

Univerzita Karlova
Lékařská fakulta v Plzni



Autoreferát disertační práce

**Prognostické faktory ovlivňující efekt chemoterapie
u cervikálních a ovariálních karcinomů**

**Prognostic factors influencing the effect of chemotherapy
in cervical and ovarian cancer**

MUDr. Martin Hruša

Plzeň 2022

Disertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného doktorského studijního programu Gynekologie a porodnictví na Gynekologicko-porodnické klinice LF UK a FN Plzeň.

Uchazeč:

MUDr. Martin Hruša, Gynekologicko-porodnická klinika 3. LF UK a FNKV v Praze

Předseda oborové rady:

prof. MUDr. Jiří Bouda, Ph. D., Gynekologicko-porodnická klinika LF UK a FN Plzeň

Školitel a konzultant:

prof. MUDr. Lukáš Rob, CSc., Gynekologicko-porodnická klinika 3. LF UK a FNKV v Praze

Oponenti:

prof. MUDr. Miloš Mlynček, CSc., Gynekologicko-porodnická klinika FN Nitra
prof. MUDr. Jiří Špaček, Ph. D., Gynekologicko-porodnická klinika FN Hradec Králové

Obhajoba disertační práce před komisí pro obhajobu disertačních prací studijního programu
Gynekologie a porodnictví

se koná dne: v: hod.

Místo obhajoby: Gynekologicko-porodnická klinika LF UK a FN Plzeň

Tato disertační práce vznikla za podpory interní grantové agentury MZČR (č. grantu NT 14056-3) a výzkumného programu Univerzity Karlovy PROGRES Q28.

S disertační prací je možno se seznámit na děkanátě Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni, Husova 3, Plzeň.

ABSTRAKT

První část práce: Prognostické faktory ovlivňující efekt chemoterapie u ovariálních karcinomů

ÚVOD: Membránové transportéry (jako ABC, SLC a ATPázy) se podílejí na karcinogenezi a rozvoji chemorezistence, ale jejich význam pro prognózu epiteliálního karcinomu vaječníků (EOC) je stále málo známý.

METODY: Hodnotili jsme profil genové exprese 39 ABC a 12 SLC transportérů a 3 ATPáz ve tkáních EOC a zabývali jsme se jejich významem pro prognózu a klinický průběh pacientek s EOC. Byla odhadnuta relativní exprese genů v souboru primárních EOC (n=57) a v kontrolních ovariálních tkáních (n=14) a porovnána s klinickými údaji a přežitím pacientek. Získané údaje byly validovány na nezávislém souboru pacientek (n=60).

VÝSLEDKY: Šest ABC genů a gen SLC22A18 byly v karcinomech ve srovnání s kontrolami významně nadměrně exprimovány, zatímco exprese 12 genů ABC, 5 genů SLC, ATP7A a ATP11B byla snížena. Expres genů ABCA12, ABCC3, ABCC6, ABCD3, ABCG1 a SLC22A5 byla vyšší u high-grade serózního karcinomu ve srovnání s ostatními podtypy. Expres genu ABCA2 významně souvisela s grade EOC u obou souborů pacientek. Pozoruhodné je, že úroveň genové exprese ABCA9, ABCA10, ABCC9 a SLC16A14 významně souvisela s PFS v pilotních i validačních souborech. Hladina ABCG2 souvisela s PFS v souhrnném souboru pacientek.

ZÁVĚR: Geny ABCA2, ABCA9, ABCA10, ABCC9, ABCG2 a SLC16A14 představují nové předpokládané markery progresu EOC a spolu s odhaleným vztahem mezi expresí ABCA12, ABCC3, ABCC6, ABCD3, ABCG1 a SLC22A5 a high-grade serózním EOC by měly být dále zkoumány prostřednictvím rozsáhlejších sledovacích studií.

Druhá část práce: Karcinom hrdla děložního u mladých žen – redukce radikality u časných stádií

ÚVOD: Standardním postupem u karcinomu děložního hrdla je radikální hysterektomie (RH) a pánevní lymfadenektomie (LAP). Vzhledem ke zvyšujícímu se věku žen při porodu se fertilita stává velkým problémem. Pacientkám splňujícím předem stanovené kritéria (stádium IA1, LVSI pozitivní, stádium IA2 a IB1 (< 2 cm a infiltrační do < 1/2 stromatu) byla nabídnuta dvoukroková méně radikální operace se zachováním fertility.

METODY: Předoperační postup sestával z histopatologické diagnostiky a MRI spolu s UZ volumetrií. Následně bylo provedeno laparoskopické mapování sentinelové uzliny s peroperační „freeze“ biopsií, po kterém následovala pánevní lymfadenektomie a v případě negativního výsledku „selektivní parametrektomie“. Po ověření definitivním histopatologickým rozbohem byla pacientkám provedena simplexní trachelektomie (IB1) nebo konizace s velkým konusem (IA1/IA2) týden po primární operaci.

VÝSLEDKY: V období 1999–2018 bylo do studie zařazeno 91 žen (medián věku 29,1, rozmezí 21–40 let). Z těchto 91 žen bylo 51 (56 0 %) nullipary. Míra detekce SLN byla 100 % na pacientku a míra detekce specifické strany 96,7 %. V devíti případech (9,8 %) byly diagnostikovány pozitivní lymfatické uzliny. Tyto ženy poté podstoupily RH. Fertilita byla zachována 80 pacientkám, ale u 4 došlo k lokální recidivě (5,0 %). Mortalita byla 0,0 %. Medián sledování byl 149 měsíců.

ZÁVĚR: Méně radikální fertilitu zachovávající operace se SLNM je u karcinomů děložního hrdla o velikosti < 2 cm v největším rozměru s infiltrační méně než do 1/2 stromatu hrdla děložního bezpečná. Míra recidivy je přijatelná, bez mortality. Morbidita při tomto postupu je nízká. Pacientky po této léčbě však vyžadují extenzivní a přesný follow-up, v rámci kterého se zdají být přínosné testy na onkogenní vysoce-rizikové viry HPV a možnost vakcinace.

ABSTRACT

First part of the thesis: Prognostic factors influencing the effect of chemotherapy in ovarian cancer

INTRODUCTION: Membrane transporter proteins (for example ABC, SLC and ATPases) take part in oncogenesis and the formation of chemoresistance, however the interpretation of their importance in ovarian cancer prognosis is still limited.

METHODS: Gene expression profiling was performed on 39 ABC and 12 SLC transporters and 3 ATPases in epithelial ovarian cancer (EOC) tissues and the results were assessed with respect to prognosis and clinical presentation of EOC patients. In a cohort of tissues with primary EOC (n = 57) and control tissues (n = 14) we assessed relative expression of genes and compared it with the clinical and survival information. The data was verified on a separate cohort (n = 60).

RESULTS: 6 ABC genes and the SLC22A18 gene were considerably over-expressed in the cancer tissues in comparison with control tissues and the expression of 12 ABC genes, 5 SLC genes, ATP7A, ATP11B was reduced. The expression of ABCA12, ABCC3, ABCC6, ABCD3, ABCG1, SLC22A5 genes was greater in HGSC in comparison with other types. Expression of ABCA2 was considerably related to tumour grade in both cohorts. Particularly, the expression levels of ABCA9, ABCA10, ABCC9 and SLC16A14 were considerably related to PFS in both pilot and verification groups. ABCG2 level was related to PFS in the grouped patient cohort.

CONCLUSION: The genes ABCA2, ABCA9, ABCA10, ABCC9, ABCG2 and SLC16A14 represent new potential markers of epithelial ovarian cancer progression and collectively with the discovered association between the expression of ABCA12, ABCC3, ABCC6, ABCD3, ABCG1, SLC22A5 and HGSC they should be investigated more extensively in future studies.

Second part of the thesis: Cervical cancer in young women – reduction of radicality in early stages

INTRODUCTION: The common procedure for cervical cancer is radical hysterectomy (RH) and pelvic lymphadenectomy (LAP). Due to the growing age of women at delivery, fertility is becoming a key concern. Patients fulfilling the predefined criteria (stage IA1, LVSI positive, stage IA2 and stage IB1 (< 2cm and infiltration <1/2 of the stroma) were offered two-step less radical fertility-sparing surgery.

METHODS: The preoperative workup consisted of histopathological diagnosis and MRI with US volumetry. Subsequently, laparoscopic sentinel node mapping with intraoperative freeze biopsy was performed, followed by pelvic lymphadenectomy and, in case of negative results, "selective parametrectomy". If confirmed by definitive histology, women underwent simplex trachelectomy (IB1) or conisation (IA1/IA2) one week following primary operation.

RESULTS: Between 1999 and 2018, 91 patients were included in the study (median age 29.1, range 21-40 years). 51 (56.0 %) of these women were nulliparas. The detection rate of SLN was 100% per patient and the specific side detection rate was 96.7%. Nine cases (9.8%) were diagnosed with positive LN and RH was performed. Fertility was preserved in 80 patients, but 4 patients had local recurrence (5.0%). Mortality was 0.0%, median follow-up 149 months.

CONCLUSION: Less radical fertility-sparing surgery with SLNM is safe for cervical cancers <2 cm in greatest diameter with infiltration <1/2 cervical stroma. The rate of recurrence is acceptable and there was no mortality observed. This procedure has a low morbidity. Patients after this treatment however require extensive and accurate follow-up, in which testing for oncogenic high-risk HPV viruses and the possibility of vaccination appear to be beneficial.

Obsah

1	Úvod	6
2	Cíl práce	7
3	Prognostické faktory ovlivňující efekt chemoterapie u ovariálních karcinomů	8
3.1	Pacientky a metody	8
3.2	Výsledky.....	11
3.3	Diskuse	14
4	Karcinom hrdla děložního u mladých žen – redukce radikality u časných stádií	17
4.1	Pacientky a metody	17
4.2	Výsledky.....	18
4.3	Diskuse	22
5	Souhrn	24
6	Summary	25
7	Použitá literatura	26
8	Publikační činnost	29
9	Přednášková činnost	31

1 Úvod

V první části práce se zabýváme problematikou karcinomů vaječníků, které jsou aktuálním problémem pro vysokou mortalitu. V současné době jsou čtvrtou nejčastější malignitou ženských pohlavních orgánů s klesající incidencí. Základní terapeutickou modalitou je chirurgická léčba, která je však ve většině případů doplňována chemoterapií v adjuvantní nebo neoadjuvantní formě. V současnosti jsou stále diskutovány prognostické faktory, které ovlivňují výsledky léčby a mají význam zejména na efektivitu chemoterapie. Mezi prognostické faktory patří klinické faktory (typ nádoru, stádium onemocnění, rozsah reziduálního nádoru) a kromě těchto stále hledáme další markery. Rozšiřování znalostí vlivu genetických, epigenetických a transkripčních faktorů, které ovlivňují progresi a případnou odpověď na léčbu chemoterapií, je výzvou pro další výzkum. Ve vlastní práci jsme se ve spolupráci se Státním zdravotním ústavem pokusili prostudovat mechanismus působení těchto markerů a osvětlit jejich význam. Je známo, že membránové transportéry (ABC, SLC a ATPázy typu P) mají efekt na karcinogenezi a rozvoj chemorezistence, ale jejich souvislost s prognózou ovariálních karcinomů není úplně prostudována. V pilotní studii již bylo zjištěno, že transportéry ABCA3/9/10/12, ABCC3, ABCG1/2, SLC16A14, SLC22A5 a ATP7A/B jeví souvislost s prognózou karcinomů ovaria, zatím co ABCD3 a ABCG2 souvisí s progresí onemocnění u postižených pacientek. Všechny tyto geny představují nové předpokládané markery prognózy a vývoje ovariálních karcinomů vhodné k dalšímu zkoumání. Snahou v projektu a vlastní práci bylo ve spolupráci se Státním zdravotním ústavem prostudovat mechanismus působení některých potenciálních markerů a validovat jejich využitelnost v léčebném procesu.

Původním záměrem druhé části práce bylo rovněž prozkoumání prognostických faktorů u karcinomu děložního hrdla, který je třetí nejčastější malignitou ženských pohlavních orgánů. Bohužel neočekávané předčasné ukončení grantové podpory nám však tento finančně nákladný výzkum znemožnilo dále realizovat, a to již v počátečním stádiu sběru dat. Vzhledem k tomu, že díky zavedení celoplošného screeningového programu a očkování proti lidskému papilomaviru (HPV) u HPV naivních dívek očekáváme postupný pokles incidence zhoubných nádorů děložního hrdla a hlavně jejich záchyt ve stádiu přednádorového onemocnění nebo v časném stádiu, se míra nutnosti terapie pokročilých karcinomů děložního hrdla bude snižovat a s tím i potřeba využití chemoterapie. Ovšem v posledních desetiletích nastává trend odkladu těhotenství a dochází k významnému nárůstu věku rodiček, který se blíží věkové kategorii žen s nejvyšší incidencí karcinomu děložního hrdla. A tak se budeme čím dál tím víc setkávat s přáním zachování fertility u žen s již přítomným zhoubným onemocněním. Z tohoto důvodu jsem se po konzultaci se svým školitelem, který je předním světovým odborníkem na fertilitu zachovávající management karcinomu hrdla děložního, rozhodl navázat na jeho dlouholetou studii zabývající se péčí o tyto pacientky a v rámci přehledu dvaceti let zkušeností s tímto terapeutickým protokolem posoudit jeho bezpečnost a vliv na morbiditu a mortalitu léčených pacientek.

2 Cíl práce

- 1) Cílem první části práce, v které jsme se zabývali problematikou karcinomů vaječníků, bylo vyhodnotit možnou existenci rozdílů v expresi genů mezi nádorovými tkáněmi a tkáněmi bez nádoru, a také zda existuje nějaká asociace mezi genovou expresí a klinicko-patologickými údaji pacientek a možný souvis s prognózou.
- 2) Cílem druhé části práce zabývající se problematikou řešení časných stádií karcinomu hrdla děložního s ohledem na zachování fertility při minimální radikalitě výkonu bylo posoudit bezpečnost této terapie a její vliv na celkovou morbiditu a mortalitu pacientek.

3 Prognostické faktory ovlivňující efekt chemoterapie u ovariálních karcinomů

3.1 Pacientky a metody

Tato práce se skládá z pilotní a validační studie. V pilotní studii byly vzorky tkání získány od 60 pacientek s diagnózou EOC ve Fakultní nemocnici v Motole a Fakultní nemocnici v Plzni v letech 2009–2013. Pro validační studii bylo použito 57 vzorků tkání pacientek s EOC diagnostikovaných ve FN Motol v letech 2011–2013. V pilotní i validační studii bylo jako kontrola použito 14 vzorků ovariální tkáně bez morfologických známek karcinomu. Kontrolní vzorky byly získány od pacientek, které byly ve FN Motol operovány z jiného důvodu než pro zhoubný nádor vaječníků.

Vzorky tkáně odebrané během operace byly histopatologicky vyšetřeny podle standardních diagnostických postupů. Pro imunobarvení Ki67 byly tkáňové řezy o tloušťce 4 μm deparafinovány a rehydratovány v klesajících koncentracích etanolu až vody. Tepelné získávání epitopů bylo provedeno v 0,01 M citrátovém pufru (pH 6,0) při 98 °C po dobu 30 min. Endogenní peroxidázová aktivita byla blokována standardními technikami při 20 °C a tkáňové řezy byly inkubovány přes noc při 4 °C s primární monoklonální myší protilátkou proti lidskému Ki67 (ředěnou 1:150; klon MIB-1; DakoCytomation, Glostrup, Dánsko). Imunokomplexy antigenu a primární protilátky byly vizualizovány pomocí detekčního systému N-Histofine Simple Stain MAX PO (MuLTI) (Nichirei Biosciences, Tokio, Japonsko) s 3,3'-diaminobenzidin tetrahydrochloridem (Fluka Chemie, Buchs, Švýcarsko) jako chromogenem. Všechny řezy byly nabarveny hematoxylinem, dehydratovány a namontovány. Za pozitivní bylo považováno pouze jaderné barvení jakékoliv intenzity. V každém tkáňovém řezu byly při malém zvětšení identifikovány „hot-spots“ Ki67 a úroveň exprese Ki67 byla kvantifikována v 10 různých zorných polích s velkým zvětšením jako procento pozitivních buněk.

Vzorky tkáně byly čerstvě zmrazeny a skladovány při -80 °C až do izolace RNA, DNA a proteinu. Ze zdravotnické dokumentace byly získány následující údaje o pacientkách: věk v době diagnózy, stádium FIGO, grade a typ nádoru EOC, exprese proteinového markeru Ki67 v procentech (k dispozici pouze u pacientek z FN Motol) a progresse onemocnění hodnocená jako doba do progresse (z angl. time to progression – TTP) v měsících, jak je uvedeno v tabulce 1. Pacientky byly po operaci léčeny adjuvantními režimy na bázi paklitaxelu a platinových léčiv. Sledování pacientek probíhalo pomocí pravidelných fyzikálních vyšetření a sledování hladin CA-125.

Tabulka 1 – Klinicko-patologická charakteristika pacientek s EOC ve studii

Charakteristika	Pilotní soubor	Validační soubor
	N (%) ^a	N (%) ^a
Medián věku při diagnóze (roky)	62,5 ± 11,2	57,0 ± 9,8
Stádium dle FIGO		
I	4 (7,3)	3 (5,4)
II	6 (10,9)	2 (3,6)
III	41 (74,5)	47 (83,9)
IV	4 (7,3)	4 (7,1)
N/A	5	1
Histologický typ EOC		
Jiný	10 (18,2)	3 (5,3)
HGSC	45 (81,8)	54 (94,7)
N/A	5	0
Histologický grade		
G1	5 (8,5)	1 (1,8)
G2	11 (18,6)	9 (15,8)
G3	43 (72,9)	47 (82,5)
N/A	1	0
Vzdálené metastázy		
Přítomné	4 (8,0)	4 (7,1)
Nepřítomné	46 (92,0)	52 (92,9)
N/A	10	1
Čas do progresse (PFS)		
Medián ± SD (%)	12,5 ± 8,7	13,0 ± 10,7
Počet hodnocených pacientek ^b	24	29
Exprese proteinu Ki67		
Medián ± SD (%)	30,0 ± 25,4	25,0 ± 19,4
Počet hodnocených pacientek ^c	21	57
^a V závorce je uveden počet pacientek v procentech; ^b hodnocené byly pouze pacientky bez vzdálených metastáz, u nichž došlo k progresi onemocnění; ^c údaje jsou k dispozici pouze pro vzorky z Fakultní nemocnice v Motole; N/A – data nedostupná, EOC – epitelální karcinom vaječníků; SD – směrodatná odchylka		

Všechny pacientky byly informovány o cílech této práce a poskytly písemný souhlas s účastí ve studii. Plán studie byl schválen etickou komisí všech zúčastněných pracovišť.

Izolace celkové RNA a příprava cDNA. Nádorové a kontrolní vzorky byly rozemlety v hmoždíři s tlučkem na prášek pod kapalným dusíkem. Celková RNA, DNA a proteiny byly izolovány pomocí soupravy AllPrep DNA/RNA/Protein Mini kit (Qiagen, hildesheim, Německo) podle protokolu výrobce. Celková RNA byla kvantifikována pomocí soupravy Quant-iT RiboGreen RNA assay kit (Invitrogen, Eugene, OR, USA). cDNA byla syntetizována pomocí soupravy Revert Aid First Strand cDNA Synthesis kit (MBI Fermentas, Vilnius, Litva) s 0,5 µg celkové RNA podle předchozího popisu (Hubackova et al. 2012). Kvalita cDNA byla potvrzena PCR amplifikací ubikvitinového fragmentu C (Soucek et al. 2005).

V pilotní studii byla pro všechny experimenty použita preamplifikovaná cDNA. Dva a půl mililitru cDNA bylo preamplifikováno pomocí 5,0 µl směsi PerfeCTa PreAmp SuperMix (Quanta BioSciences, Gaithersburg, MD, USA), 6,25 µl sdružené testovací směsi obsahující všechny cílové testy TaqMan Gene Expression Assays (Life Technologies, Foster City, CA, USA) a vody bez nukleázy v celkovém objemu 25,0 µl. Celkem bylo použito 14 preamplifikačních cyklů podle protokolu výrobce. Preamplifikovaná cDNA byla uložena při -20 °C až do provedení real-time PCR. Pro validační fázi studie byla použita cDNA bez preamplifikace, aby se otestovala robustnost předpokládaných markerů.

Kvantitativní real-time PCR. Kvantitativní real-time PCR (qPCR) bylo provedeno pomocí systému viiA7 Real-Time PCR (Life Technologies). V pilotní studii obsahovala reakční směs 2,5 µl TaqMan Gene Expression Master Mix, 0,25 µl specifické chemikálie TaqMan Gene Expression Assay, 2,0 µl cDNA 32krát zředěné v TE pufru a vodu bez nukleázy do celkového objemu 5,0 µl. Parametry cyklování byly následující: počáteční udržování teploty 50 °C po dobu 2 min a denaturace při 95 °C po dobu 10 min, následované 45 cykly sestávajícími z denaturace při 95 °C po dobu 15 s a nasedání primerů/extenze při 60 °C po dobu 60 s (výjimky jsou uvedené v seznamu testů TaqMan Gene Expression Assays, tabulka 5). Hodnoty fluorescence byly získány po každé fázi extenze. Vzorky byly analyzovány duplicitně a vzorky se standardní odchylkou duplicit $> 0,5$ Ct byly analyzovány znovu. Jako kalibrátor byla použita ekvimolární směs 10 kontrolních vzorků. Kalibrátor byl 20krát zředěn ve vodě bez nukleázy. Relativní standardní křivka byla vytvořena z 5 log ředění kalibrátoru. Reakční účinnost všech testů byla > 90 %. Použita byla kontrola obsahující místo cDNA vodu bez nukleázy. Ve validační studii obsahovala reakční směs 1,0 µl 5X Hot FIREPol Probe qPCR Mix Plus (Solis BioDyne, Tartu, Estonsko), 0,25 µl specifického testu TaqMan Gene Expression Assay, 2,0 µl cDNA 8krát zředěné ve vodě bez nukleázy a vodu bez nukleázy do celkového objemu 5,0 µl. Podmínky qPCR byly použity tak, jak byly optimalizovány v pilotní studii.

Selekce referenčních genů. V pilotním souboru vzorků jsme hodnotili stabilitu 6 potenciálních referenčních genů (GAPDh, GuSB, PPIA, TBP, uBC a YWhAZ). K analýze výsledků byl použit software NormFinder a geNorm (Mohelnikova-Duchonova et al. 2012). Návrh studie real-time PCR se řídil pokyny Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (Bustin et al. 2009).

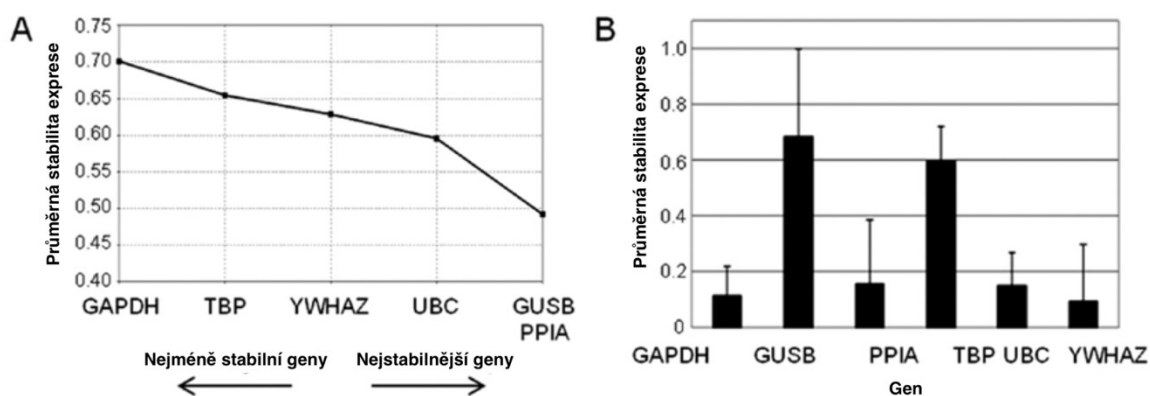
Analýza dat. Relativní hladiny transkriptů ve vzorcích nádorových a kontrolních tkání byly porovnány pomocí softvéru REST 2009 (Hlaváč et al. 2013). Statistické analýzy asociací mezi genovou expresí a klinicko-patologickými údaji pacientek byly provedeny pomocí softvéru SPSS v16.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). Pro každý vzorek byl vypočten poměr Ct pro konkrétní cílový gen k aritmetickému průměru všech referenčních genů, jak je popsáno v práci Ehrlichové et al. (Ehrlichova et al. 2013). Pro hodnocení vztahu mezi expresí genů a stadiem podle FIGO (stádium I/II vs. III/IV), stupněm nádoru (grade 1/2 vs. 3), Ki67 (cut-off 15 %) a typem EOC (high grade serózní EOC vs. ostatní typy) byl použit neparametrický Kruskalův-Wallisův test. Pro vyhodnocení korelace mezi hladinou mRNA a procentem Ki67 pozitivních buněk byl použit Spearmanův rank test. Doba do progresu byla definována jako doba, která uplynula mezi operační léčbou a progresí onemocnění či úmrtím z jakékoliv

důvodu. Přežití bez progresu (z angl. progression free survival - PFS) bylo hodnoceno pouze u pacientek bez vzdálených metastáz. Funkce přežití byly vykresleny Kaplanovou-Meierovou metodou a statistická významnost byla hodnocena log-rank testem. Pro vícerozměrnou analýzu byl použit Coxův model proporcionálních rizik. P-hodnoty jsou odchylky od dvoustranných testů. Hodnota $P < 0,05$ byla považována za statisticky významný výsledek. Otázka vícenásobného testování byla řešena validací výsledků ve dvoufázové studii.

3.2 Výsledky

Charakteristika pacientek. V pilotní a validační studii byly použity soubory 60 a 57 pacientek s karcinomem vaječníků. Procento pokročilého stadia nebo high-grade EOC, stejně jako medián věku v době diagnózy, byly v pilotním a validačním souboru pacientek podobné. Medián věku v době diagnózy (\pm směrodatná odchylka) byl v pilotním a validačním souboru pacientek $62,5 \pm 11,2$ a $57,0 \pm 9,8$ let a významně se nelišil od věku kontrol použitých pro srovnání ($53,5 \pm 13,3$ let). Naopak vzorky tkání se významně lišily v úrovni exprese markeru Ki67 $30,0 \pm 25,4$ % a $25,0 \pm 19,4$ % v pilotním a validačním souboru tkání EOC, zatímco úroveň exprese v kontrolních tkáních byla ≤ 1 %. K progresi onemocnění došlo u 24 pacientek v pilotním souboru a u 29 pacientek ve validačním souboru. Medián sledování (\pm směrodatná odchylka) byl $12,5 \pm 8,7$ měsíce v pilotním souboru pacientek a $13,0 \pm 10,7$ měsíce ve validačním souboru. Byl hodnocen vztah mezi TTP těchto pacientek a genovou expresí ve vzorcích EOC (PFS). Jako kontroly byly použity vzorky tkáně 14 pacientek bez morfologických známek primárního ovariálního karcinomu v jejich vaječnicích (ovariální leiomyom, $n=6$; děložní leiomyom, $n=2$; benigní ovariální cysta, $n=1$; karcinom děložního hrdla, $n=2$; karcinom endometria, $n=2$; sarkom, $n=1$). Klinicko-patologické charakteristiky pacientek s EOC jsou popsány v tabulce 1.

Selekce referenčních genů. V pilotním souboru pacientek jsme testovali stabilitu 6 genů. PPIA, uBC a YWhAZ byly konzistentně vyhodnoceny mezi nejstabilnějšími čtyřmi geny jak programem geNorm (obrázek 1, graf A), tak programem NormFinder (obrázek 1, graf B). Proto byly tyto geny vybrány jako referenční geny pro studii na ovariálních tkáních.



Obrázek 1 – Stabilita testovaných referenčních genů hodnocená pomocí programů geNorm (A) a NormFinder (B). Jako referenční geny byly v této studii dále použity geny PPIA, uBC a YWhAZ

Transkripční úroveň transportních genů v pilotním souboru. Transkripty analyzovaných 39 ABC, 12 SLC a 3 ATPázových genů byly analyzovány pomocí qPCR ve všech nádorových a kontrolních vzorcích v pilotní studii. Šest genů ABC (ABCB5, ABCC7,

ABCC8, ABCC11, ABCC12 a ABCG5) a 3 geny SLC (SLC22A2, SLC22A11 a SLC47A2) byly exprimovány pod hranicí detekce, a proto nebyly dále hodnoceny. V nádorech EOC byly zjištěny významně vyšší úrovně transkripce ABCA7, ABCA12, ABCA13, ABCB2, ABCB3, ABCC3 a SLC22A18 ve srovnání s kontrolní ovariální tkání. Naopak úrovně ABCA8, ABCA9, ABCA10, ABCB1, ABCB4, ABCC9, ABCD3, ABCD4, ABCE1, ABCF1, ABCF3, ABCG2, SLC16A4, SLC22A1, SLC22A3, SLC22A5, SLC47A1, ATP7A a ATP11B byly v tumorech ve srovnání s kontrolami významně sníženy. Ostatní geny nebyly ve tkáních EOC významně deregulovány.

Tabulka 2 – Souvislosti mezi hladinami transkriptů zkoumaných genů v tkáních EOC a klinicko-patologickými údaji pacientek, které byly zjištěny v pilotní studii A a ve validační studii B

A. Pilotní soubor									
Gen	Stádium FIGO		Grade		Typ EOC		Expresce proteinu Ki67 ^d		
	I/II	III/IV	1/2	3	Jiné typy	HGSC	Cut-off 15 %		%
ABCA2	NS		1,46±0,05 ^a	1,49±0,07 ^a	NS		NS		NS
			0,038 ^b						
ABCA3	1,54±0,07 ^a	1,47±0,07 ^a	NS		NS		NS		NS
	0,018 ^b								
ABCA8	NS		NS		NS		NS		r=0,57 0,007 ^c
ABCA9	NS		NS		NS		NS		r=0,44 0,044 ^c
ABCA10	NS		NS		NS		1,67 ± 0,16 ^a	1,85 ± 0,19 ^a	NS
							0,049 ^b		
ABCA12	1,80±0,21 ^a	2,00±0,15 ^a	NS		1,81±0,21 ^a	1,96±0,16 ^a	NS		NS
	0,045 ^b				0,008 ^b				
ABCB1	NS		NS		NS		1,60±0,14 ^a	1,74±0,10 ^a	r=0,59 0,005 ^c
							0,049 ^b		
ABCC3	NS		NS		1,41±0,14 ^a	1,54±0,10 ^a	1,35±0,10 ^a	1,54±0,16 ^a	r=0,56 0,009 ^c
					0,015 ^b		0,025 ^b		
ABCC6	NS		NS		1,63±0,13 ^a	1,74±0,11 ^a	NS		NS
					0,015 ^b				
ABCD2	NS		NS		NS		1,58±0,18 ^a	1,75±0,12 ^a	r=0,55 0,010 ^c
							0,028 ^b		
ABCD3	NS		NS		1,33±0,04 ^a	1,38±0,05 ^a	NS		NS
					0,007 ^b				
ABCG1	NS		NS		1,37±0,06 ^a	1,43±0,08 ^a	1,35±0,05 ^a	1,45±0,07 ^a	r=0,44 0,047 ^c
					0,038 ^b		0,039 ^b		
ABCG2	NS		NS		NS		1,46±0,09 ^a	1,60±0,09 ^a	NS
							0,049 ^b		
ATP7A	1,50±0,06 ^a	1,46±0,06 ^a	NS		NS		NS		NS
	0,047 ^b								
ATP7B	1,42±0,06 ^a	1,36±0,08 ^a	NS		NS		NS		NS
	0,034 ^b								
SLC16A14	NS		NS		NS		1,46±0,09 ^a	1,59±0,09 ^a	NS
							0,044 ^b		
SLC22A5	NS		NS		1,47±0,06 ^a	1,53±0,07 ^a	NS		NS
					0,004 ^b				
B. Validační soubor									
ABCA2			1,27±0,05 ^a	1,31±0,04 ^a					r=0,319 0,017 ^c
			0,012 ^b						
ABCA10			NS						r=0,296 0,025 ^c

Byly analyzovány souvislosti hladin transkriptů se všemi klinicko-patologickými údaji, ale pro zestručnění jsou uvedeny pouze signifikantní výsledky. ^aHodnoty jsou průměr ± směrodatná odchylka. Pro analýzy asociací klinicko-patologických charakteristik s hladinami transkriptů v nádorech byl pro každý vzorek vypočítán poměr Ct pro konkrétní cílový gen k aritmetickému průměru Ct pro všechny referenční geny (cílový gen/REF). Čím nižší je tedy poměr cílový gen/REF, tím vyšší je hladina transkriptu příslušného cílového genu. ^bP-hodnoty podle Kruskal-Wallisova testu; ^cP-hodnoty podle Spearmanovy korelace; r, Spearmanův korelační koeficient; ^d údaje o hladině exprese a progresi proteinu Ki67 jsou k dispozici pouze pro vzorky z Fakultní nemocnice v Motole. Replikované výsledky v obou souborech jsou zřetelně tučně. EOC – epitelální karcinom vaječníků; NS – nesignifikantní.

Souvislosti mezi transkripčními úrovněmi a klinicko-patologickými údaji v pilotním souboru. Transkripční úrovně cílových genů ve tkáních EOC byly hodnoceny z hlediska jejich souvislosti s klinicko-patologickými charakteristikami (stádium podle FIGO, grade, typ EOC a exprese proteinového markeru Ki67) (tabulka 2, sekce A) a PFS patientek hodnocených jako TTP (obrázek 2, sekce A).

Hladiny ABCA3, ATP7A a ATP7B byly významně vyšší u pokročilých karcinomů stadia FIGO III/IV ve srovnání se stadii I nebo II. Opačná tendence byla pozorována u exprese genu ABCA12, tj. nižší hladiny u patientek s extrapelvickými metastázami (FIGO III nebo IV). Nižší hladina transkriptu ABCA2 byla zjištěna u nádorů grade 3 ve srovnání s diferencovanějšími nádory grade 1 nebo 2. ABCA12, ABCC3, ABCC6, ABCD3, ABCG1 a SLC22A5 byly nadměrně exprimovány u high-grade serózních karcinomů (HGSC) ve srovnání s ostatními podtypy EOC. Byla také pozorována významná negativní korelace exprese proteinu Ki67 s ABCA8, ABCA9, ABCB1, ABCC3, ABCD2 a ABCG1. Při použití 15 % cut-off úrovně byla potvrzena korelace exprese Ki67 s ABCB1, ABCC3, ABCD2 a ABCG1. Kromě toho byly odhaleny významné asociace s ABCA10, ABCG2 a SLC16A14. Expresí genu ABCC9 navíc v pilotním souboru (n=24) významně souvisela s PFS patientek s EOC. Patientky s vyšší než mediánovou intratumorální hladinou ABCC9 měli významně kratší TTP než zbytek patientek [HR=2,64; 95 % CI, 1,05–6,67]. Tato souvislost byla významná i v Coxově regresní multiparametrické analýze upravené podle stadia, grade a přítomnosti vzdálených metastáz (P=0,040).

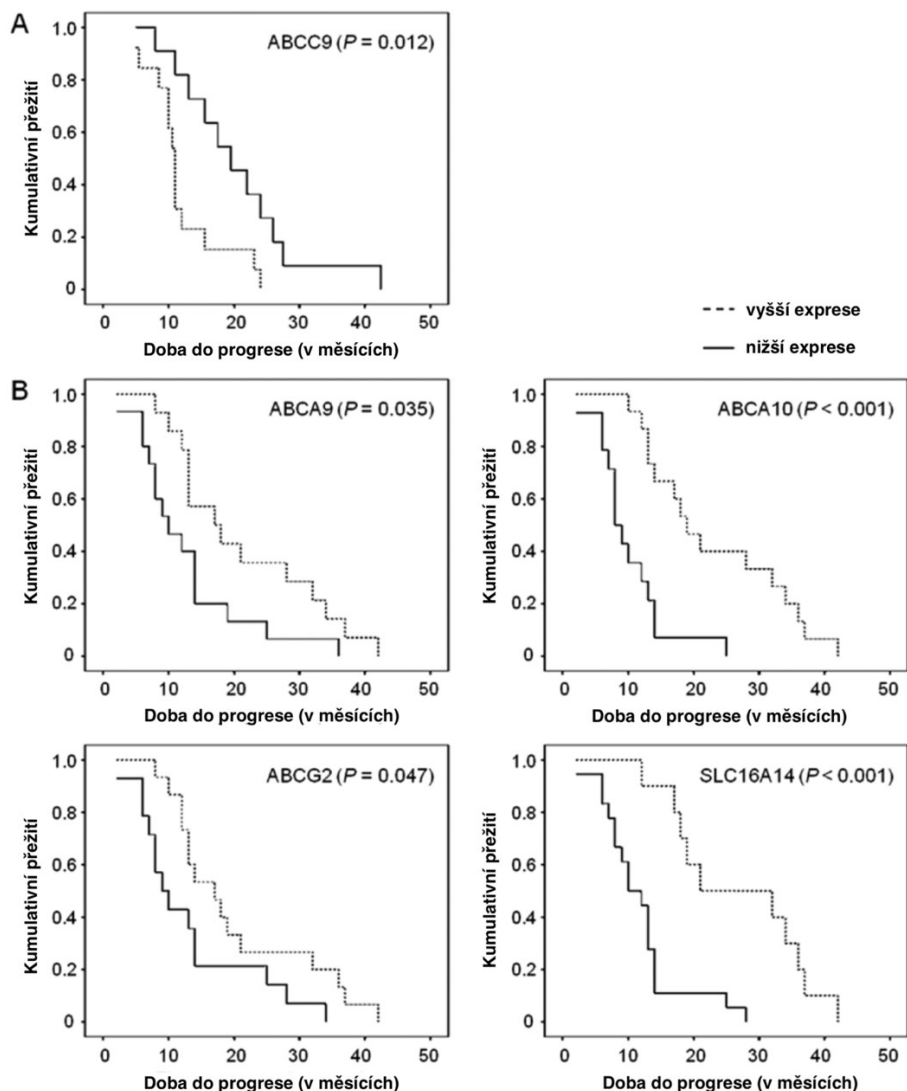
Transkripční úrovně transportních genů ve validačním souboru. Výsledky pilotní studie byly ověřeny ve validačním souboru patientek. Pro následnou validaci byly vybrány všechny geny, které v pilotním souboru patientek (tabulka 2, sekce A) souvisely s některou z klinicko-patologických charakteristik.

Většina deregulací v nádorech ve srovnání s kontrolami pozorovaných v pilotním souboru byla potvrzena ve validační studii. Konkrétně byly v nádorech ve srovnání s kontrolními tkáněmi sníženy hodnoty ABCA8, ABCA9, ABCA10, ABCB1, ABCC9, ABCG2, ATP7A, SLC16A14 a SLC22A5. Geny ABCA12 a ABCC3 byly v nádorech exprimovány nadměrně.

Souvislosti mezi transkripčními úrovněmi a klinicko-patologickými údaji ve validačním souboru. Ve validačním souboru byly hodnoceny asociace mezi hladinami genové exprese kandidátních genů a stadiem FIGO, grade nádorů a expresí Ki67 (tabulka 2, sekce B). Nízký počet patientek s jiným typem nádoru než HGSC ve validačním souboru však znemožnil potvrzení těchto spojitostí.

Byla potvrzena souvislost exprese ABCA2 v EOC se stupněm pokročilosti. Na rozdíl od pilotní studie odhalila analýza validačního souboru významnou korelaci hladin ABCA2 a ABCA10 s expresí markeru Ki67.

Souvislost ABCC9 s PFS patientek s EOC pozorovaná v pilotním souboru nebyla analýzou validačního souboru (n=29) potvrzena. Analýzy validačního souboru však odhalily významné souvislosti nadměrné exprese ABCA9 (HR = 0,46; 95 % CI, 0,20–1,04), ABCA10 (HR = 0,17; 95 % CI, 0,06–0,49), ABCG2 (HR = 0,41; 95 % CI, 0,18–0,95) a SLC16A14 (HR = 0,24; 95 % CI, 0,09–0,61) s delším časem do progresu patientek s EOC (obrázek 2, sekce B). Multiparametrická analýza upravená podle stadia, stupně a přítomnosti vzdálených metastáz byla významná pro ABCA10 (P = 0,001), ABCG2 (P = 0,038) a SLC16A14 (P = 0,003), ale ne pro ABCA9 (P = 0,060).



Obrázek 2 – Souvislosti mezi úrovní exprese a dobou do progresu u pacientek s EOC v pilotním (A) a validačním (B) souboru stanovené pomocí Kaplan-Meierova testu

Analýza sružených souborů ($n=53$) ukázala významný výsledek pro ABCG2 ($P = 0,004$; HR = 0,46; 95 % CI, 0,25–0,85), ale ne pro ABCA9 ($P = 0,335$), ABCA10 ($P = 0,080$), ABCC9 ($P = 0,562$) nebo SLC16A14 ($P = 0,125$). Multiparametrická analýza upravená podle stadia, grade a přítomnosti vzdálených metastáz zůstala významná pro ABCG2 ($P=0,013$).

3.3 Diskuse

Přestože různé dříve publikované studie pozorovaly významné souvislosti jednotlivých membránových transportérů s prognózou karcinomu ovaria a predikcí výsledků léčby, komplexní studie klinicko-patologického vlivu membránových transportérů u karcinomu ovaria chybí. Cílem této práce bylo částečně zaplnit tuto mezeru a případně poskytnout nové poznatky a předpokládané markery s prognostickým významem nebo cíle pro návrh nové terapie u EOC.

V této práci bylo zjištěno několik změn v úrovni genové exprese ABC a SLC transportérů a ATPáz mezi nádory a kontrolami. Snížení regulace ABCA8, ABCA9 a ABCA10 v nádorech ve srovnání s nenádorovými tkáněmi je v souladu s předchozím pozorováním u kolorektálních karcinomů (Hlavata et al. 2012). Kromě toho byl v nádorech ve srovnání s kontrolami downregulován gen ABCB1, což potvrzuje předchozí pozorování u tkáni EOC (Ehrlichova et al. 2013), prsu (Hlaváč et al. 2013) a kolorektálních karcinomů (Hlavata et al. 2012). Geny ABCB2, ABCB3 a ABCC3 byly v nádorech ve srovnání s kontrolními tkáněmi upregulovány, což bylo dříve prokázáno u recidivujících karcinomů vaječníků [ale ne u primárních lézí; (Auner et al. 2010)] a u karcinomu pankreatu (Mohelnikova-Duchonova et al. 2013). Pozorovali jsme také upregulaci ABCC1, která však nebyla signifikantní ($P > 0,05$). Nemohli jsme tedy potvrdit upregulaci genu ABCC1 dříve pozorovanou u karcinomů vaječníků Aunerem et al (Auner et al. 2010) a Ehrlichovou et al (Ehrlichova et al. 2013).

Je známo, že SLC transportéry a ATPázy slouží jako uptake a efluxní pumpy léčiv na bázi platiny a přispívají také k rezistenci buněk karcinomu vaječníků vůči cisplatině a karboplatině (Januchowski et al. 2014; Katano et al. 2003; Samimi et al. 2004; Burger et al. 2010). Pozorovaná downregulace (v pilotním i validačním souboru) SLC16A14 je v souladu s dříve popsanou downregulací u multirezistentní buněčné linie karcinomu vaječníků W1 (Januchowski et al. 2013). Validovaná downregulace SLC16A14, SLC22A5 a ATP7A u EOC ve srovnání s kontrolami pozorovaná v této studii tedy naznačuje její potenciál pro predikci výsledku terapie.

Pozorované snížení hladiny transkriptu ABCA2 u nádorů grade 3 ve srovnání s karcinomy grade 1 nebo 2, které bylo potvrzeno ve validační studii, budí další zájem. Ve validačním souboru byl navíc zjištěn negativní vztah mezi expresí ABCA2 a expresí proteinu Ki67. Proteinový marker Ki67 je exprimován v buňkách s vysokou proliferací a je spojován s pokročilým stadiem a vysokým grade ovariálních nádorů (Kamal et al. 2012). Nízká exprese ABCA2 tedy může být novým markerem agresivního chování nádoru a její vztah ke Ki67 by měl být dále prozkoumán.

Kromě ABCA2 korelovalo v pilotní studii s expresí Ki67 dalších osm genů ABC transportérů (ABCA8/9/10, ABCB1, ABCC3, ABCD2 a ABCG1/2), SLC16A14 a SLC22A5. Žádná z těchto asociací nebyla potvrzena ve validačním souboru, byla však zjištěna negativní korelace ABCA10 s hladinou Ki67, což naznačuje univerzálnější úlohu této rodiny ABC transportérů. Transportéry ABCA jsou aktivní v buněčném transmembránovém transportu lipidů (Kaminski et al. 2000; Jessup et al. 2006), což naznačuje zapojení změn v transportu lipidů (způsobených sníženou expresí konkrétních genů ABCA, např. genů ABCA2 a ABCA10 pozorovaných v pilotní studii) do zvýšené proliferace buněk karcinomu vaječníků. V literatuře nejsou k dispozici žádné další údaje o asociaci ABC a SLC transportních genů s markerem Ki67 týkající se karcinomu vaječníků. Nicméně vyšší podíl Ki67 pozitivních buněk ve vzorcích karcinomu vaječníků pocházejících z primárních operací byl zjištěn u pacientek s kratší dobou bez progresu (Surowiak et al. 2006). Výsledky této studie proto naznačují, že stanovení vztahu mezi expresí mRNA nebo proteinu membránových transportérů a Ki67 může být důležité pro diagnostiku pokročilých stadií a prognózu karcinomu vaječníků.

Nádory vaječníků se dělí na několik histologických typů, z nichž nejčastější je HGSC. Jednotlivé typy se liší svým genetickým profilem (Beaufort et al. 2014). Změny v expresi genů membránových transportérů však nejsou prozkoumány. V této práci jsme identifikovali významné vztahy mezi pěti ABC (ABCA12, ABCC3, ABCC6, ABCD3 a ABCG1) a SLC22A5 geny a HGSC, které by měly být dále sledovány. Gen ABCC3 propůjčuje rezistenci k lékům a podílí se na transportu glutationu v buňkách karcinomu vaječníků (Kool et al. 1999). Nedávno bylo zjištěno, že ABCC3 slouží jako marker mnohočetné lékové rezistence a jako prediktor nepříznivého klinického výsledku u nemalobuněčného karcinomu plic (Zhao

et al. 2013), což podporuje naše údaje o nadměrné expresi ABCC3 v tkáních HGSC. Ve studii Xu et al. byla zjištěna upregulace proteinu ABCC7 u serózního a světlobuněčného typu karcinomu vaječníků ve srovnání s ostatními histologickými typy. Byl také spojen s mírou proliferace buněk ovariálního karcinomu v experimentech in vitro, což naznačuje potenciální využití tohoto genu jako markeru agresivity EOC (Xu et al. 2015). V naší studii byla zjištěna velmi nízká hladina transkriptu ABCC7, což znemožňuje další zkoumání tohoto genu. Nicméně podle výsledků Xu et al (Xu et al. 2015) by měl být mechanismus funkce genu ABCC7 u EOC sledován funkčními experimenty in vitro.

Hladina genové exprese ABCC9 byla spojena s přežitím bez progresu (hodnoceno jako TTP) u pacientek s EOC, které byly zahrnuté do pilotního souboru, ale nikoli do validačního souboru. Předchozí studie zjistila souvislost mezi amplifikací ABCC9 a rezistencí k lékům u buněčné linie SKOv3/vP karcinomu vaječníků in vitro (Yasui et al. 2004), ale role ABCC9 v prognóze karcinomu vaječníků nebyla známa. Naopak ABCA9, ABCA10, ABCG2 a SLC16A14 významně souvisely s PFS ve validačním souboru, ale ne v pilotním souboru pacientek. Pravděpodobným zdrojem těchto rozporů by mohla být variabilita histologických podtypů analyzovaných souborů pacientek. Proto jsme také provedli souhrnnou analýzu PFS v obou souborech dohromady. V kombinované analýze obou souborů byla významná pouze asociace exprese ABCG2 s PFS, a ABCG2 se tak jeví jako nejsilnější předpokládaný kandidát na prognostický marker u pacientek s EOC vyplývající z této studie.

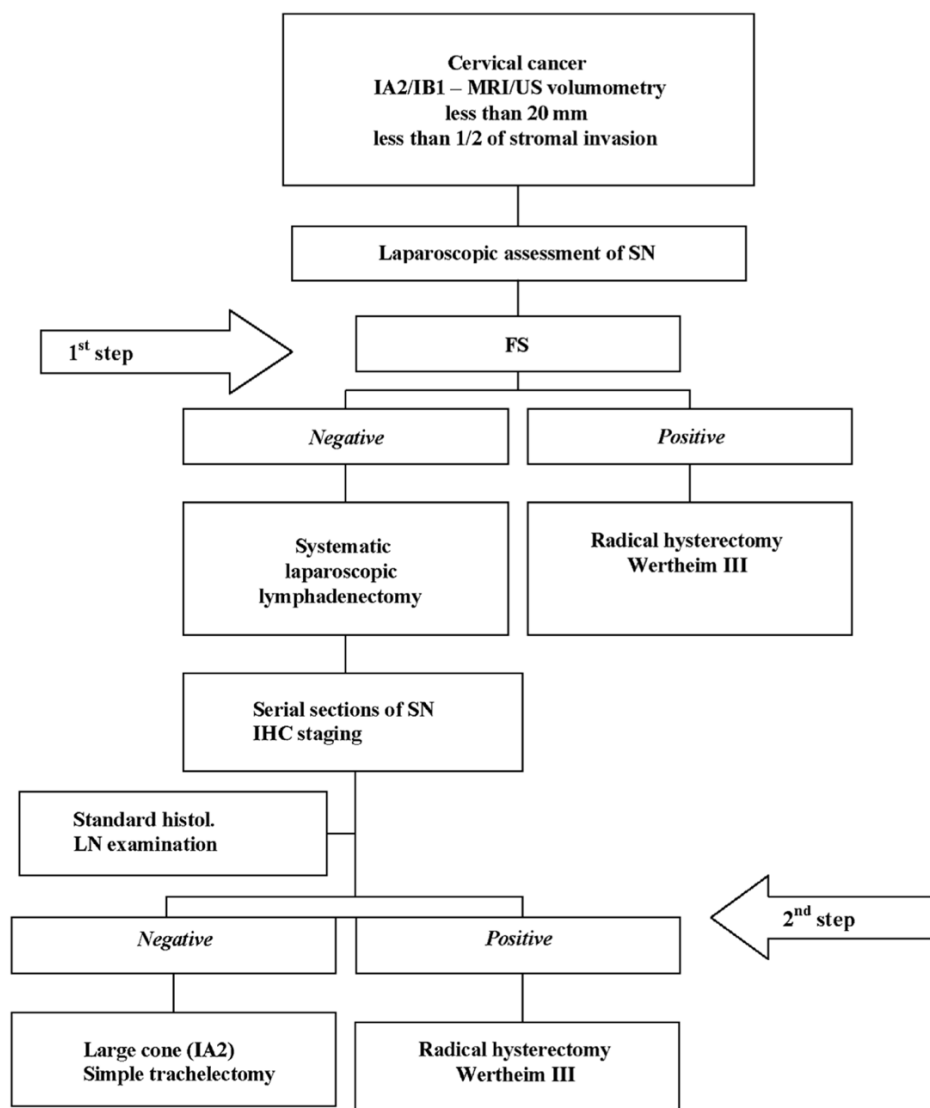
Z nedávno zkoumaných genů ABC transportérů se zjistilo, že pouze členové podrodiny ABCA mají souvislost s přežitím pacientů. Nadměrná exprese ABCA1/5/8 a ABCA9 v primárních nádorech byla významně spojena se zkráceným celkovým přežitím pacientek s HGSC vaječníků (Hedditch et al. 2014). Nadměrná exprese ABCG2 byla nedávno spojena s chemorezistencí buněk karcinomu vaječníků (Januchowski et al. 2014; He et al. 2014) a stejně tak nadměrná exprese SLC16A14 (Januchowski et al. 2014). Úloha těchto genů v odpovědi na chemoterapii a výsledku onemocnění by tedy měla být dále sledována v kontextu s dalšími molekulárními znaky, např. grade nebo Ki67.

Závěrem lze konstatovat, že tato studie odhalila významné rozdíly v profilu genové exprese ABC, SLC a ATPázových transportérů u primárních ovariálních karcinomů ve srovnání s kontrolami a také pozoruhodné asociace mezi genovou expresí a klinicko-patologickými údaji pacientek. Především exprese genu ABCA2 souvisela s grade EOC a expresí proteinového markeru Ki67. Kromě toho byly zjištěny rozdíly v profilu exprese membránových transportérů mezi HGSC a ostatními histologickými podtypy EOC, což naznačuje roli jednotlivých transportních genů v klinickém výsledku. ABCA9, ABCA10, ABCC9, ABCG2 a SLC16A14 významně souvisely s PFS v jednom souboru sledovaných pacientů a ABCG2 v obou souhrnných souborech. Tyto geny jsou tedy novými předpokládanými markery prognózy karcinomu ovaria a cílem pro ověření jejich klinické užitečnosti větší nezávislou follow-up studií.

4 Karcinom hrdla děložního u mladých žen – redukce radikality u časných stádií

4.1 Pacientky a metody

Tato práce uvádí přehled 20 let zkušeností s dvoufázovou méně radikální fertilitu zachovávající operací u žen s karcinomy IA1 (LVSI pozitivní), IA2 a IB1 (< 2 cm v největším průměru s infiltrací, která nepřesahuje více než poloviny stromatu děložního hrdla). Navazuje na pilotní studii 27 případů publikovanou v roce 2007 (Rob et al. 2007). Studie byla schválena etickou komisí našich institucí. Fertilitu šetřící operace byla nabídnuta všem ženám s časným stadiem karcinomu děložního hrdla (IA1 s pozitivním LVSI, IA2 a IB1 < 2 cm v největším průměru s infiltrací méně než poloviny cervikálního stromatu), které doufají, že po léčbě rakoviny porodí. S ohledem na časové rozpětí jsme použili klasifikační systém FIGO pro karcinom děložního hrdla z roku 2009 (Pecorelli et al. 2009) a ne aktualizovanou variantu. Vylučovacími kritérii byly neuroendokrinní nádory (ale ne adenokarcinomy s neuroendokrinní komponentou) a věk nad 40 let. Všechny ženy podepsaly před operací informovaný souhlas a byly poučeny o přesné povaze výkonu. Histopatologická diagnóza byla provedena excizí, punkční biopsií nebo konizací. Všechny pacientky podstoupily klinické vyšetření, expertní kolposkopii, expertní vaginální ultrazvukovou volumetrii a magnetickou rezonanci (MRI). U všech žen bylo provedeno mapování sentinelových lymfatických uzlin (SLNM, z angl. sentinel lymph node mapping) pomocí patentové modři a radiokoloidu technecia (ultrakrátký protokol) a sentinelové lymfatické uzliny (SLN, z angl. sentinel lymph nodes) byly odeslány k peroperačnímu histopatologickému vyšetření „frozen section“ (FS) (Rob et al. 2007). Pokud byl tento rozbor negativní, následovala systematická LAP. U některých žen s IA1 LVSI pozitivním karcinomem a IA2 byla provedena pouze biopsie SLN. U všech žen byla provedena „selektivní parametrektomie“ a z paracervixu byl extirpován označený modře zbarvený aferentní lymfatický kanál. Pokud bylo definitivní histopatologické vyšetření negativní, 7 dní po laparoskopii pacientky s karcinomem IB1 podstoupily prostou trachelektomií a pacientky s karcinomem IA1 nebo IA2 konizaci jehlou s velkým konusem. V případě pozitivních zmražených řezů bylo od laparoskopie upuštěno a byla provedena radikální hysterektomie (RH) typu C2 s pánevní a dolní paraaortální lymfadenektomií (o tomto postupu byly pacientky poučeny v informovaném souhlasu). Pokud definitivní histopatologie prokázala metastázy v lymfatických uzlinách nebo byly zjištěny pozitivní okraje trachelektomie, pacientky rovněž podstoupily RH. Dříve publikovaný protokol nebyl v průběhu studie měněn (obrázek 3). Ženy byly sledovány á 3 měsíce po dobu 2 let a poté á 6 měsíců. Následné návštěvy zahrnovaly onkologickou cytologii, kolposkopické a gynekologické vyšetření. Stěr na HPV-HR byl proveden 6 měsíců a 2 roky po operaci. Protokol, podrobně popsáný v předchozí studii (Rob et al. 2007) se v průběhu let nezměnil (včetně zpracování SLN) (obrázek 3).



Obrázek 3 – Protokol fertilitu zachovávajícího managementu časných stádií karcinomu děložního hrdla (Rob et al. 2007)

4.2 Výsledky

Od ledna 1999 do prosince 2018 bylo do studie zařazeno 91 žen. Medián věku byl 29,1 roku (rozmezí 21-40 let). Devět žen (9,9 %) mělo karcinom děložního hrdla ve stádiu IA1 a všechny (100 %) měly pozitivní LVSI. Čtrnáct žen (15,4 %) mělo stádium IA2 a šest z nich mělo pozitivní LVSI (42,9 %). Stádium IB1 (< 2 cm s infiltrací do poloviny stromatu) bylo diagnostikováno u 68 (74,7 %) žen a 26 z nich (38,2 %) mělo pozitivní LVSI. Dlaždicobuněčný karcinom byl zjištěn u 66 (72,5 %) žen, adenokarcinom u 20 (22,0 %) a adenoskvamózní karcinom u 4 (4,4 %). U jedné pacientky byl konizací diagnostikován adenokarcinom společně se skvamózním karcinomem (1,1 %). Diagnóza byla stanovena na základě punkční biopsie u 18 žen (17,8 %) a konizace u 73 (82,2 %) žen. Reziduální onemocnění bylo přítomno ve všech případech po punkční biopsii. Třicet pět žen, které podstoupily konizaci, nemělo v definitivním histopatologickém vzorku žádné reziduální

onemocnění (47,9 %). Sedmnáct žen mělo po konizaci reziduální prekancerózu (23,3 %) a 21 žen reziduální invazivní karcinom ve vzorku z trachelektomie (28,8 %). Padesát jedna žen byly nullipary (56,0 %), 33 žen mělo jedno dítě (36,3 %), 5 žen mělo dvě děti (5,5 %) a 2 ženy měly tři děti (2,2 %). Všechny ženy, které měly více než jedno dítě, měly nového partnera. U všech žen bylo provedeno SLNM. Míra detekce SLN byla u každé pacientky 100 % a míra detekce specifické strany 96,7 %. U devíti žen byly odstraněny pouze SLN. U všech ostatních žen byla provedena kompletní laparoskopická LAP. U devíti žen (9,8 %) byly diagnostikovány pozitivní lymfatické uzliny. U osmi žen byly pozitivní uzliny zjištěny pomocí peroperační „freeze“ biopsie, dvě z nich měly mikrometastázy v SLN (toto zjištění náš terapeutický management nemění). U jedné ženy byla mikrometastáza zjištěna imunohistochemicky (IHC) při definitivním histopatologickém vyšetření. Jenom jedna žena měla víc než jednu pozitivní lymfatickou uzlinu (tabulka 3). U všech devíti žen byla provedena RH typu C2 a pánevní a dolní paraaortální lymfadenektomie a u dvou žen RH typu C1 pro těsné okraje nádoru. Fertilita byla zachována u 80 žen (87,9 %).

U tří pacientek se vyskytly peroperační laparoskopické komplikace. V jednom případě došlo k poranění zevní ilické žíly při laparoskopické lymfadenektomii, které bylo vyřešeno bez nutnosti konverze. Ve dvou případech došlo při laparoskopické identifikaci aferentního lymfatického kanálu k poranění děložních cév v mediální části laterálních parametrií. U jedné pacientky se krvácení nepodařilo laparoskopicky zastavit a byla provedena konverze na laparotomii. Nedošlo však ke krevní ztrátě, která by vyžadovala krevní transfuzi. Lymfedém dolních končetin byl pozorován u tří (4,3 %) žen po kompletní laparoskopické LAP. U jedné (1,3 %) pacientky byla šest měsíců po trachelektomii diagnostikována stenóza kanálu děložního hrdla a pacientka podstoupila jeho dilataci v celkové narkóze. Tři roky po operaci byla u jedné (1,3 %) pacientky diagnostikována multifokální vulvární intraepiteliální neoplázie (VIN) třetího stupně.

Tabulka 3 – Pacientky, které podstoupily radikální hysterektomii

Inic.	Věk	Rok	Dg	Histotyp	Velikost nádoru (mm)	LVSI	TNM	Operace	Adjuvantní terapie	Současný stav
JP	33	2001	K	Spinoca	5 x 4	+	pT1a2pN1	LS – 1 pozit. sentinel, konverze na RH RH – reziduum R0, LN 38/1 pozit.	EBR	CR, 19 let
LP	32	2002	K	Spinoca	9 x 4	–	pT1b1pN1	LS – 1 pozit. sentinel, konverze na RH RH – reziduum R0, LN 42/1 pozit.	EBR	CR, 18 let
JP	27	2002	B	VG adenoca	5 x 6	–	pT1b1pN1	LS – 1 pozit. sentinel, konverze na RH RH – reziduum 10x8mm, LVSI+	Odmítla EBR	Recidiva (vaječník, plíce) po 14 měsících, úmrtí po 20 měsících
ML	33	2004	K	Spinoca	12 x 8	–	pT1b1pN1	LS – 1 pozit. sentinel, konverze na RH RH – reziduum CIN II, LN 44/1 pozit.	EBR	CR, 16 let
KK	31	2004	K	Spinoca	2 x 1	+	pT1a1pN1	LS – 1 pozit. sentinel, konverze na RH RH – reziduum R0, LN 21/1 pozit.	Bez adjuvance	CR, 16 let
SZ	36	2006	B	Adenoca	3 x 5	+	pT1b1pN1	LS – 1 pozit. sentinel, konverze na RH RH – reziduum 8 x 5 mm, LVSI+, LN 37/1 pozit.	EBR	CR, 14 let

PV	35	2011	K	Spinoca	8 x 4	-	pT1b1pN1	LS – 1 pozit. sentinel, konverze na RH RH – reziduum R0, LN 47/1 pozit.	EBR	CR, 9 let
HM	32	2011	B	Spinoca	3 x 4	+	pT1a2pN1	LS – 29 neg. LN, 1 falešně negativní LN perop., postop. 1 mm meta Reoperace RH – reziduum R0, LN 19/0 (29+19/1 pozit.)	EBR	CR, 9 let
ŠS	36	2018	K	Adenoca	3 x 3	+	pT1a1pN1	LS – 1 pozit. sentinel, konverze na RH RH – reziduum 2 x 2 mm, 2x mikrometa v sentinelu + 1,5 mm pozit. LN v pravém parametriu, LN 43/3	Chemoterapie + EBR	CR, 2 roky
KM	29	2013	K	Spinoca	25 x 10	+	pT1b1pN0	LS – neg., ale pozitivní okraj v trachelektomii RH – reziduum 1 mm, LN 22/0	Bez adjuvance	CR, 7 let
VV	41	2014	B	Adenoca	30 x 12	+	pT1b1pN0	LS – neg., ale pozitivní okraj v trachelektomii RH – reziduum 0 mm, LN 33/0	Bez adjuvance	CR, 6 let

DG – diagnóza, K – konizace, B – biopsie, Spinoca – dlaždicobuněčný karcinom, Adenoca – adenokarcinom, VG adenoca – viloglandulární adenokarcinom, LS – laparoskopie, RH – radikální hysterektomie, LN – lymfatické uzliny, LVSI – lymfangioinvasze, CIN – cervikální intraepiteliální neoplázie, EBR – zevní radioterapie, CR – kompletní remise

U čtyř z 80 žen, u nichž byla zachována fertilita, došlo k recidivě karcinomu (5,0 %) (tabulka 4). Žádná z nich však na toto onemocnění nezemřela (míra úmrtnosti 0,0 %). Všechny tyto pacientky měly dlaždicobuněčný karcinom. Jedna pacientka měla ve vzorku z hrdla děložního karcinom ve stádiu IB1, LVSI negativní, vel. 8 x 5 mm a vzorek z trachelektomie obsahoval reziduum nádoru 2 x 2 mm. Dvacet sedm lymfatických uzlin bylo negativních. Recidiva byla diagnostikována v cervikálním isthmu 10 měsíců po operaci. Pacientka podstoupila chemoradioterapii a po dobu 18 let byla bez známek onemocnění. Druhá žena měla nádor ve stádiu IA1 LVSI pozitivní o velikosti 3 mm v největším průměru se stromální invazí 1,2 mm v konusu. Rekonizace byla negativní a taktéž 2 SLN. Spontánně porodila 22 měsíců po operaci v 36. týdnu těhotenství. První HPV-HR test byl pozitivní a druhý negativní. Recidiva byla diagnostikována 33 měsíců po trachelektomii. Pacientka podstoupila neoadjuvantní chemoterapii, následně RH a adjuvantní radioterapii (LVSI v parametriích). Kompletní remise v době psaní této práce přetrvávala již 8 let. Třetí pacientka měla IB1 LVSI pozitivní nádor o velikosti 12 mm v největším průměru a stromální invazi 2 mm v hrdle děložním. Trachelektomie byla negativní, stejně jako 31 lymfatických uzlin. Porodila spontánně v termínu 15 měsíců po operaci. První HPV-HR test byl negativní a druhý pozitivní. Isthmická recidiva byla diagnostikována 38 měsíců po operaci, a proto pacientka podstoupila neoadjuvantní chemoterapii, radikální hysterektomii a adjuvantní radioterapii (pro těsné okraje). Pacientka je v době psaní této práce již 11 let bez onemocnění. Čtvrtá pacientka měla IB1 LVSI pozitivní dlaždicobuněčný karcinom o velikosti 8 x 3,3 mm v hrdle děložním a reziduální nádor 5 x 2 mm v preparátu po trachelektomii. Celkem 23 lymfatických uzlin bylo negativních. Čtyři roky po operaci podstoupila konizaci pro pozitivitu onkologické cytologie (AGC-NOS) a HPV-HR pozitivitu. Vzorek byl negativní. Pět let po operaci potratila v prvním trimestru a rok poté následně porodila dítě v 36. týdnu těhotenství. Recidiva byla diagnostikována při umělém ukončení těhotenství po neúmyslné koncepci 87 měsíců od primární operace. Podstoupila RH a adjuvantní teleterapii (pro těsné okraje). Po třech letech byla tato pacientka bez známek detekovatelného onemocnění.

Tabulka 4 – Pacientky s recidivou po fertilitu zachovávající operaci

Věk	Histotyp	Biopsie	Stádium	Preparát trachelektomie	Stav LN	Doba recidivy	Místo recidivy	Léčba recidivy	Poznámka
29	Spinoca	K – karcinom 8 mm, invaze 5 mm, non in sano, LVSI-	IB1	Karcinom 2 x 2 mm	27 negat.	10 měsíc	Lokální centrální	CHRT	NED
30	Spinoca	K – karcinom 3 mm, invaze 1,2 mm, LVSI+	IA1	Negat.	2 negat.	33 měsíc	Lokální centrální	NAC, RH, ART	NED, spont. porod 22 měsíců po operaci
26	Spinoca	K – karcinom 12 mm, invaze 2 mm, LVSI+	IB1	Negat.	31 negat.	15 měsíc	Lokální centrální	NAC, RH, ART	NED, spont. porod 15 měsíců po operaci
30	Spinoca	K – karcinom 8 mm, invaze 3,3 mm, LVSI+	IB1	Karcinom 5 x 2 mm	23 negat.	87 měsíc	Lokální centrální	RH, ART	NED, spont. abort 60 měsíců po operaci, spont. porod 72 měsíců po operaci

Spinoca – dlaždicobuněčný karcinom, K – konus, LVSI – lymfangioinvaze, LN – lymfatické uzliny, CHRT – chemoradioterapie, RH – radikální hysterektomie, NAC – neoadjuvantní chemoterapie, ART – adjuvantní radioterapie, NED – bez známek onemocnění (z angl. no evidence of disease)

U jedné ženy léčené pro dlaždicobuněčný karcinom IB1 (grade 3, LVSI negativní, 18 mm v největším průměru s hloubkou invaze 8 mm, 20 negativních lymfatických uzlin) byl 38 měsíců po operaci diagnostikován isthmický duplicitní adenokarcinom grade 3. Podstoupila chemoradioterapii a po 22 měsících na toto onemocnění zemřela. Tento případ nelze považovat za recidivu, ale za nové onemocnění.

Medián sledování byl 149 měsíců. Dvacet pacientek z prvního období, u kterých byla zachována fertilita, podstupovalo během sledování cytologii, kolposkopii a gynekologické vyšetření (publikováno 2007). Pět žen z této skupiny pacientek, které neplánovaly těhotenství (porodily nebo se rozhodly nemít potomka), podstoupilo během sledování hysterektomii. Čtyři z nich měly abnormální cytologii (HSIL, ASC-US, AGC-NOS nebo LSIL) a prekancerózu v definitivní histologii (CIN2, CIN1, CIN1 a CIN1). U jedné pacientky byla provedena hysterektomie na základě vlastní žádosti a histologie byla negativní. Sledování 60 žen ve druhém období zahrnovalo HPV-HR testování. Šest měsíců po operaci podstoupily HPV-HR test a poté v pravidelném intervalu každé dva roky. U čtyřech z těchto žen byl šest měsíců po operaci test HPV-HR pozitivní, ale všechny další testy byly negativní. Tři ženy, které v současné době touží po těhotenství, mají HPV-HR pozitivní a cytologii negativní. Devět pacientek, které definitivně neplánovaly těhotenství, podstoupilo na základě pozitivního testu HPV-HR během sledování (tři také s cytologií LSIL) hysterektomii. U dvou z devíti pacientek byla diagnostikována cervikální intraepiteliální neoplazie druhého stupně (CIN2), pět mělo CIN1 a u dvou byla negativní histologie. Jedna pacientka podstoupila během sledování hysterektomii pro cytologii LSIL při negativním HPV-RH testu. Její definitivní histologie byla negativní. Deset žen s negativním HPV-HR testem podstoupilo hysterektomii na vlastní žádost; pouze u jedné byl při definitivním histopatologickém hodnocení zjištěna CIN1. Všechny ostatní byly negativní.

Tabulka 3 uvádí podrobné informace o pacientkách, které podstoupily RH pro pozitivní lymfatické uzliny nebo těsné okraje. Pouze jedna pacientka, která odmítla adjuvantní radioterapii pro pozitivní lymfatické uzliny, na toto onemocnění zemřela. Všechny ostatní žijí bez známek onemocnění.

4.3 Diskuse

Tato studie je nejrozsáhlejší prací zabývající se méně radikální fertilitu zachovávající operací u časného stádia karcinomu děložního hrdla v největším průměru < 2 cm v rámci jedné instituce. Míra recidivy v naší studii byla 5,0 %. Betivegna v systematickém přehledu uvádí míru recidivy po méně radikální operaci 1,8 % (n = 226 pacientek) (Bentivegna et al. 2016). Stejný přehled však uvádí míru recidivy 4 % po radikální vaginální trachelektomii u nádorů < 2 cm v největším průměru. Některé studie z tohoto přehledu nezařadily do méně radikálních skupin pacientky s LVSI. V naší studii nebyla LVSI vylučovacím kritériem.

Typické recidivy po radikální hysterektomii pro karcinom děložního hrdla se objevují do dvou let od operace a jsou vzdálené (paraaortální lymfatické uzliny, plíce, játra atd.) (Sedlis et al. 1999). V našem souboru pacientek jsme pozorovali pouze lokální istmické recidivy. Pouze u jedné ženy došlo k recidivě dříve (10 měsíců po operaci). Nabízí se otázka, zda všechny recidivy byly skutečně recidivami. Po konzervativní léčbě cervikální intraepiteliální léze je riziko invazivního karcinomu děložního hrdla pětikrát vyšší než v běžné populaci (Soutter et al. 2006). Vzhledem k malému počtu případů nejsou k dispozici údaje o riziku nového invazivního karcinomu děložního hrdla po fertilitu šetřící operaci. Tři ze čtyř recidiv v naší studii se objevily po 33, 38 a 87 měsících od operace a všechny tři ženy předtím porodily. U žen, u nichž došlo k recidivě 38 měsíců po operaci, byl první HPV-HR test negativní a druhý pozitivní. Recidiva po 87 měsících se zdá být spíše novým onemocněním. Tato žena podstoupila konizaci pro pozitivitu HPV-HR a konizace byla negativní.

Již dříve zmíněná studie LACC (Ramirez et al. 2018) nedávno vznesla otázku ohledně bezpečnosti minimálně invazivní chirurgie u karcinomu děložního hrdla. Studie uvádí poměr rizika recidivy onemocnění nebo úmrtí 3,74 u pacientek s karcinomem děložního hrdla, které podstoupily minimálně invazivní zákrok oproti otevřené operaci. Abdominální přístup při fertilitu zachovávající operaci je problematický, protože přibližně u 60 % žen, které podstoupily abdominální trachelektomii, se objevily komplikace, které ovlivnily jejich plodnost (stenóza děložního hrdla, neprůchodnost vejcovodů atd.) (Rob et al. 2011). Minimálně invazivní lymfadenektomie v kombinaci s vaginální trachelektomií je pro plodnost žen šetrnější. V našem souboru pacientek jsme vzdálenou recidivu nepozorovali a všechny pacientky s recidivou byly vyléčeny. Studie LACC uvádí vyšší počet lokoregionálních a také vzdálených recidiv v minimálně invazivní skupině. Při operaci jsme nikdy nepoužili děložní manipulátor a všechny naše pacientky podstoupily SLNM. SLN byly odeslány na peroperační „freeze“ biopsii a u všech pacientek byl proveden kompletní imunohistochemický mikrostaging. Negativní lymfatické uzliny byly tedy skutečně negativní a s délkou jsme v žádném rozsahu nemanipulovali. Všechny lymfatické uzliny byly navíc odstraněny okamžitě a žádné resekované lymfatické uzliny jsme před odstraněním nehromadili v dutině břišní.

Nabízí se otázka, jestli může parametrektomie při radikální vaginální trachelektomii ovlivnit míru recidivy u karcinomu děložního hrdla < 2 cm v největším průměru s postižením parametrií spojeným s metastázami v pánevních lymfatických uzlinách (Strnad et al. 2008; Covens et al. 2002). U všech našich pacientek byla provedena SLNM, odstranění aferentních lymfatických kanálů z parametrií (k definitivnímu histopatologickému vyšetření) a peroperační vyšetření sentinelových uzlin. Strnad et al. uvádějí 133 pacientek s negativními SLN bez postižení parametrií (Strnad et al. 2008). SLNM může snížit míru falešně negativních nálezů a zajistit méně radikální operaci u žen s časným stádiem karcinomu děložního hrdla. Naše výsledky jsou podobné výsledkům vaginální radikální trachelektomie u nádorů < 2 cm (Bentivegna et al. 2016). Potvrzují naši hypotézu, že radikalita u takto malých nádorů může zvýšit morbiditu a ovlivnit výsledky fertility.

Časné stádium karcinomu děložního hrdla se v některých centrech řeší konizací s velkým konusem a pánevní lymfadenektomií (Tomao et al. 2017; Maneo et al. 2011; Salihi et al. 2015). U pacientek s vysokým rizikem se používá neoadjuvantní nebo adjuvantní chemoterapie (Tomao et al. 2017; Maneo et al. 2011). Neoadjuvantní chemoterapie se používá v případě rizika těsného chirurgického okraje. Adjuvantní léčba se aplikuje v případě přítomnosti LVSI a stromální invaze menší než 3 mm. V naší skupině pacientek musely být adekvátní chirurgické okraje větší než 5 mm. Po fertilitu zachovávající operaci jsme nepoužili žádný druh adjuvantní léčby. Proto jsme konizaci prováděli pouze u pacientek s karcinomy ve stádiu IA1 s LVSI a karcinomy ve stádiu IA2.

Pacientky po trachelektomii mají alterovanou anatomickou stavbu ponechané dělohy. Zatím neexistuje žádné obecně přijaté doporučení pro následné sledování žen, které podstoupily fertilitu zachovávající operaci pro karcinom děložního hrdla. Všechna centra používají během následného sledování cytologické stěry, ale tyto nejsou vždy přesné a určeny k detekci rakoviny děložního hrdla. Některé cytologie jsou nevyhovující z důvodu absence endocervikálních buněk (Lanowska et al. 2014). Tato absence je způsobena tím, že cervikální kanál je po trachelektomii příliš úzký, a dokonce v některých případech dochází k jeho úplné stenóze. V naší skupině pacientek se kompletní cervikální stenóza vyskytla u jedné ženy, co si vyžádalo dilataci v celkové narkóze. Nepřítomnost endocervikálních buněk na cytologickém stěru je pro pacientku i lékaře velice problematická, zejména u adenokarcinomu. Tato absence byla důvodem, proč jsme k cytologickému stěru přidali doplňkové vyšetření HPV-HR. Z 10 žen, které podstoupily hysterektomii při negativním HPV HR, měla pouze jedna LSIL (CIN1). Všechny ostatní vzorky byly negativní.

Závěrem lze konstatovat, že méně radikální fertilitu zachovávající operace s mapováním sentinelových uzlin je bezpečným postupem u karcinomu děložního hrdla, který má v největším průměru < 2 cm a infiltruje méně než polovinu stromatu. Míra recidivy je přijatelná, bez mortality a s nízkou mírou morbidit. Vždy je nutné rozšířené a přesné sledování, při kterém je v rámci následného hodnocení užitečné využití HPV HR testace. Na základě současných znalostí o HPV je nezbytné zvážit očkování proti HPV u žen po konzervativní léčbě karcinomu děložního hrdla, aby se předešlo reinfekci (Jentschke et al. 2020).

5 Souhrn

V první části práce jsme se zabývali problematikou prognostických faktorů a jejich vlivem na terapii u karcinomu vaječníků i s ohledem na klinicko-patologické data. Membránové transportéry (jako ABC, SLC a ATPázy) se podílejí na karcinogenezi a rozvoji chemorezistence, ale jejich význam pro prognózu epitelálního karcinomu vaječníků (EOC) je stále málo známý. Hodnotili jsme profil genové exprese 39 ABC a 12 SLC transportérů a 3 ATPáz ve tkáních EOC a zabývali jsme se jejich významem pro prognózu a klinický průběh pacientek s EOC. Byla odhadnuta relativní exprese genů v souboru primárních EOC (n=57) a v kontrolních ovariálních tkáních (n=14) a porovnána s klinickými údaji a přežitím pacientek. Získané údaje byly validovány na nezávislém souboru pacientek (n=60). Šest ABC genů a gen SLC22A18 byly v karcinomech ve srovnání s kontrolami významně nadměrně exprimovány, zatímco exprese 12 genů ABC, 5 genů SLC, ATP7A a ATP11B byla snížena. Expresí genů ABCA12, ABCC3, ABCC6, ABCD3, ABCG1 a SLC22A5 byla vyšší u high-grade serózního karcinomu ve srovnání s ostatními podtypy. Expresí genu ABCA2 významně souvisela s grade EOC u obou souborů pacientek. Pozoruhodné je, že úroveň genové exprese ABCA9, ABCA10, ABCC9 a SLC16A14 významně souvisela s PFS v pilotních i validačních souborech. Hladina ABCG2 souvisela s PFS v souhrnném souboru pacientek. Na základě výsledků práce konstatovat, že geny ABCA2, ABCA9, ABCA10, ABCC9, ABCG2 a SLC16A14 představují nové předpokládané markery progresu EOC a spolu s odhaleným vztahem mezi expresí ABCA12, ABCC3, ABCC6, ABCD3, ABCG1 a SLC22A5 a high-grade serózním EOC by měly být dále zkoumány prostřednictvím rozsáhlejší sledovací studie.

Druhá část práce je věnovaná problematice řešení časných stádií karcinomu hrdla děložního s ohledem na zachování fertility při minimální radikalitě výkonu s cílem posoudit bezpečnost této terapie a její vliv na celkovou morbiditu a mortalitu operovaných pacientek. Standardním postupem u karcinomu děložního hrdla je radikální hysterektomie (RH) a pánevní lymfadenektomie (LAP). Vzhledem ke zvyšujícímu se věku žen při porodu se fertilita stává velkým problémem. Pacientkám, které splnily předem stanovené podmínky (stádium IA1, LVSI pozitivní, stádium IA2 a IB1 (< 2 cm v největším průměru a infiltrací do méně než poloviny stromatu) byla nabídnuta dvoukroková méně radikální operace se zachováním fertility. Předoperační postup sestával z histopatologické diagnostiky a vyšetření magnetickou rezonancí spolu s ultrazvukovou volumetrií. Následně bylo provedeno laparoskopické mapování sentinelové uzliny (SLNM) se zmraženým řezem (FS), po kterém následovala pánevní lymfadenektomie a v případě negativního výsledku „selektivní parametrektomie“ (odstranění aferentních lymfatických kanálů z paracervixu). Po ověření definitivním histopatologickým rozbohem byla pacientkám provedena simplexní trachelektomie (IB1) nebo konizace s velkým konusem (IA1/IA2) týden po primární operaci. V období 1999–2018 bylo do studie zařazeno 91 žen (medián věku 29,1, rozmezí 21–40 let). Z těchto 91 žen bylo 51 (56,0 %) nullipary. Míra detekce SLN byla 100 % na pacientku a míra detekce specifické strany 96,7 %. V devíti případech (9,8 %) byly diagnostikovány pozitivní lymfatické uzliny. Tyto ženy poté podstoupily RH. Z celkem 11 žen, které ztratily fertilitu v důsledku radikalizace pro pozitivní uzliny nebo nález non in sano v trachelektomii, zemřela pouze jediná žena, která odmítla radioterapii. Přežití této skupiny je 91 %. Fertilita byla zachována 80 pacientkám, ale u 4 došlo k lokální recidivě (5,0 %). Všechny tyto ženy žijí bez známek onemocnění. Mortalita byla 0,0 %. Medián sledování byl 149 měsíců. Na základě těchto dat lze konstatovat, že méně radikální fertilitu zachovávající operace se SLNM je u karcinomů děložního hrdla o velikosti < 2 cm v největším rozměru s infiltrací méně než do poloviny stromatu hrdla děložního bezpečná. Míra recidivy je přijatelná, bez mortality. Morbidita při tomto postupu je nízká. Pacientky po této léčbě však vyžadují extenzivní a přesný follow-up, v rámci kterého se zdají být přínosné testy na onkogenní vysoce-rizikové viry HPV a možnost vakcinace.

6 Summary

In the first part of the thesis we addressed the issue of prognostic factors and their influence on therapy in ovarian cancer with regard to clinicopathological data. Membrane transporter proteins (for example ABC, SLC and ATPases) take part in oncogenesis and the formation of chemoresistance, however the interpretation of their importance in ovarian cancer prognosis is still limited. We performed gene expression profiling on 39 ABC and 12 SLC transporters and 3 ATPases in epithelial ovarian cancer (EOC) tissues and assessed the results with respect to prognosis and clinical presentation of EOC patients. In a cohort of tissues with primary EOC (n = 57) and control tissues (n = 14) we assessed relative expression of genes and compared it with the clinical and survival information. The data was verified on a separate cohort (n = 60). 6 ABC genes and the SLC22A18 gene were considerably over-expressed in the cancer tissues in comparison with control tissues and the expression of 12 ABC genes, 5 SLC genes, ATP7A, ATP11B was reduced. The expression of ABCA12, ABCC3, ABCC6, ABCD3, ABCG1, SLC22A5 genes was greater in HGSC in comparison with other types. Expression of ABCA2 was considerably related to tumour grade in both cohorts. Particularly, the expression levels of ABCA9, ABCA10, ABCC9 and SLC16A14 were considerably related to PFS in both pilot and verification groups. ABCG2 level was related to PFS in the grouped patient cohort. Based on the results of this study, we can conclude that genes ABCA2, ABCA9, ABCA10, ABCC9, ABCG2 and SLC16A14 represent new potential markers of epithelial ovarian cancer progression and collectively with the discovered association between the expression of ABCA12, ABCC3, ABCC6, ABCD3, ABCG1, SLC22A5 and HGSC they should be investigated more extensively in future studies.

The second part of the study is devoted to the management of early stage cervical cancer with regard to fertility preservation with minimal radical surgery, with the aim of assessing the safety of this therapy and its impact on overall morbidity and mortality in operated patients. The common procedure for cervical cancer is radical hysterectomy (RH) and pelvic lymphadenectomy (LAP). Due to the growing age of women at delivery, fertility is becoming a key concern. Patients fulfilling the predefined criteria (stage IA1, LVSI positive, stage IA2 and stage IB1 (< 2cm and infiltration <1/2 of the stroma) were offered two-step less radical surgery with preservation of fertility. The preoperative procedure consisted of histopathological diagnosis and magnetic resonance imaging along with ultrasound volumetry. Subsequently, laparoscopic sentinel lymph node mapping (SLNM) with frozen section (FS) was performed, followed by pelvic lymphadenectomy and, in case of negative results, "selective parametrectomy" (removal of afferent lymphatic channels from the paracervix). After confirmation by definitive histopathological analysis, patients underwent simplex trachelectomy (IB1) or conization with a large cone (IA1/IA2) one week after the primary operation. Between 1999 and 2018, 91 women were included in the study (median age 29.1, range 21-40 years). 51 (56.0%) of these women were nulliparas. The detection rate of SLN was 100% per patient and the specific side detection rate was 96.7%. Nine cases (9.8%) were diagnosed with positive lymph nodes and RH was performed. Of the 11 women who lost fertility as a result of radicalisation for positive lymph nodes or non in sano findings at trachelectomy, only one woman who refused radiotherapy died. The survival rate of this group is 91%. 80 patients have preserved their fertility, but 4 have had local recurrence (5.0%). All of these women are alive without signs of disease. The mortality rate was 0.0%. Median follow-up was 149 months. Based on these data we conclude that less radical fertility-preserving surgery with SLNM is safe for cervical cancers < 2 cm in greatest dimension with infiltration of less than half of the cervical stroma. The rate of recurrence is acceptable and there was no mortality observed. This procedure has a low morbidity. Patients after this treatment however require extensive and accurate follow-up, in which testing for oncogenic high-risk HPV viruses and the possibility of vaccination appear to be beneficial.

7 Použitá literatura

- AUNER, Veronika, Jalid SEHOULI, Gülten OSKAY-OEZCELIK, *et al.* ABC transporter gene expression in benign and malignant ovarian tissue. *Gynecologic Oncology* [online]. 2010, **117**(2), 198–201. ISSN 1095-6859. Dostupné z: doi:10.1016/j.ygyno.2009.10.077
- BEAUFORT, Corine M., Jean C. A. HELMIJR, Anna M. PISKORZ, *et al.* Ovarian cancer cell line panel (OCCP): clinical importance of in vitro morphological subtypes. *PLoS One* [online]. 2014, **9**(9), e103988. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0103988
- BENTIVEGNA, Enrica, Sebastien GOUY, Amandine MAULARD, *et al.* Oncological outcomes after fertility-sparing surgery for cervical cancer: a systematic review. *The Lancet. Oncology* [online]. 2016, **17**(6), e240–e253. ISSN 1474-5488. Dostupné z: doi:10.1016/S1470-2045(16)30032-8
- BURGER, H., A. ZOUMARO-DJAYOON, A. W. M. BOERSMA, J. HELLEMAN, *et al.* Differential transport of platinum compounds by the human organic cation transporter hOCT2 (hSLC22A2). *British Journal of Pharmacology* [online]. 2010, **159**(4), 898–908. ISSN 1476-5381. Dostupné z: doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00569.x
- BUSTIN, Stephen A., Vladimír BENES, Jeremy A. GARSON, *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* [online]. 2009, **55**(4), 611–622. ISSN 1530-8561. Dostupné z: doi:10.1373/clinchem.2008.112797
- COVENS, A., B. ROSEN, J. MURPHY, *et al.* How Important Is Removal of the Parametrium at Surgery for Carcinoma of the Cervix? *Gynecologic Oncology* [online]. 2002, **84**(1), 145–149. ISSN 0090-8258. Dostupné z: doi:10.1006/gy.2001.6493
- EHRlichova, Marie, Beatrice MOHELNIKOVA-DUCHONOVA, Jiri HRDY, *et al.* The association of taxane resistance genes with the clinical course of ovarian carcinoma. *Genomics* [online]. 2013, **102**(2), 96–101. ISSN 1089-8646. Dostupné z: doi:10.1016/j.ygeno.2013.03.005
- HE, Qi-Zhi, Xun-Zhen LUO, Kai WANG, *et al.* Isolation and characterization of cancer stem cells from high-grade serous ovarian carcinomas. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* [online]. 2014, **33**(1), 173–184. ISSN 1421-9778. Dostupné z: doi:10.1159/000356660
- HEDDITCH, Ellen L., Bo GAO, Amanda J. RUSSELL, *et al.* ABCA Transporter Gene Expression and Poor Outcome in Epithelial Ovarian Cancer. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* [online]. 2014, **106**(7), dju149. ISSN 0027-8874. Dostupné z: doi:10.1093/jnci/dju149
- HLAVÁČ, Viktor, Veronika BRYNYCHOVÁ, Radka VÁCLAVÍKOVÁ, *et al.* The expression profile of ATP-binding cassette transporter genes in breast carcinoma. *Pharmacogenomics* [online]. 2013, **14**(5), 515–529. ISSN 1744-8042. Dostupné z: doi:10.2217/pgs.13.26
- HLAVATA, I., B. MOHELNIKOVA-DUCHONOVA, R. VACLAVIKOVA, *et al.* The role of ABC transporters in progression and clinical outcome of colorectal cancer. *Mutagenesis* [online]. 2012, **27**(2), 187–196. ISSN 1464-3804. Dostupné z: doi:10.1093/mutage/ger075
- HUBACKOVA, Miluse, Radka VACLAVIKOVA, Marie EHRlichova, *et al.* Association of superoxide dismutases and NAD(P)H quinone oxidoreductases with prognosis of patients with breast carcinomas. *International Journal of Cancer* [online]. 2012, **130**(2), 338–348. ISSN 1097-0215. Dostupné z: doi:10.1002/ijc.26006
- JANUCHOWSKI, Radosław, Piotr ZAWIERUCHA, Małgorzata ANDRZEJEWSKA, *et al.* Microarray-based detection and expression analysis of ABC and SLC transporters in drug-resistant ovarian cancer cell lines. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* [online]. 2013, **67**(3), 240–245. ISSN 1950-6007. Dostupné z: doi:10.1016/j.biopha.2012.11.011

- JANUCHOWSKI, Radosław, Piotr ZAWIERUCHA, Marcin RUCIŃSKI, *et al.* Drug transporter expression profiling in chemoresistant variants of the A2780 ovarian cancer cell line. *Biomedicine & Pharmacotherapy* = *Biomedecine & Pharmacotherapie* [online]. 2014, **68**(4), 447–453. ISSN 1950-6007. Dostupné z: doi:10.1016/j.biopha.2014.02.002
- JENTSCHKE, M., J. KAMPERS, J. BECKER, *et al.* Prophylactic HPV vaccination after conization: A systematic review and meta-analysis. *Vaccine* [online]. 2020, **38**(41), 6402–6409. ISSN 0264-410X. Dostupné z: doi:10.1016/j.vaccine.2020.07.055
- JESSUP, Wendy, Ingrid C. GELISSEN, Katharina GAUS, *et al.* Roles of ATP binding cassette transporters A1 and G1, scavenger receptor BI and membrane lipid domains in cholesterol export from macrophages. *Current Opinion in Lipidology* [online]. 2006, **17**(3), 247–257. ISSN 0957-9672. Dostupné z: doi:10.1097/01.mol.0000226116.35555.eb
- KAMAL, C. K., Cristiana Eugenia SIMIONESCU, CI MĂRGĂRITESCU, *et al.* P53 and Ki67 immunoexpression in mucinous malignant ovarian tumors. *Romanian Journal of Morphology and Embryology* = *Revue Roumaine De Morphologie Et Embryologie*. 2012, **53**(3 Suppl), 799–803. ISSN 2066-8279.
- KAMINSKI, W. E., E. ORSÓ, W. DIEDERICH, *et al.* Identification of a novel human sterol-sensitive ATP-binding cassette transporter (ABCA7). *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 2000, **273**(2), 532–538. ISSN 0006-291X. Dostupné z: doi:10.1006/bbrc.2000.2954
- KATANO, Kuniyuki, Roohangiz SAFAEI, Goli SAMIMI, *et al.* The copper export pump ATP7B modulates the cellular pharmacology of carboplatin in ovarian carcinoma cells. *Molecular Pharmacology* [online]. 2003, **64**(2), 466–473. ISSN 0026-895X. Dostupné z: doi:10.1124/mol.64.2.466
- KOOL, M., M. VAN DER LINDEN, M. DE HAAS, *et al.* MRP3, an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 1999, **96**(12), 6914–6919. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.96.12.6914
- LANOWSKA, Malgorzata, Mandy MANGLER, Ulrike GRITTNER, *et al.* Isthmic-vaginal smear cytology in the follow-up after radical vaginal trachelectomy for early stage cervical cancer: Is it safe? *Cancer Cytopathology* [online]. 2014, **122**(5), 349–358. ISSN 1934-6638. Dostupné z: doi:10.1002/cncy.21402
- MANEO, Andrea, Mario SIDERI, Giovanni SCAMBIA, *et al.* Simple conization and lymphadenectomy for the conservative treatment of stage IB1 cervical cancer. An Italian experience. *Gynecologic Oncology* [online]. 2011, **123**(3), 557–560. ISSN 0090-8258. Dostupné z: doi:10.1016/j.ygyno.2011.08.009
- MOHELNIKOVA-DUCHONOVA, Beatrice, Veronika BRYNYCHOVA, Martin OLIVERIUS, *et al.* Differences in transcript levels of ABC transporters between pancreatic adenocarcinoma and nonneoplastic tissues. *Pancreas* [online]. 2013, **42**(4), 707–716. ISSN 1536-4828. Dostupné z: doi:10.1097/MPA.0b013e318279b861
- MOHELNIKOVA-DUCHONOVA, Beatrice, Martin OLIVERIUS, Eva HONSOVA, *et al.* Evaluation of reference genes and normalization strategy for quantitative real-time PCR in human pancreatic carcinoma. *Disease Markers* [online]. 2012, **32**(3), 203–210. ISSN 1875-8630. Dostupné z: doi:10.3233/DMA-2011-0875
- PECORELLI, Sergio, Lucia ZIGLIANI a Franco ODICINO. Revised FIGO staging for carcinoma of the cervix. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics: The Official Organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics* [online]. 2009, **105**(2), 107–108. ISSN 1879-3479. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijgo.2009.02.009
- RAMIREZ, Pedro T., Michael FRUMOVITZ, Rene PAREJA, *et al.* Minimally Invasive versus Abdominal Radical Hysterectomy for Cervical Cancer. *The New England Journal of Medicine* [online]. 2018, **379**(20), 1895–1904. ISSN 1533-4406. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMoa1806395
- ROB, L., M. CHARVAT, H. ROBOVA, *et al.* Less radical fertility-sparing surgery than radical trachelectomy in early cervical cancer. *International Journal of Gynecological Cancer: Official Journal of the International*

Gynecological Cancer Society [online]. 2007, **17**(1), 304–310. ISSN 1048-891X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1525-1438.2007.00758.x

ROB, Lukas, Petr SKAPA a Helena ROBOVA. Fertility-sparing surgery in patients with cervical cancer. *The Lancet. Oncology* [online]. 2011, **12**(2), 192–200. ISSN 1474-5488. Dostupné z: doi:10.1016/S1470-2045(10)70084-X

SALIHI, Rawand, Karin LEUNEN, Erik VAN LIMBERGEN, *et al.* Neoadjuvant chemotherapy followed by large cone resection as fertility-sparing therapy in stage IB cervical cancer. *Gynecologic Oncology* [online]. 2015, **139**(3), 447–451. ISSN 0090-8258. Dostupné z: doi:10.1016/j.ygyno.2015.05.043

SAMIMI, Goli, Roohangiz SAFAEI, Kuniyuki KATANO, Alison K. HOLZER, *et al.* Increased expression of the copper efflux transporter ATP7A mediates resistance to cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin in ovarian cancer cells. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* [online]. 2004, **10**(14), 4661–4669. ISSN 1078-0432. Dostupné z: doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0137

SEDLIS, Alexander, Brian N. BUNDY, Marvin Z. ROTMAN, *et al.* A Randomized Trial of Pelvic Radiation Therapy versus No Further Therapy in Selected Patients with Stage IB Carcinoma of the Cervix after Radical Hysterectomy and Pelvic Lymphadenectomy: A Gynecologic Oncology Group Study. *Gynecologic Oncology* [online]. 1999, **73**(2), 177–183. ISSN 0090-8258. Dostupné z: doi:10.1006/gy.1999.5387

SOUCEK, Pavel, Pavel ANZENBACHER, Ivana SKOUMALOV, *et al.* Expression of cytochrome P450 genes in CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)* [online]. 2005, **23**(9), 1417–1422. ISSN 1066-5099. Dostupné z: doi:10.1634/stemcells.2005-0066

SOUTTER, William Patrick, Peter SASIENI a Theo PANOSKALTSIS. Long-term risk of invasive cervical cancer after treatment of squamous cervical intraepithelial neoplasia. *International Journal of Cancer* [online]. 2006, **118**(8), 2048–2055. ISSN 1097-0215. Dostupné z: doi:10.1002/ijc.21604

STRNAD, Pavel, Helena ROBOVA, Petr SKAPA, *et al.* A prospective study of sentinel lymph node status and parametrial involvement in patients with small tumour volume cervical cancer. *Gynecologic Oncology* [online]. 2008, **109**(2), 280–284. ISSN 1095-6859. Dostupné z: doi:10.1016/j.ygyno.2008.02.004

SUROWIAK, P., V. MATERNA, I. KAPLENKO, *et al.* Topoisomerase 1A, HER/2neu and Ki67 expression in paired primary and relapse ovarian cancer tissue samples. *Histology and Histopathology* [online]. 2006, **21**(7), 713–720. ISSN 1699-5848. Dostupné z: doi:10.14670/HH-21.713

TOMAO, Federica, Matteo MARUCCIO, Eleonora Petra PRETI, *et al.* Conization in Early Stage Cervical Cancer: Pattern of Recurrence in a 10-Year Single-Institution Experience. *International Journal of Gynecological Cancer: Official Journal of the International Gynecological Cancer Society* [online]. 2017, **27**(5), 1001–1008. ISSN 1525-1438. Dostupné z: doi:10.1097/IGC.0000000000000991

XU, Jiao, Min YONG, Jia LI, Xiaojing DONG, *et al.* High level of CFTR expression is associated with tumor aggression and knockdown of CFTR suppresses proliferation of ovarian cancer in vitro and in vivo. *Oncology Reports* [online]. 2015, **33**(5), 2227–2234. ISSN 1791-2431. Dostupné z: doi:10.3892/or.2015.3829

YASUI, Kohichiroh, Saori MIHARA, Chen ZHAO, *et al.* Alteration in copy numbers of genes as a mechanism for acquired drug resistance. *Cancer Research* [online]. 2004, **64**(4), 1403–1410. ISSN 0008-5472. Dostupné z: doi:10.1158/0008-5472.can-3263-2

ZHAO, Yanbin, Hailing LU, An YAN, *et al.* ABCC3 as a marker for multidrug resistance in non-small cell lung cancer. *Scientific Reports* [online]. 2013, **3**, 3120. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/srep03120

8 Publikační činnost

Původní články

Hlaváč V, Holý P, Václavíková R, Rob L, **Hruda M**, Mrhalová M, Černaj P, Bouda J, Souček P. Whole-exome sequencing of epithelial ovarian carcinomas differing in resistance to platinum therapy. *Life Sci Alliance*. 2022 Oct 13;5(12):e202201551. doi: 10.26508/lsa.202201551. PMID: 36229065; PMCID: PMC9574568. **IF 5.781**

Sehnal B, Klat J, Herboltova P, Hanacek J, Fanta M, Valha P, **Hruda M**, Vasicka I, Halaska MJ. Comparison of complications in very obese women undergoing hysterectomy - Abdominal vs laparoscopic approach with short- and long-term follow-up. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2022 Sep;276:148-153. doi: 10.1016/j.ejogrb.2022.07.005. Epub 2022 Jul 9. PMID: 35908409. **IF 2.831**

Seborova K, Kloudova-Spalenkova A, Koucka K, Holy P, Ehrlichova M, Wang C, Ojima I, Voleska I, Daniel P, Balusikova K, Jelinek M, Kovar J, Rob L, **Hruda M**, Mrhalova M, Soucek P, Vaclavikova R. The Role of TRIP6, ABCC3 and CPS1 Expression in Resistance of Ovarian Cancer to Taxanes. *Int J Mol Sci*. 2021 Dec 22;23(1):73. doi: 10.3390/ijms23010073. PMID: 35008510; PMCID: PMC8744980. **IF 2.598**

Šimčíková D, Gardáš D, Hložková K, **Hruda M**, Žáček P, Rob L, Heneberg P. Loss of hexokinase 1 sensitizes ovarian cancer to high-dose metformin. *Cancer Metab*. 2021 Dec 11;9(1):41. doi: 10.1186/s40170-021-00277-2. PMID: 34895333; PMCID: PMC8666047. **IF 5.146**

Hruda M, Robova H, Rob L, Halaska MJ, Drozenova J, Pichlik T, Malikova H. Twenty years of experience with less radical fertility-sparing surgery in early-stage cervical cancer: Oncological outcomes. *Gynecol Oncol*. 2021 Oct;163(1):100-104. doi: 10.1016/j.ygyno.2021.07.031. Epub 2021 Jul 28. PMID: 34330536. IF 5,304

Lanner M, Nikolova T, Gutic B, Nikolova N, Pletnev A, Selcuk I, Vlachos DE, Razumova Z, Bizzarri N, Theofanakis C, Lepka P, Kahramanoglu I, Han S, Nasser S, Molnar S, Hudry D, Montero-Macías R, de Lange N, Macuks R, Hasanov MF, Karimbayli R, Gagua I, Andrade C, Pardal C, Dotlic J, Alvarez RM, **Hruda M**, Fruhauf F, Ekdahl L, Antonsen SL, Sukhin V, Eriksson AGZ, Gliozheni E, Delic R, Satanova A, Kovacevic N, Gristsenko L, Babloyan S, Zalewski K, Bharathan R. Subspecialty training in Europe: a report by the European Network of Young Gynaecological Oncologists. *Int J Gynecol Cancer*. 2021 Apr;31(4):575-584. **IF 4.661**

Heřman J, Rob L, Robová H, Drochýtek V, **Hruda M** et al. Molární těhotenství z pohledu patologa a klinika. *Česká gynekologie*. 2019;84(6):418-424.

Sládečková M, Bendová M, Kubecová M, **Hruda M**, Rob L, Halaška MJ. Management pacientky s karcinomem prsu diagnostikovaným v těhotenství. *Česká gynekologie*. 2019;84(4):293-297.

Pichlík T, Rob L, Robová H, Halaška MJ, Drozenová J, **Hruda M.** Drochýtek V. Individualizace chirurgického managementu karcinomů děložního hrdla IA1, IA2. *Česká gynekologie*. 2019;84(3):172-176.

Seborova K, Vaclavikova R, Soucek P, Elsnerova K, Bartakova A, Cernaj P, Bouda J, Rob L, **Hruda M.**, Dvorak P. Association of ABC gene profiles with time to progression and resistance in ovarian cancer revealed by bioinformatics analyses. *Cancer Med*. 2019;8(2):606-616. doi:10.1002/cam4.1964 **IF 3.491**

Elsnerova K, Bartakova A, Tihlarik J, Bouda J, Rob L, Skapa P, **Hruda M.**, et al. Gene Expression Profiling Reveals Novel Candidate Markers of Ovarian Carcinoma Intraperitoneal Metastasis. *J Cancer*. 2017;8(17):3598-3606. Published 2017 Oct 9. doi:10.7150/jca.20766 **IF 3.249**

Elsnerova K, Mohelnikova-Duchonova B, Cerovska E, Ehrlichova M, Gut I, Rob L, Skapa P, **Hruda M.**, Bartakova A, Bouda J, Vodicka P, Soucek P, Vaclavikova R. Gene expression of membrane transporters: Importance for prognosis and progression of ovarian carcinoma. *Oncol Rep*. 2016 Apr;35(4):2159-70. doi: 10.3892/or.2016.4599. Epub 2016 Jan 28. PMID: 26820484. **IF 2.662**

Vavřinková B, Binder T, Hadačová I, Hrachovinová I, Salaj P, **Hruda M.** Výskyt trombofilních mutací žen se závažnými těhotenskými komplikacemi. *Česká gynekologie*. 2012 Apr;77(2):171-4. Czech. PMID: 22702078.

Binder T, Vavřinková B, Hadačová I, Hrachovinová I, Salaj P, **Hruda M.** Představuje asymptomatické nosičství mutace FV Leiden a FII protrombin v heterozygotní konfiguraci zvýšené riziko tromboembolických komplikací v průběhu těhotenství, porodu a šestinedělí? *Česka gynekologie*. 2012, Feb;77(1):25-30. Czech. PMID: 22536637.

Přehledové články

Hruda M. Epidemiologie a prognóza zhoubných nádorů v těhotenství. *Onkologie* 2020;14(2):74–77.

Kapitoly v monografiích

Halaška MJ, **Hruda M.** Gynekologické operace. In: Lukáš Rob, Alois Martan, Pavel Ventruba et al. *Gynekologie. Třetí, doplněné a přepracované vydání*. Praha: Galén, 2019, s. 73–88. ISBN 978-80-7492-426-2

Hruda M., Halaška MJ. Placentární a transplacentární metastázy In: Michael J. Halaška, Lukáš Rob a kol. *Onkologická onemocnění během těhotenství*. Praha: Mladá fronta, 2015, s. 206–2017. ISBN 978-80-204-3753-2

9 Přednášková činnost

Vzrůstající věk rodiček – problém perinatologický i společenský
(Fuchsův večer. Problémy a novinky oboru gynekologie a porodnictví, Praha, září 2011)

Estrogenní deficit, rizika a benefity HRT a ERT
(Podzimní škola mladých dermatologů, Praha, říjen 2016)

Salpingektomie a tubární hypotéza vzniku karcinomu ovária
(XXV. konference Sekce gynekologické endoskopie ČGPS ČLS JEP, Olomouc, říjen 2016)

Trendy incidence a mortality zhoubných nádorů vulvy a pochvy, srovnání
s ostatními gynekologickými nádory
(XXXVI. Kaňkův pražský onkologický den gynekologů, Praha, prosinec 2016)

Dnešní možnosti gynekologické endoskopie
(193. doškolovací den v gynekologii a porodnictví, LEVRET, Praha, březen 2017)

Patogeneze nové teorie vzniku karcinomu ovárií. Co přináší pro kliniku v praxi.
(Padovcův večer, Praha, říjen 2017)

Patogeneze nové teorie epiteliálních zhoubných nádorů
(XXXVII. Kaňkův pražský onkologický den gynekologů, Praha, prosinec 2017)

Laparoskopická operativa v souboru pacientek s BMI nad 35. Kdy je BMI problém?
(XXVII. konference Sekce gynekologické endoskopie ČGPS ČLS JEP, Olomouc, říjen 2018)

Nová teorie vzniku epiteliálních zhoubných nádorů
(8. konference nemocničních gynekologů a porodníků, Mikulov, listopad 2018)

Epiteliální zhoubné nádory ovaria – fertilitu zachovávající postupy
(XXXVIII. Kaňkův pražský onkologický den gynekologů, Praha, prosinec 2018)

Adenokarcinomy děložního hrdla – klinický management operabilních stádií
(XXXVIII. Kaňkův pražský onkologický den gynekologů, Praha, prosinec 2018)

Technika detekce sentinelových uzlin a aferentních lymfatických kanálů u radikalitu redukujících
operací časných stádií cervikálních karcinomů
(XXVIII. konference Sekce gynekologické endoskopie ČGPS ČLS JEP, Olomouc, říjen 2019)

The technique of sentinel lymph node and afferent lymphatic channel detection in radicality reducing
early stage cervical cancer surgery
(European Gynaecological Oncology Congress 2019 in Athens, listopad 2019)

Laparoskopická operativa v souboru pacientek s BMI nad 35. Aktualizovaný soubor.
(9. konference nemocničních gynekologů a porodníků, Praha, listopad 2019)

Endometrióza a pánevní bolest (ENTOG – online přednáška, říjen 2020)

Dvacet let zkušeností s méně radikálními fertilitu zachovávajícími operacemi u karcinomu děložního
hrdla v časném stádiu: onkologické výsledky
(XXX. konference Sekce gynekologické endoskopie ČGPS ČLS JEP, Olomouc, listopad 2022)