální stěně byla peroperačně detekována metastáza. Falešně negativní FS byla v 2 z 33 pozitivních uzlin – 6,1%. Peroperační FS námi užitou technikou detekovala všechna metastatická ložiska nad 2 mm. Z šesti mikrometastáz nebyly peroperační biopsií detekovány mikrometastázy ve dvou případech.

4.3.3. Klinická využitelnost detekce sentinelových uzlin k redukci radikality operační léčby u časných stadií karcinomů děložního hrdla (LAP II protokol).

V protokolu LAP II byly 3 pacientky ve stádiu IA1 s lymfangioinvazí, 11 pacientek ve stádiu IA2 (36,4% s lymfangioinvazí) a 46 pacientek ve stádiu IB1 splňující vstupní kritéria (26,1% s lymfangioinvazí). 50 případů s dlaždicovým karcinomem a 10 případů s adenokarcinomem. Sentinelové uzliny jsme detekovali ve všech případech. Detekční rate 100%, specific site detection rate 94,2%. Průměrný počet sentinelových uzlin na jednu stranu byl 1,4. Pozitivní uzliny byly detekovány u 5 pacientek (8,3%) (Tab 6).

Tab. 6

věk	stage	Rozměr tumoru	lymfangioinvaze	FS -SLN	Velikost meta V SLN	Meta v LN non SLN
48	IA2	6x3,5 mm	Ano	3 negativní	1x1,5 mm 1xITC (IHC)	Ne
52	IB1	9x3 mm	Ne	1 pozitivní 2 negativní	1x5 mm	Ne
50	IB1	10x2,5 mm	Ano	2 negativní	1x0,5 mm	Ne
42	IB1	8x5 mm	Ano	1 pozitivní 2 negativní	1x8 mm	Ne
56	IB1	12x4 mm	Ne	1 pozitivní 1 negativní	1x10 mm	Ne

Všechny pacientky s pozitivitou v uzlinách měly přítomné metastázy pouze v sentinelových uzlinách. Žádné falešně negativní sentinelové uzliny nebyly zaznamenány u všech 60 pacientek. Třikrát bylo pozitivní peroperační histopatologické zpracování, v těchto případech byly pacientky v souladu s protokolem konvertovány k otevřené radikální hysterektomii typ Wertheim III. V případě negativní peroperační biopsie jsme pokračovali v systematické pánevní laparoskopické lymfadenektomii. Ve dvou případech bylo peroperační histologické vyšetření sentinelových uzlin falešně negativní. V obou případech se jednalo o mikrometastázy menší než 2 mm a byly detekovány technikou sériových řezů sentinelových uzlin. V jednom případě jsme identifikovali imunohistochemicky izolované nádorové buňky. U prvních 25 pacientek byl průměrný zisk lymfatických uzlin 26,8 (15-56), ve druhém období, po získání většího

množství zkušeností a větší důvěře v technologii identifikace sentinelových uzli jsme u pacientek č. 26-60 odstranili v průměru 16,5 lymfatických uzlin (5-28). Medián follow-up byl 47 měsíců (12-92). Nezaznamenali jsem žádnou závažnou peroperační komplikaci. U prvních 25 pacientek jsme pooperačně detekovali v 6 případech (24%) lymfocytu, z toho u 3 pacientek jsme odstranili více jak 24 uzlin. V druhé skupině 32 pacientek jsme zaznamenali pouze 2 (6,3%) lymfocysty. U 55 pacientek, které absolvovali protokol LAP II, jsme nezaznamenali žádnou recidivu. 5 pacientek s pozitivními lymfatickými uzlinami jsou bez známek onemocnění po 24, 42, 44, 60 a 74 měsících follow-up. 4 z těchto pacientek absolvovaly adjuvantní teleradioterapii bez chemoterapie (příloha č. 1).

4.4. Diskuze

4.4.1 Distribuce sentinelových uzlin

Možnost detekce sentinelových uzlin cervikálního karcinomu je závislá na několika faktorech. Technika aplikace detekční látky, časování aplikace vzhledem k zahájení operace, kombinace detekčních látek, velikost partikule detekčního koloidu, velikost tumoru (stádium a relativní velikost v porovnání se zbytkem zdravého stromatu – volumetrie) [31;32;33;36;38;48]. Náš protokol se ukázal v průběhu sledování jako vysoce efektivní. Detekční rate u menších nádorů pod 20 mm při využití kombinované techniky přesáhl 99%. Naším názorem ale je, že samotný detekční rate nemá dostatečně vypovídající hodnotu vzhledem k tomu, že děloha není párový orgán, je uložena centrálně a lymfatická drenáž probíhá biletarálně na obě strany pánve. Námi upřednostňovaný popis pomocí specific side detection rate (SSDR) lépe popisuje úspěšnost jednotlivých technik, vzhledem k výše zmíněnému. Krátký protokol se ukázal jako velice efektivní v detekci sentinelových uzlin. Jeho úspěšnost je stejná jako u protokolů delších (3-, 6-ti hodinových, jednodenních) [31;32;33], které jsou používány na jiných pracovištích. Ve skupině s kombinovanou technikou jsme v průměru detekovali 1,6 sentinelových uzlin na jednu stranu, ve skupině kde byla použita pouze patentová modř jsme detekovali v průměru 1,5 sentinelových uzlin na jednu stranu. Některé práce publikovali více detekovaných sentinelových uzlin na pacientku [32;33]. Toto považujeme za nevýhodu dlouhých protokolů, kdy po delším odstupu od aplikace se zobrazí více uzlin v řadě. Naše technika s použitím koloidu technecia o velikosti částic 200-600 nm se ukázala jako výhodná z hlediska rychlého vychytávání do lymfatického systému ale zároveň velikost částic je taková, že po nutnou dobu setrvává v sentinelové uzlině a není distribuována do dalších, vyšších etáží systému. Tímto je zabráněno falešným výsledkům.

Distribuce sentinelových uzlin u karcinomu děložního hrdla je zcela odlišná in vivo v porovnání s distribucí zjištěnou v anatomických studiích na kadaverech. V 85% jsme sentinelové uzliny detekovali v oblasti zevních ilických cév a nad obturátorovým nervem. Ostatní lokalizace jsou méně frekventní. Sentinelovou uzlinu ve vlastních laterálních parametriích jsme identifikovali do 5%. Naopak, stejně do 5% jsme identifikovali sentinelovou uzlinu v presakrální oblasti, která při standardní technice výkonu může být minuta. Naše zkušenosti jsou podobné jako v ostatních publikovaných pracích. Paraaortální sentinelovou uzlinu jsme nedetekovali v žádném případě. Některé práce je v této oblasti detekují [33]. Jedná se buď o jinou nomenklaturu, kdy presakrální uzliny již popisují jako paraaortální nebo je použit protokol s delším časováním nebo s menšími partikulami. Nicméně v dosavadních dostupných publikacích nebyly zjištěny sentinelové uzliny paraaortální s izolovanou metastázou [33;38].

4.4.2 Peroperační histologie

Možnost peroperačního histopatologického zpracování sentinelových uzlin pokládáme za klíčovou v aktuální operační léčbě karcinomů děložního hrdla. Stejně jako u nádorů vulvy patříme k zastáncům této techniky i s vědomím, že v cca 10-15% bude výsledek falešně negativní. Námi užívanou technikou ale vždy šlo o metastatická ložiska menší než 2 mm tedy o tzv. mikrometastázy, navíc 4 mikrometastázy ze 6 byly technikou peroperační biopsie odhaleny. V žádném případě, jsme nenašli pozitivitu v další (nesentinelové) uzlině pokud byla v sentinelové uzlině pouze mikrometastáza. V jednom případě jsme metastázu odhalili na základě imunohistochemického vyšetření.

Pro klinickou praxi se zdají být výstupy naší práce dostačující. Ložiska větší než 2 mm byly v našem souboru bezpečně identifikována, ložiska menší, která byla označena jako falešně negativní, byla dodatečně nalezena, zároveň ale technikou detekce sentinelové uzliny byla odstraněna a již nebyla zjištěna žádná metastatická ložiska mimo sentinelovou uzlinu. Samotná detekce mikrometastáz je relativně novým momentem [53]. Standardně nelze všechny uzliny zpracovávat technikou sériových řezů v celém objemu odebrané tkáně. Lze to ale u „vysoce rizikových“ sentinelových uzlin. Tento moment zároveň vysvětluje fakt, že u časných stádiích jsme detekovali více metastáz v uzlinách v porovnání s předchozími soubory, kde pacientky byly léčeny standardní operační technikou. Delší odstup od primární léčby a větší počet multicentrických studií bude moci odpovědět, zda právě detekce sentinelových uzlin u prognosticky příznivých časných

stádií nebude moment, kdy zvýšíme dlouhodobé přežití pacientek. Těch, u kterých by standardní léčba mohla ponechat drobnou lymfatickou (sentinelovou) uzlinu s mikrometastázou nepovšimnutou in situ.

U jedné pacientky bylo identifikováno metastatické ložisko ve formě izolovaných nádorových buněk pomocí imunohistochemického vyšetření. Jasný klinický význam takto detekovaných metastáz ale v současné době není znám. Lze spekulovat, zda se jedná už o časně detekovaný metastatický klon nebo zda se jedná o zachycený aktivní proces v lymfatické uzlině, který by následně vedl ke zničení metastatických buněk.

4.4.3 Klinická využitelnost detekce sentinelových k redukci radikality operační léčby u časných stadií karcinomů děložního hrdla (LAP II protokol).

Standardním operačním postupem léčby karcinomů děložního hrdla je radikální hysterektomie s resekci parametrií, horní části pochvy a systematickou lymfadenektomií [24;25;37;45]. V 90. letech 20. století byl akceptován koncept modifikované, radikální hysterektomie [34] a v roce 2002 byla publikována práce dostatečnosti radikální hysterektomie typ II oproti typu III při negativních lymfatických uzlinách [29;30]. Množství studií popisuje korelaci mezi infiltrací cervikálního stromatu a možností metastáz do lymfatického systému [27]. Analýza prací u nádorů IA2 a IB1 pod 20 mm s negativními uzlinami ukázala riziko postižení parametrií pod 1% [22;23;28;47;50]. Jako jediná na světě prospektivní práce z našeho pracoviště sledovala závislost postižení parametrií při negativních sentinelových uzlinách [51] (příloha č. 5). Při negativních sentinelových uzlinách jsme u časných nádorů neprokázali infiltraci parametrií. Obráceně, při pozitivních sentinelových uzlinách stoupá riziko postižení parametrií až na 28%.

V našem souboru LAP II jsme u sentinel negativních pacientek nezaznamenali recidivu. Postižení izolovaných sentinelových uzlin v parametriu bez postižení jiných sentinelových uzlin je velmi vzácné (pod 1%). V našem experimentálním chirurgickém protokolu kdy odstraňujeme sentinelovou lymfatickou uzlinu a selektivně odstraňujeme parametrální lymfatický kanál, event. modrou uzlinu v paracervikální tkáni toto riziko velmi významně eliminujeme. Tento postup společně s technikou peroperačního histopatologického zpracování je nutnou podmínkou méně radikálních postupů při operační léčbě invazivních karcinomů děložního hrdla a velmi výrazně snižuje možné riziko recidiv.

Pooperační morbidita je vázána nejen na samotný rozsah resekce, ale i na množství odebraných uzlin. Při množství větším než 25 velmi výrazně stoupá riziko lymfedému. Proto jsme ve druhé skupině po získání větších zkušeností a pilotních výsledcích redukovali počet odebraných lymfatických uzlin.

Protokol LAP II je postup experimentální, je vyhrazen do klinických studií a pro pracoviště splňující nejvyšší kritéria pro onkogynekologickou léčbu. Nezbytným předpokladem je, že operaci provádí chirurg, který je při pozitivních uzlinách schopen provést konverzi na klasickou radikální hysterektomii typ III.

4.5. Závěr

Z klinického pohledu je pro koncept sentinelových uzlin důležité, že lze detekovat všechny klinicky relevantní metastázy peroperačně. U žádné ženy s mikrometastázou v sentinelové uzlině nebyla detekována metastáza v jiné „nesentinelové“ uzlině. Lymfatické mapování a detekce sentinelových uzlin rozšířila naše vědomosti o in vivo anatomii regionálních lymfatických uzlin děložního hrdla. Hlavní cestou drenáže je laterální trunkus kdy mediální částí laterálního parametria probíhá lymfatický kanál, křížuje obliterovanou chordu umbilikální arterie a míří do oblasti zevních ilických cév nebo níže do supraobturatorního prostoru. Méně často probíhá kanál do presakrální oblasti cestou zadních parametrií nebo do oblasti bifurkace a společných ilik. Pouze do 5% sentinelových uzlin lze detekovat v mediální části laterálního parametria [39;43;44]. Kombinace radiokoloidu a modři je jednoznačně nejsenzitivnější metodou [33,38,39,43,44]. Detekce sentinelové uzliny nám v dnešní době přináší možnost peroperačního vyhodnocení a tím modifikaci radikality léčby. Následné sériové zpracování s imunohistochemickým vyšetřením umožňuje výrazně vyšší spolehlivost negativy nejrizikovějších uzlin. V rutinní praxi je nereálné provádění sériového zpracování a ultramikrotaging všech odstraněných uzlin.

5. Souhrn

Zhoubné nádory vulvy jsou relativně méně častým onemocněním, vyžadující individualizovaný přístup k léčbě. Kompletní inkuinofemorální lymfadenektomie byla do dnešní doby stále standardním postupem, zatížený poměrně vysokou krátkodobou i dlouhodobou morbiditou. Anatomický vztah mezi vulvou a regionálním lymfatickým systémem, kterým je inguinofemorální oblast je základem o který se opírá současná strategie méně radikálních výkonů do kterých spadá i koncept identifikace a detekce sentinelových uzlin. Techniku aplikace, časování a techniku identifikace jsme publikovali v našem i zahraničním písemnictví [46] (příloha č. 9). Výsledky naší práce byly mezi 10 publikacemi, ze kterých vychází Sydney konsenzus 2008 ISSN vytvořený expertní skupinou. Tento konsenzus doporučuje u spinocelulárních karcinomů do 4 cm stadia I a II , zařadit do standardů léčby pouze detekci sentinelové uzliny jako alternativu standardní inguinofemorální lymfadenektomie. Podmínkou je, aby byl výkon prováděn v onkogynekologických centrech mající zkušenosti s identifikací sentinelových uzlin [52;54]. Zásadním originálním poznatkem, který přinesla naše práce o in vivo mapování byly poznatky o topografii a lokalizaci sentinelových uzlin. Pokud superficiální oblast inguiny rozdělíme na třetiny, v zevní třetině jsme nedetkovali sentinelovou uzlinu. Podobně

i detekce sentinelových uzlin v 15% v oblasti hlubokých femorálních uzlin. To vysvětluje proč pouhé odstranění superficiálních inkuinálních uzlin ve studiích srovnávající komplexní versus superficiální lymfadenektomii vedlo k více než 10% nárůstu časných recidiv v inkuinofemorální oblasti.

V současné době jsou karcinomy vulvy po karcinomu prsu a melanomech třetí lokalizací u které je možno akceptovat za jasně definovaných podmínek koncept sentinelové uzliny jako standard léčby. Tento postup výrazně snižuje časnou i pozdní morbiditu a je významným příspěvkem pro rutinní klinickou praxi [54].

Karcinomy děložního hrdla jsou frekventním onemocněním. Standardní operační léčba časných stádií spojená s hysterektomií, resekci parametrií, proximální části pochvy a pánevní event. paraaortální lymfadenektomií přináší významnou poléčebnou morbiditu. Tento fakt je alarmující zvláště pokud si uvědomíme, že u časných stádií je v mnoha případech tato razantní operační léčba overtreatment. Detekce sentinelové uzliny a její peroperační zpracování je významným momentem, který by mohl hrát roli v redukci

radikality operační léčby a následně v redukci pooperačních komplikací. Pro širokou aplikaci a akceptaci této metody toho času ale chybí dostatečné množství dat. V mezinárodních publikacích je uvedeno velké množství protokolů identifikace sentinelových uzlin, různé časování aplikace a různé detekční látky. Náš protokol detekce sentinelových uzlin se v porovnání s ostatními publikovanými protokoly ukázal jako vysoce efektivní. U nádorů pod 2 cm jsme dosáhli detekce 99%, respektive 95% SDR. Aktuální benefit detekce sentinelových uzlin spočívá v identifikaci nejrizikovější lymfatické uzliny pro výskyt metastáz a její zpracování ultramikrostagingem. Tento postup je u celého odebraného materiálu technicky a ekonomicky nemožný. Peroperační histopatologické zpracování je stále kontroverzní a představuje dle literárních údajů cca 10% riziko pro falešně negativní výsledky. V našem souboru byla při peroperačním vyšetření minuta pouze ložiska na úrovni mikrometastáz a v těchto případech již nebyly zaznamenány metastatická ložiska v uzlinách „nesentinelových“. Tato informace nás již dnes vede k určité redukci radikality resekcí výkonů a samotného rozsahu lymfadenektomie. Na základě pilotních projektů a průběžných výsledků prospektivního sledování jsme vypracovali několik experimentálních protokolů odsouhlasených etickou komisí. Protokol LAP I pro konzervativní, fertilitu zachovávající operace (viz. příloha č. 6) akceptovala americká Society of Gynecologic Oncologists a tento protokol zavedla do multicentrické, mezinárodní, prospektivní studie, které se účastní pracoviště ze Spojených států, Kanady, Francie a pracoviště naše. Protokol LAP II je prezentován v disertační práci. Sentinelová uzlina je pravděpodobně marker spojený u časných nálezů s rizikem postižení parametří. Na potvrzení této myšlenky je ale nutný větší a multicentrický soubor.

Zcela nové informace přinesla detekce sentinelové uzliny o in vivo drenáži děložního hrdla. Maximum (85%) drenáže běží do laterálních částí – zevní ilické cévy a supraobturatorová oblast. 5% běží do presakrální oblasti, která může být při běžné standardní operaci minuta. Sentinelové uzliny v laterálních parametriích jsme odhalili do 5%. Detekce sentinelové uzliny u nádorů děložního hrdla je velmi slibným momentem. K zavedení do praxe jsou ale nutné rozsáhlejší multicentrické studie se standardizovaným protokolem. V současnosti je detekce sentinelových uzlin v našich protokolech jedním ze základních prvků operační léčby a aktuálně nám umožňuje identifikaci vysoce rizikových uzlin a tudíž preciznější definitivní histopatologické zpracování. Je nezbytnou součástí konzervativních, fertilitu zachovávajících operací a výkonů spojených s redukcí radikality operační léčby.

6. Summary

Vulvar cancer is not frequent disease regarding individualized treatment approach. Complete inguofemoral lymphadenectomy is still standard treatment modality with relatively high short and long term morbidity. Anatomical correlation between vulva and regional lymphatic system represented by inguofemoral region is basic for actual strategy for less radical operations including sentinel lymph node identification and detection. Application technique, timing and identification technique were presented in Czech and foreign publication as well [46] (see attachment no.: 9). Sydney consensus made by expert board in 2008 is based on 10 publications including our one. Consensus recommends in squamous cancer patients up to 4 cm stage I and II only sentinel lymph node identification procedure like an alternative to standard inguofemoral lymphadenectomy. This procedure is recommended only for oncogynecologic centers with sentinel nodes identification experiences.

Most important original information arises from study about in vivo lymphatic drainage and sentinel lymph nodes localization and topography. If we separate superficial groin in thirds, there were no sentinel nodes in outer third. On the other hand, 15% sentinel nodes were localized in deep femoral region. It explains that extirpation only superficial groin lymph nodes leads to 10% higher amount of recurrent disease compared to complex inguofemoral dissection.

Vulvar cancers are after breast cancer and melanoma the third localization were is possible to accept under the clear and defined conditions the sentinel node concept like a standard treatment modality. This procedure significantly reduced short and long term morbidity and is meaningful part of routine clinical practice.

Cervical cancer is frequent disease. Standard treatment modality radical hysterectomy with parametrial and vaginal upper third resection and pelvic and para aortic lymphadenectomy respectively is connected with post treatment morbidity. This is very important fact especially were in lot of cases this radical surgery is over treatment. Sentinel lymph node detection and its per operative histological examination is important moment, which could play role in surgical treatment radicality reduction and next post

treatment morbidity reduction. For a wide using of this method are actually lacking data sufficient in numbers. There are a lot of sentinel nodes protocols, different application timing and different detection substances in published literature. Our sentinel nodes detection protocol proved satisfactory and very effective to the other ones. For cervical cancer less than 2 cm in diameter we achieved 99% detection rate and 95% SSSR respectively.

Actual sentinel nodes detection benefit is in high risk lymph node for metastasis development identification and its ultramicrostaging evaluation. This is not technically and economically possible for the whole acquired material. Per operative histological examination is still controversy and represents around 10% risk for false negative results. Nevertheless missed nodal metastasis in our population were only micro metastasis, less than 2 mm and no case of metastasis in other „non sentinel“ nodes were documented. This information leads us just today to partially resection and lymphadenectomy radicality reduction. On the pilot protocol bases and consecutive results we established several experimental protocols approved by ethical committee. LAP I protocol for conservative, fertility sparing surgery (see attachment no.: 4) was accepted by American Society of Gynecologic Oncologists and was the base for multicenter prospective international study. For this study took a part teams from U.S.A, Canada, France and our team. LAP II protocol is presented in this academic dissertation. Sentinel lymph node is probably the marker for parametrial involvement risk in early cervical cancer stages. Other prospective and multicenter studies are needed.

Completely new information about in vivo lymphatic drainage and sentinel lymph nodes localization and topography in cervical cancer brought this study. Maximum (85%) of drainage is going to lateral parts (external iliac vessels and supraobturator space). 5% is going to pre sacral region, which could be missed during the standard procedure. Sentinel nodes in medial part of lateral parametrial tissue we found only in 5%.

Cervical cancer sentinel node detection is promising procedure. Prospective multicenter studies with standardized protocol are needed for standard practice involvement. Currently sentinel node detection allows us highly precise histopathological examination of high risk nodes and is prerequisite and fundamental element of conservative fertility sparing surgery and radicality reduction procedures.

7. Literatūra

1. Stehman FB, Bundy BN, Dvoretzky PM, Creasman WT.: Early stage I carcinoma of the vulva treated with ipsilateral superficial inguinal lymphadenectomy and modified radical hemivulvectomy: a prospective study of the Gynecologic Oncology Group. *Obstet Gynecol.* 1992 Apr;79(4):490-7.
2. Levenback C, Burke TW, Morris M, Malpica A, Lucas KR, Gershenson DM.: Potential applications of intraoperative lymphatic mapping in vulvar cancer. *Gynecol Oncol.* 1995 Nov;59(2):216-20
3. DiSaia PJ, Creasman WT, Rich WM.: An alternate approach to early cancer of the vulva. *Am J Obstet Gynecol.* 1979 Apr 1;133(7):825-32.
4. Gordinier ME, Malpica A, Burke TW, Bodurka DC, Wolf JK, Jhingran A, Ramirez PT, Levenback C.: Groin recurrence in patients with vulvar cancer with negative nodes on superficial inguinal lymphadenectomy, *Gynecol Oncol.* 2003 Sep;90(3):625-8.
5. De Hullu JA, Hollema H, Lolkema S, Boezen M, Boonstra H, Burger MP, Aalders JG, Mourits MJ, Van Der Zee AG.: Vulvar carcinoma. The price of less radical surgery. *Cancer.* 2002 Dec 1;95(11):2331-8.
6. Levenback C, Coleman RL, Burke TW, Bodurka-Bevers D, Wolf JK, Gershenson DM.: Intraoperative lymphatic mapping and sentinel node identification with blue dye in patients with vulvar cancer. *Gynecol Oncol.* 2001 Nov;83(2):276-81.
7. Ramirez PT, Levenback C.: Sentinel nodes in gynecologic malignancies., *Curr Opin Oncol.* 2001 Sep;13(5):403-7.
8. de Hullu JA, Doting E, Piers DA, Hollema H, Aalders JG, Koops HS, Boonstra H, van der Zee AG.: Sentinel lymph node identification with technetium-99m-labeled nanocolloid in squamous cell cancer of the vulva. *J Nucl Med.* 1998 Aug;39(8):1381-5.
9. Moore RG, DePasquale SE, Steinhoff MM, Gajewski W, Steller M, Noto R, Falkenberry S.: Sentinel node identification and the ability to detect metastatic tumor to inguinal lymph nodes in squamous cell cancer of the vulva. *Gynecol Oncol.* 2003 Jun;89(3):475-9.
10. Ansink AC, Sie-Go DM, van der Velden J, Sijmons EA, de Barros Lopes A, Monaghan JM, Kenter GG, Murdoch JB, ten Kate FJ, Heintz AP.: Identification of sentinel lymph nodes in vulvar carcinoma patients with the aid of a patent blue V injection: a multicenter study. *Cancer.* 1999 Aug 15;86(4):652-6.

11. Puig-Tintoré LM, Ordi J, Vidal-Sicart S, Lejárcegui JA, Torné A, Pahisa J, Iglesias X.: Further data on the usefulness of sentinel lymph node identification and ultrastaging in vulvar squamous cell carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2003 Jan;88(1):29-34.
12. Raspagliesi F, Ditto A, Fontanelli R, Maccauro M, Carcangiu ML, Parazzini F, Bombardieri E.: False-negative sentinel node in patients with vulvar cancer: a case study. *Int J Gynecol Cancer.* 2003 May-Jun;13(3):361-3.
13. Frumovitz M, Ramirez PT, Tortolero-Luna G, Malpica A, Eifel P, Burke TW, Levenback C.: Characteristics of recurrence in patients who underwent lymphatic mapping for vulvar cancer. *Gynecol Oncol.* 2004 Jan;92(1):205-10.
14. Fons G, ter Rahe B, Sloof G, de Hullu J, van der Velden J.: Failure in the detection of the sentinel lymph node with a combined technique of radioactive tracer and blue dye in a patient with cancer of the vulva and a single positive lymph node. *Gynecol Oncol.* 2004 Mar;92(3):981-4.
15. de Hullu JA, Oonk MH, Ansink AC, Hollema H, Jager PL, van der Zee AG.: Pitfalls in the sentinel lymph node procedure in vulvar cancer. *Gynecol Oncol.* 2004 Jul;94(1):10-5.
16. Tamussino KF, Bader AA, Lax SF, Aigner RM, Winter R.: Groin recurrence after micrometastasis in a sentinel lymph node in a patient with vulvar cancer. *Gynecol Oncol.* 2002 Jul;86(1):99-101.
17. Benedetti-Panici, P., Maneschi, F., D'Andrea, G., et al. Early cervical carcinoma: the natural history of lymph node involvement redefined on the basis of thorough parametrectomy and giant section study. *Cancer*, 2000, 88, p. 2267-2274.
18. Benedetti-Panici, P., Angioli, R., Palaia, I., et al. Tailoring the parametrectomy in stages IA2-IB1 cervical carcinoma: is it feasible and safe? *Gynecol. Oncol.*, 2005, 96, p. 792-798.
19. Bleker, OP., Ketting BW., van Wayjen-Eecen, B. et al. The significance of microscopic involvement of the parametrium and/or pelvic lymph nodes in cervical cancer stages Ib and IIa. *Gynecol. Oncol.*, 1983, 16, p. 56-62.
20. Burghardt, E., Pickel, H. Local spread and lymph node involvement in cervical cancer. *Obstet. Gynecol.*, 1978, 52, p. 138-145.
21. Burghardt, E., Pickel, H., Haas, J. et al.. Prognostic factors and operative treatment of stages Ib-IIb cervical cancer. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1987, 156, p. 988-996.

22. Covens, A., Shaw, P., De Petrillo, J. et al. Is radical trachelectomy a safe alternative to radical hysterectomy for patient with stage IA-B carcinoma of the cervix? *Cancer*, 1999, 86, p. 2273-2279.
23. Covens, A., Rosen, B., Murény, J. et al. How important is removal of the parametrium at surgery for carcinoma of the cervix? *Gynecol. Oncol.*, 2002, 84, p.145-149.
24. Delgado, G., Bundy, GN., Fowler, WC. et al. A prospective surgical pathological study of stage I squamous carcinoma of the cervix: a Gynecology Oncology Group study. *Gynecol. Oncol.*, 1989, 35, 3, p. 314-320.
25. Girardi, G., Lichtenegger, W., Tamussino, K. et al. The importance of parametrial lymph nodes in the treatment of cervical cancer. *Gynecol. Oncol.* 1989, 34, 2, p. 206-211.
26. Chou, ChY., Hsu, KF., Wang, ShT. et al. Accuracy of three-dimensional ultrasonography in volume estimation of cervical carcinoma. *Gynecol. Oncol.*, 1997, 66, p. 89-93.
27. Inoue, T.. Prognostic significance of the depth of invasion relating to nodal metastase, parametrial extension, and cell types. A study of 628 cases with stage Ib, Iia and Iib cervical carcinoma. *Cancer*, 1984, 54, 2, p. 3035-3042.
28. Kinney, WK., Hodge, DO., Egorshin, EV. et al. Identification of low risk subset of patients with stages Ib invasive squamous cancer of the cervix possibly suited to less radical surgical treatment. *Gynecol. Oncol.* 1995, 57, 1, p. 3-6.
29. Landoni, F., Bocciolone, L., Pereno, P. et al. Cancer of cervix, FIGO stages I and Iia: patterns of local growth and paracervical extension. *Int. J. Gynecol. Oncol.*, 1995, 5, 5, p. 329-334.
30. Landoni, F., Maneo, A., Cormio, G. et al.. Class II versus class III radical hysterectomy in stage Ib-Iia cervical cancer: a prospective randomised study. *Gynecol. Oncol.*, 2001, 80, p. 3-12
31. Levenback, C., Coleman, RL., Burke, TW. et al. Lymphatic mapping and sentinel node identification in patients with cervix cancer undergoing radical hysterectomy and pelvic lymphadenectomy. *J. Clin. Oncol.*, 2002, 20, p. 688-693.
32. Malur, S., Krause, N., Kohler, C. et al. Sentinel lymph node detection in patients with cervical cancer. *Gynecol. Oncol.*, 2001, 80, p. 254-257.
33. Marnitz, S., Kohler, Ch., Bongardt, S. et al. Topographic distribution of sentinel lymph nodes in patients with cervical cancer. *Gynecol. Oncol.*, 2006, 103, p. 35-44.

34. Margina, JF., Goodrich, MA., Weaver, AL.. Modified radical hysterectomy: morbidity and mortality. *Gynecol. Oncol.* 1995, 59, 2, p.277-282.
35. Novotvary. 2003, ÚZIS, NOR, Praha, 2006
36. O'Boyle, JD., Coleman, RL., Bernstein, SG. et al.. Intraoperative lymphatic mapping in cervix cancer undergoing radical hysterectomy: a pilot study. *Gynecol. Oncol.*, 2000, 79, p. 238-243.
37. Piver, S., Rutledge, F., Smith, JP et al. Five classes of extended hysterectomy. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1974, 44, p. 265-272.
38. Plante, M., Renaud, MC., Tetu, B. et al.. Laparoscopic sentinel node mapping in early-stage cervical cancer. *Gynecol. Oncol.*, 2003, 91, p. 494-503.
39. Rob, L., Charvát, M., Robová, H. et. al. Sentinel lymph node identification (SLNI) in the management of conservative surgery in early cervical cancer: Is it acceptable ? *Gynecol. Oncol.*, 2005, 99, p.147-148.
40. Rob, L., Charvát, M., Robová, H. et al. Less radical fertility – sparing surgery than radical trachelectomy in early cervical cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer.* 2007, 17, p. 304-310.
41. Rob L., Charvát M., Robová H. et al. Fertilitu zachovávající operace u časného stadia karcinomu děložního hrdla dnes a zítra. *Čes. Gynek.* 2006, 71, p. 303-307.
42. Rob, L.. Komentář - Radikální trachelektomie jako metoda zachovávající fertilitu u časných stadií zhoubných nádorů děložního hrdla. *Gynek. po promoci*, 2001, p. 28-35.
43. Rob, L., Pluta, M., Strnad, P. et al. Sentinel node identification in uterine cervix cancer stage I. A pilot study. *Gynecol. Oncol.* 2002, 84, p. 521.
44. Rob, L., Strnad, P., Robová, H., et al. Study of lymphatic mapping and sentinel node identification in early stage cervical cancer. *Gynecol. Oncol.*, 2005, 98, p. 281-288.
45. Rob, L., Svoboda, B., Robová, H. et al.: Guideline gynekologických zhoubných nádorů – standard – Primární komplexní léčba operabilních stadií zhoubných nádorů děložního hrdla, *Čes. Gynekol.* 2004, 69, p. 376 – 384
46. Rob L, Robova H, Pluta M, Strnad P, Kacirek J, Skapa P, Taborska K.: Further data on sentinel lymph node mapping in vulvar cancer by blue dye and radiocolloid Tc99. *Int J Gynecol Cancer.* 2007 Jan-Feb;17(1):147-53.
47. Steed, H., Capstick, V., Schepansky, L. et al. Early cervical cancer and parametrial involvement: Is it significant? *Gynecol. Oncol.* 2006, 103, p. 53-57

48. Van Dam, PA., Hauspy, J., Vanderheyden, T., et al. Intraoperative sentinel node identification with Technetium-99m-labeled nanocolloid in patients with cancer of the uterine cervix: A feasibility study. *Int. J. Gynecol. Cancer.*, 2003, 13, p. 182-186.
49. Wagenaar, HC., Trimbos, JB., Postema, S. et al. Tumor diameter and volume assessed by magnetic resonance imaging in the prediction of the outcome for invasive cervical cancer. *Gynecol. Oncol.* 2003, 82, p. 474-482.
50. Winter, R., Haas, J., Reich, O. et al. Parametrial spread of cervical cancer in patients with negative pelvic lymph nodes. *Gynecol. Oncol.* 2004,14, 5, p. 832-840.
51. Strnad P, Robova H., Skapa P., Pluta M., Hrehorcak M., Halaska M., Rob L.: A prospective study of sentinel lymph node status and parametrial involvement in patients with small tumour volume cervical cancer. *Gynecol. Oncol.*, 2008, 109(2), p.280-4
52. de Hullu JA, Oonk MH, van der Zee AG. Modern management of vulvar cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2004 Feb;16(1):65-72.
53. Horn LC, Hentschel B, Fischer U, Peter D, Bilek K.: Detection of micrometastases in pelvic lymph nodes in patients with carcinoma of the cervix uteri using step sectioning: Frequency, topographic distribution and prognostic impact. *Gynecol Oncol.* 2008 Nov;111(2):276-81. Epub 2008 Aug 21.
54. Levenback CF, van der Zee AG, Rob L, Plante M, Covens A, Schneider A, Coleman R, Solima E, Hertel H, Barranger E, Obermair A, Roy M.: Sentinel lymph node biopsy in patients with gynecologic cancers Expert panel statement from the International Sentinel Node Society Meeting, February 21, 2008. *Gynecol Oncol.* 2009 May 18.

8. Seznam prací publikovaných k tématu dizertační práce

1. **Pluta M**, Rob L, Charvat M, Chmel R, Halaska M Jr., Skapa R, Robova H.: Less radical surgery than radical hysterectomy in early stage cervical cancer – A pilot study. *Gynecol Oncol* 2009, 113, p.181-84 (**IF – 2.614**)
2. Rob, L., Charvat, M., Robova, H., Strnad, P., **Pluta, M.**, Hrehorcak, M., Schlegerova D. Sentinel lymph node identification (SLNI) in the management of conservative surgery in early cervical cancer: Is it acceptable? *Gynecol Oncol* 2005, 99, p.147-48 (**IF – 2.614**)
3. Rob L, Strnad P, Robova H., Charvat, **Pluta M**, Schlegerova D, Hrehorcak M: Study of lymphatic mapping and sentinel node identification in early stage cervical cancer. *Gyneco Oncol* 2005, 98, p. 281-88 (**IF – 2.614**)
4. Rob L, Charvat M, Robova H, **Pluta M.**, Strnad P, Hrehorcak M., Skapa P : Less radical fertility – sparing surgery than radical trachelectomy in early cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2007, 17, p. 304-10 (**IF – 1.427**)
5. Strnad P, Robova H, Skapa P, **Pluta M**, Hrehorcak M, Halaska M, Rob: A prospective study of sentinel lymph node status and parametrial involvement in patients with small tumour volume cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2008, 109(2), p. 280-84 (**IF – 2.614**)
6. Rob L, **Pluta M**, Strnad P, Hrehorcak M, Chmel R, Skapa P, Robova H.: A less radical tretment option to the fertility-sparing radical trachelectomy in patients with stage I cervical cancer. *Gynecol Oncol*, 2008, 111(2): S116-120 (**IF – 2.614**)
7. Rob L, Charvat M, Robova H , Strnad P, **Pluta M**, Schlegerova D: Identifikace sentinelových lymfatických uzlin u časných stadií cervikálních karcinomů. *Čes Gynekol.* 2004, 69, p. 273-77.
8. Rob L, Charvát M, Robova H, Strnad P, **Pluta M**, Schlegerova D: Fertilitu zachovávající operace u časného stadia karcinomu děložního hrdla dnes a zítra. *Čes. Gynekol* 2006, 71, p. 303-07
9. Rob L, Robova H, **Pluta M**, Strnad P, Kacirek J, Chmel R, Teslik L, Skapa P, Taborska K: Sentinel lymph nodes identification in vulvar cancer--methods and technique, *Čes Gynekol* 2006 , 71(4):298-301. Czech