

MASARYKOVA UNIVERZITA
LÉKAŘSKÁ FAKULTA
GYNEKOLOGICKO-PORODNICKÁ KLINIKA LF MU a FN BRNO

Habilitační práce

**Analýza vybraných charakteristik týkajících se diagnózy,
prognózy a radikální operační léčby gynekologických
zhoubných nádorů
(soubor komentovaných prací)**

MUDr. Luboš Minář, Ph.D.

Brno 2018

Poděkování

Poděkování patří všem spolupracovníkům z Gynekologicko-porodnické kliniky a dalších pracovišť FN Brno a LF MU Brno, kteří se podílejí na rozvoji onkogynekologické problematiky a přednostovi Gynekologicko-porodnické kliniky prof. MUDr. Pavlovi Ventrubovi, DrSc., MBA za podporu mého osobního rozvoje i rozvoje celé subspecializace. Speciální poděkování patří manželce a nejbližší rodině za trpělivost a podporu v osobním i profesním životě.

Obsah

1. Úvod	5
2. Cíle habilitační práce	7
3. Nové sérové a molekulárně biologické nádorové markery a možnosti jejich využití v klinické praxi	8
3.1. Human epididymis protein 4 a jeho význam pro diagnostiku a prognózu karcinomu endometria	11
3.1.1. Minar L, Klabenesova I, Jandakova E, Zlamal F, Bienertova-Vasku J. Prognostic value of human epididymis protein 4 in endometrial cancer and its utility for surgical staging. (2015). <i>Journal of Obstetrics and Gynaecology Research</i> , 41(10), pp. 1644-1652.	13
3.1.2. Minar L, Klabenesova I, Jandakova E, Zlamal F, Bienertova-Vasku J. Is human epididymis protein 4 an effective tool for the differential diagnosis of benign and malignant endometrial tumours? (2016). <i>European Journal of Gynaecological Oncology</i> , 37(5), pp. 617-622.	23
3.2. Human epididymis protein 4 a jeho význam pro diferenciální diagnostiku ovariálních tumorů	29
3.2.1. Minar L, Felsing M, Cermakova Z, Zlamal F, Bienertova-Vasku J. Comparison of the Copenhagen Index vs ROMA for the preoperative assessment of women with ovarian tumors. (2018). <i>International Journal of Gynecology & Obstetrics</i> , 140(2), pp. 241-246.....	31
3.3. MikroRNA v onkogynekologickém výzkumu se zaměřením na karcinom ovaria a endometria	38
3.3.1. Zavesky L, Jandakova E, Turyna R, Langmeierova L, Weinberger V, Minar L. Supernatant versus exosomal urinary microRNAs. Two fractions with different outcomes in gynaecological cancers. (2016). <i>Neoplasma</i> , 63(1), pp. 621-632.....	40
3.3.2. Zavesky L, Jandakova E, Weinberger V, Minar L, Hanzikova V, Duskova D, Zaveska Drabkova L, Svobodova I, Horinek A. Ascites-derived extracellular microRNAs as potential biomarkers for ovarian cancer. <i>Reproductive Sciences</i> , 2018. http://doi:10.1177/1933719118776808 .	53
4. Radikální primární operační léčba vybraných gynekologických malignit (karcinom vaječníku a vulvy) a sekundární cytoredukční chirurgie karcinomu vaječníku	67
4.1. Operační léčba pokročilých stádií karcinomu vaječníku	69
4.1.1. Minar L, Felsing M, Rovny I, Zlamal F, Bienertova-Vasku J, Jandakova E. Modified posterior pelvic exenteration for advanced ovarian malignancies: a single-institution study of 35 cases. (2017). <i>Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica</i> , 96 (9), pp. 1136-1143.	72
4.2. Sekundární cytoredukční chirurgie karcinomu vaječníku	81

4.2.1. Felsinger M, Minar L, Weinberger V, Rovny I, Zlamal F, Bienertova-Vasku J. Secondary cytoreductive surgery - viable treatment option in the management of platinum-sensitive recurrent ovarian cancer. (2018). <i>European Journal of Obstetrics, Gynecology & Reproductive Biology</i> , 228, pp. 154-160.....	83
4.3. Chirurgický staging a jeho význam pro redukci rizika lokální rekurence primárního karcinomu zevních rodidel	91
4.3.1. Minar L, Felsinger M, Cihalova M, Zlamal F, Bienertova-Vasku J. Vulvar cancer recurrence – an analysis of prognostic factors in tumor-free pathological margins patients group. (2018). <i>Ginekologia Polska</i> , 89(8), pp. 351-358.	93
5. Specifika a komplikace radikální operační léčby malignit gynekologických pánevních orgánů	102
5.1. Fertilitu zachovávající terapie gynekologických malignit.....	104
5.1.1. Felsinger M, Minář L, Weinberger V, Hudeček R. Radikální fertilitu zachovávající operační výkony u gynekologických malignit - pětiletý soubor. (2015). <i>Česká Gynekologie</i> , 80(5), pp. 339-344.....	106
5.1.2. Minář L, Felsingerová Z, Jandáková E. Ovariální epiteliální malignity v adolescentním věku. (2014). <i>Česká Gynekologie</i> , 79(2), pp. 98-102.....	113
5.2. Specifika operační erudice onkogynekologa (problematika systematické retroperitoneální lymfadenektomie).....	119
5.2.1. Minář L, Weinberger V, Felsinger M. Cévní anatomie aortopelvickeho retroperitonea a její abnormality v souvislosti s radikální onkogynekologickou operativou-vlastní zkušenosti. (2017). <i>Česká Gynekologie</i> , 82(2), pp. 100-107.....	121
5.3. Operační komplikace radikálních onkogynekogických výkonů	130
5.3.1. Minář L, Weinberger V, Kysela P. Komplikace radikálních onkogynekologických operací. (2010). <i>Česká Gynekologie</i> , 75(4), pp. 346-352.....	132
5.3.2. Felsingerová Z, Minář L, Weinberger V. Incidence a terapie lymfocyst po provedené pánevní a paraaortální lymfadenektomii - vlastní soubor. (2014). <i>Česká Gynekologie</i> , 79(5), pp. 388-392.	140
6. Závěry.....	146
7. Souhrn.....	152
8. Summary.....	154
9. Seznam zkratk.....	156
10. Práce autora zařazené do textu	157
11. Literatura	159

1. Úvod

Koncept habilitační práce je založen na souboru komentovaných vybraných publikací, které odrážejí autorovu vědecko-výzkumnou činnost podlouženou dosavadní klinickou praxí v oblasti onkogynekologie, tedy v problematice zhoubných nádorů gynekologických pánevních orgánů. Onkogynekologie je jednou ze základních subspecializací oboru gynekologie a porodnictví. Získání této oborové subspecializace vyžaduje relativně dlouhou postgraduální přípravu, především vzhledem k nezbytnému počtu provedených operačních výkonů a získání kvalitní a komplexní praktické erudice v onkochirurgii. Na druhou stranu součástí specializace je adekvátní diagnostika onemocnění, podíl na provedení kvalitního předoperačního stagingu i znalost komplexní protinádorové léčby, včetně podávání chemoterapie a podpůrné léčby.

V incidenci gynekologických zhoubných nádorů obsazuje Česká republika dlouhodobě nelichotivá přední místa ve světových tabulkách. Nejčastější gynekologickou malignitou je karcinom děložního těla, který je čtvrtým nejčastějším nádorem v populaci českých žen a jeho incidence patří společně s USA k nejvyšším na světě [1]. Rovněž incidence karcinomu vaječníku patří mezi nejvyšší v Evropě, ožehavost problematiky této malignity je navíc znásobena neexistujícím screeningem nemoci, převažujícím záchytem v pokročilých stádiích nemoci a s tím spojenou nepříznivou prognózou. V incidenci karcinomu děložního hrdla převyšujeme i přes existenci screeningového programu stále téměř trojnásobně ty země Evropské unie, které se vyznačují nejlépe fungujícím plošným screeningem. Patrný pomalý nárůst v incidenci se týká karcinomu zevních rodidel, pouze v případě karcinomu pochvy zůstává incidence dlouhodobě nízká. V absolutních počtech onemocní v ČR každý rok více než 4000 žen zhoubným nádorem některého z gynekologických pánevních orgánů, dle údajů z Národního onkologického registru bylo v roce 2016 diagnostikováno 4254 nových gynekologických malignit [2].

V posledních letech je věnována velká pozornost centralizaci péče o pacientky se zhoubným nádorem gynekologických pánevních orgánů. Za tímto účelem je vytvořena v rámci fakultních či krajských nemocnic síť tzv. center vysoce specializované zdravotní péče v onkogynekologii neboli onkogynekologických center. Hlavním cílem je standardizace a zvýšení kvality diagnostické a léčebné péče na podkladě vytvoření specializovaných týmů. Koncentrace případů na úrovni těchto center sekundárně vytváří předpoklady pro rozvoj vědecko-výzkumných aktivit ve spolupráci s dalšími klinickými, preklinickými a teoretickými lékařskými obory.

2. Cíle habilitační práce

Habilitační práce je rozčleněna do tří základních kapitol, které jsou odrazem priorit autorova odborného zájmu a jsou spojeny s příslušnými publikačními výstupy.

První kapitola je věnována problematice nových sérových a molekulárně biologických nádorových markerů a možnostem jejich současného a potenciálního budoucího využití v diagnostické praxi u vybraných gynekologických zhoubných nádorů. Prvním z nich je karcinom endometria (děložního těla), který reprezentuje nádor sice s relativně dobrou prognózou, ale zároveň se jedná o nejčastější gynekologický pánevní zhoubný nádor, jehož incidence má v našem geografickém prostoru setrvale se zvyšující tendenci. Druhým je epitelální nádor vaječníku, který se naopak vyznačuje suverénně nejhorší prognózou mezi gynekologickými malignitami.

Další dvě kapitoly jsou věnovány preferované oblasti autorova odborného zájmu a sice operační léčbě zhoubných nádorů gynekologických pánevních orgánů, která vyžaduje speciální erudici. První z nich analyzuje přínos radikální operační léčby primárních nádorů vaječníku a zevních rodidel a cytoredukčních sekundárních operací u recidiv ovariálního nádoru. Zatímco řešení primárních a recidivujících zhoubných nádorů vaječníku patří z operačního hlediska mezi erudičně jednoznačně nejnáročnější výkony vyžadující dokonalou orientaci v celé peritoneální dutině, problematika karcinomu zevních rodidel je výzvou do budoucna vzhledem k měnící se incidenci jednotlivých gynekologických malignit s předpokládaným nárůstem záchytů právě tohoto nádoru. Poslední kapitola je věnována specifikům a možným komplikacím radikální onkogynekologické operativy, které vyplývají právě z extendované radikality těchto výkonů.

3. Nové sérové a molekulárně biologické nádorové markery a možnosti jejich využití v klinické praxi

Jednou z charakteristických vlastností zhoubných nádorů je produkce tzv. nádorových markerů. Ideální nádorový marker by měl splňovat určitá základní kritéria. Měly by jej produkovat jen buňky maligního nádoru, případně by byl přítomen jen v jednom orgánu. Měl by dosahovat vysokých koncentrací již při malém objemu nádoru (tj. v časném stádiu onemocnění) a hladiny markeru by měly korelovat s objemem nádoru tak, aby série získaných hodnot reflektovala klinický průběh nemoci a návrat hodnot k normě by znamenal nepřítomnost nádoru. Ideální nádorový marker by měl dosahovat téměř 100% senzitivity, specifity a pozitivní prediktivní hodnoty. V tomto případě by identifikoval všechny pacienty s maligním onemocněním a vyloučil by onemocnění u lidí s negativní prediktivní hodnotou. Zásadní pro správnou klinickou interpretaci nálezů je určení referenční hodnoty nádorového markeru, tj. hodnoty, kterou nepřekračují sérové koncentrace 95% zdravých lidí nebo pacientů s nemaligním onemocněním.

V onkogynekologii není k dispozici nádorový marker využitelný pro screening splňující parametry 95% specifity a alespoň 90% senzitivity, na druhou stranu však nádorové markery mají i v onkogynekologické problematice důležité místo. Kromě podílu na diagnostickém rozhodování lze uvažovat o prognostickém významu hodnot nádorových markerů naměřených před zahájením léčby, markery lze použít při monitorování efektu zvoleného léčebného plánu, důležitou úlohu hrají při odhalování perzistence nebo recidivy zhoubného nádoru [3].

Konvenčním nádorovým markerem v onkogynekologii v problematice patologií endometria a vaječníku je antigen CA125, který však jako marker není orgánově ani nádorově specifický. Jeho zvýšené hodnoty jsou detekovány rovněž u zdravých žen za fyziologických stavů (menstruace, gravidita), mohou být asociovány s některými benigními gynekologickými procesy nebo s nenádorovými patologickými stavy jiných orgánových systémů [4].

Z toho vyplývá pokračující úsilí v hledání algoritmů pro efektivní využití nových nádorových markerů, resp. jejich kombinací. Autorovo úsilí je v tomto směru zaměřeno na možnosti využití lidského epididymálního proteinu 4 (human epididymis protein, HE4) a tzv. mikroRNA (malé, proteiny nekódující regulační molekuly RNA) v souvislosti s karcinomem endometria a vaječníku.

Human epididymis protein 4 patří do skupiny proteinů označovaných jako „whey acidic four-disulfide core“ [5]. Jeho produkce byla zjištěna primárně v epitelu distálního nadvarlete a předpokládalo se, že jako proteázový inhibitor je zapojený do imunitních pochodů a ovlivňuje mj. proces zrání spermií [6,7]. Následně bylo zjištěno, že HE4 je ve zvýšené míře exprimován v souvislosti s maligní tkáňovou transformací, přičemž nejvyšší expresi z maligně transformovaných epiteliálních tkání vykazují kromě plic tkáň gynekologických pánevních orgánů, a sice vaječníku (serózní, ev. endometroidní adenokarcinom) a endometria (endometroidní adenokarcinom) [8,9]. Analýza markeru je možná ze snadno dostupného biologického materiálu, tedy z krevního séra, dalším možným biologickým materiálem pro analýzu jsou tkáňové bloky [10].

MikroRNA představují v průměru 22 nukleotidů dlouhé jednořetězcové molekuly RNA, přičemž první z nich byla objevena před více než dvaceti lety. Jejich biogeneze začíná v buněčném jádru, ve kterém se transkripcí genů pro mikroRNA vytváří dlouhý primární transkript, pri-microRNA. Dalším enzymatickým štěpením pri-microRNA vzniká 70-100 nukleotidů dlouhá vlásenka (pre-microRNA), která je transportována do cytoplazmy, kde dochází k dalšímu enzymatickému štěpení. Výsledkem je jednořetězcová molekula mikroRNA. MikroRNA se podílí na regulaci všech klíčových buněčných funkcí, jsou regulátory exprese genů na posttranskripční úrovni. Ovlivňují tuto expresi vazbou na cílové mRNA, která vede k blokaci translace a štěpení mRNA [11]. U nádorových onemocnění jsou spojeny např. s proliferací buněk, migrací, invazivitou, angiogenezí nebo rezistencí k chemoterapii. Ve vztahu ke kancerogenezi se zjednodušeně

klasifikují jako tumor-supresorové a onkogenní podle toho, jak regulují mRNA onkogenů [12]. Jejich výskyt není omezen jen na buňky, ale jsou přítomny také v tělních tekutinách (krev, plazma/sérum, moč, ascites) [13].

Kapitola je tématicky rozdělena do tří částí. V části 3.1. se autor věnuje potenciálnímu přínosu HE4 v diferenciální diagnostice biologické povahy endometrálních lézí a zabývá se rovněž možným přínosem tohoto markeru pro předoperační stratifikaci pacientek s nejčastěji se vyskytujícím (tj. endometroidním) histotypem karcinomu endometria na podkladě analýzy souboru pacientek operovaných v Onkogynekologickém centru FN Brno. Téma benefitu markeru HE4 v diferenciální diagnostice biologické povahy ovariálních lézí je analyzováno opět na vlastním souboru pacientek v části 3.2. této kapitoly. Poslední část (3.3.) se týká využití mikroRNA v onkogynekologickém výzkumu se zaměřením na výše uvedené malignity, tj. endometria a vaječníku.

3.1. Human epididymis protein 4 a jeho význam pro diagnostiku a prognózu karcinomu endometria

Karcinom endometria je nejčastější gynekologický pánevní nádor v populaci českých žen s postupně se zvyšující incidencí. Nelichotivou skutečností je fakt, že jeho incidence patří společně s incidencí v USA dokonce mezi nejvyšší na světě [1]. Efektivní screeningová metoda pro tento karcinom neexistuje. Diagnóza je provedena odběrem biopsie s histologickým vyšetřením, přičemž biotické ověření je indikováno na základě klinické symptomatologie a/nebo ultrazvukového nálezu (u asymptomatických žen) [14].

Autorův zájem v této problematice je soustředěn dvěma hlavními směry v souvislosti s uplatněním lidského epididymálního proteinu 4. První z nich souvisí s diferenciální diagnostikou biologické povahy lézí sliznice děložního těla. Ta je jednoznačně dána histologickým vyšetřením za předpokladu dostatečně reprezentativní biopsie. Druhou možností je diferenciálně diagnostická rozvaha pomocí ultrazvukového nálezu, která vyžaduje precizní erudici v ultrazvukové onkogynekologické diagnostice [15,16]. Další možností s dosud nevyplněným prostorem je využití jednoduše interpretovatelného laboratorního markeru, který se vyznačuje adekvátní senzitivitou a specificitou, je široce dostupný, jeho stanovení je ekonomicky efektivní a je možné ho získat ze snadno dostupného biologického materiálu. Tím by byla eliminována nutnost užití byť krátkodobé celkové anestezie v souvislosti s provedením biopsie (s benefitem zejména pro polymorbidní, interně kompromitované pacientky) nebo nedostupnost sonografisty s adekvátní erudicí v onkogynekologické problematice. Pacientky s předpokladem benigního nálezu by mohly být vedeny pouze v dispenzarizaci bez nutnosti jakékoliv operační intervence, včetně pouze diagnostické. Perspektivní přínos využití HE4 v diferenciální diagnostice biologické povahy endometrálních lézí autor analyzoval při současném srovnání s efektivitou konvenčního nádorového markeru, tj. antigenu CA125, v průběhu vlastní klinické praxe na souboru celkem 300 pacientek. V podsouboru malignit byly zahrnuty pacientky

s dominantním, tj. endometroidním histotypem adenokarcinomu endometria, který reprezentuje 90% karcinomů endometria a rovněž zastoupení stádií nemoci kopírovalo relativně přesně reálnou klinickou prezentaci karcinomu s převahou pacientek diagnostikovaných v časných stádiích nemoci. Výsledky analýz potvrdily v případě HE4 korelaci vyšších hladin s maligním nálezem a statistickou signifikanci v diferenciaci benigních a maligních lézí endometria ve srovnání s konvenčním markerem, tedy antigenem CA125 (viz **příloha 3.1.1.**).

Druhý základní směr autorova zájmu je věnován možnosti využití HE4 v předoperační stratifikaci pacientek s endometroidním histotypem adenokarcinomu endometria. Dle rozsahu invaze do děložní stěny a gradingu se nádory diferencují do skupiny nízkého a vysokého rizika, které se odlišují rozsahem indikovaného chirurgického stagingu. Analyzovaný přístup je opět alternativou k současným stratifikačním nástrojům používaným v klinické praxi. Tím je na prvním místě dle standardních požadavků na vybavenost specializovaných onkogynekologických center možnost peroperační frozen section v režii patologa erudovaného v problematice gynekologických malignit [17-20]. Alternativou využívanou některými pracovišti je doporučení erudovaného specialisty v onkogynekologickém ultrazvuku [21-23]. Analýza 115 pacientek s endometroidním adenokarcinomem těla dělohy léčených v Onkogynekologickém centru FN Brno s rovnoměrným zastoupením pacientek nízkého a vysokého rizika potvrdila statisticky signifikantní rozdíly v sérových hladinách mezi těmito dvěma skupinami pacientek a konstatovala význam lidského epididymálního proteinu 4 jako přesnějšího prediktoru v diferenciaci těchto dvou prognosticky rozdílných skupin pacientek ve srovnání s konvenčním markerem CA125 (viz **příloha 3.1.2.**).

3.1.1. Minar L, Klabenesova I, Jandakova E, Zlamal F, Bienertova-Vasku J. Prognostic value of human epididymis protein 4 in endometrial cancer and its utility for surgical staging. (2015). *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 41(10), pp. 1644-1652.

Prognostic value of human epididymis protein 4 in endometrial cancer and its utility for surgical staging

Lubos Minar¹, Ivanka Klabensova², Eva Jandakova³, Filip Zlamal⁴ and Julie Bienertova-Vasku⁴

¹Department of Obstetrics and Gynaecology, Faculty of Medicine, Masaryk University Brno and Faculty Hospital Brno ²Department of Biochemistry, Faculty Hospital Brno ³Department of Pathology, Faculty Hospital Brno ⁴Department of Pathological Physiology, Faculty of Medicine, Masaryk University Brno, Brno, Czech Republic

Abstract

Aim: An optimal surgical staging in the group of patients with the high-risk type of endometrial cancer is often limited by age and serious internal comorbidities. Therefore, in this study we focused on human epididymis protein 4 and its contribution to the preoperative differentiation of prognostically distinct groups of patients and to individualized surgical treatment as compared with cancer antigen (CA) 125 and imaging methods.

Material and Methods: The study included 115 patients with endometrioid adenocarcinoma diagnosed through endometrial biopsy. Before the final operation, blood sampling was performed for the determination of human epididymis protein 4 (HE4) and CA125 levels. Serum levels of both biomarkers were analyzed in relation to individual prognostic factors (stage of disease, depth of myometrial invasion, tumor grade, risk type of disease).

Results: In the case of HE4, we demonstrated a statistically significant difference ($P < 0.001$) between patients with low and high risk of the disease. In our model, achieving the maximum sum of sensitivity and specificity, HE4 shows a sensitivity of 72.4% and a specificity of 75.4% for the cut-off 76.5 pmol/L and is a better predictor in distinguishing the high-risk patients than CA125 (area under the curve 0.77 for HE vs 0.71 for CA125).

Conclusion: HE4 is a marker that could complement the findings of imaging techniques and that may be useful in decision-making on how to individualize surgical staging. The possibility of its introduction as an independent marker in routine practice remains, at the moment however, limited. The optimal cut-off for HE4 has not been established yet and further studies are needed.

Key words: endometrial cancer, human epididymis protein 4, risk status of disease, surgical staging.

Introduction

The most common histological variant of endometrial cancer is the endometrioid subtype, which represents more than 75% of all cancers in this field.¹ The prognosis of this group of gynecologic malignancies is quite favorable. It is conditioned by a dominant detection of the disease in the first stage, which includes nearly 75% of all patients. Complete surgical staging is indicated in high-risk cases of the disease. However, its execution is often problematic due to the age distribution and presence of

multiple internal comorbidities (including obesity). This necessitates an effort to identify a marker that would increase the sensitivity of preoperative stratification of patients into groups of low and high risk.

Human epididymis protein 4 (HE4) is a biochemical marker that is already partly used in the diagnosis and follow-up of ovarian cancer. Its diagnostic and prognostic value in the field of endometrial cancer has been quite intensively investigated. HE4 belongs to the group of proteins known as the 'whey acidic four-disulfide core' with properties similar to a trypsin inhibitor.² Its

Received: December 19 2014.

Accepted: April 23 2015.

Reprint request to: Dr Lubos Minar, Department of Obstetrics and Gynaecology, Faculty of Medicine, Masaryk University Brno and Faculty Hospital Brno, Obilni trh 11, 602 00 Brno, Czech Republic. Email: lubosminar@seznam.cz

production was detected primarily in the epithelium of the distal epididymis and it was assumed that it was involved as a protease inhibitor in immune processes and that it affected, among others processes, sperm maturation.^{3,4} Subsequently, it was found that HE4 was expressed in many tissues. The highest expression of malignantly transformed epithelial tissues is shown not only in the tissue of the ovary (serous and endometrioid adenocarcinoma) and lungs, but also in some endometrial cancer, for example, the endometrioid subtype.^{5,6}

Methods

This study aimed to analyze 115 patients with an endometrioid subtype of endometrial cancer. The histopathological diagnosis was determined by the examination of endometrial biopsy obtained by curettage or hysteroscopy. Once the diagnosis was determined, blood collection was carried out to discover serum levels of markers analyzed (i.e. HE4 and CA125). The exclusion criterion was the presence of another malignancy. Also, the patients included were not treated for benign non-gynecologic and gynecologic comorbidities associated with elevated HE4 and CA125 levels (e.g. liver, kidney or autoimmune diseases, endometriosis, pelvic infection, benign ovarian tumor). All analyzed patients underwent a definitive surgical treatment: hysterectomy, bilateral salpingo-oophorectomy, aortopelvic lymphadenectomy and excisions of suspicious lesions and adhesions of the peritoneal cavity. The low-risk type of the disease with the presence of all five prognostic factors simultaneously (myometrial invasion < 50%, tumor diameter < 2 cm, no cervical stromal involvement, tumor grade 1 or 2, and the absence of extrauterine disease) occurred in 56 (49%) patients. The high-risk type of the disease with the absence of at least one of the aforementioned factors occurred in 59 (51%) patients.

Data analysis

Where applicable, it was determined first whether the variable presented a normal distribution using the Shapiro–Wilk test, and in cases of skewed variables, logarithmic transformation was performed and the normal distribution was tested again. For descriptive purposes, mean values are presented using untransformed values. Results are expressed as mean values and standard deviations unless otherwise stated.

Similarly, when data displayed normal distribution, the *t*-test was used for the comparison of the groups; otherwise the Mann–Whitney *U*-test was preferred.

To identify variables that may contribute to predicting the final investigated phenotype, we carried out a backward stepwise logistic regression, a sequential procedure of omitting one input variable at a time to build up a regression model in which the dependent variable is represented as the linear combination of independent variables (anthropometric parameters). These models implemented log-transformed values of HE4 and are based on the statistical evaluation of the models of the maximum specificity and sensitivity using the individual cut-offs for evaluated prognostic markers. The results of the final models are presented. In the final model, proper adjustments were made to address the possible effect of age, obesity, coronary artery disease, hypertension and diabetes. In the multivariate modeling, only hypertension expressed a borderline significant association with HE4 levels, hence only hypertension was retained in the final model.

The data analysis was performed using R 2.15.2. The consensual values of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Individual prognostic factors, including medians and ranges of HE4 and CA125 serum levels related to these factors, are listed in Table 1. An increase in the median with a higher stage of the disease is evident with CA125, and the same applies to HE4 with the exception of stages III and IV. On the basis of surgical staging, 69 (60.0%) patients were included in stage IA, 20 (17.5%) patients in stage IB, eight (7.0%) patients in stage II, 13 (11.0%) patients in stage III and five (4.5%) patients in stage IV. Table 1, furthermore, evaluates the median and range of HE4 and CA125 serum levels according to the depth of invasion. According to the results, we can state that there is a gradual increase with an increasing depth of the invasion in the case of HE4. A greater increase in the median is evident only in the serosa infiltration in the case of CA125. The prognostically least favorable type of differentiation, that is, a poorly differentiated variant, is associated with higher serum levels of both biomarkers investigated. Table 1 also presents the median and range of CA125 and HE4 serum levels in relation to the type of risk of malignancy. The high-risk variant of the disease is in each case associated with higher serum concentrations of biomarkers. Results obtained were subjected to statistical analysis.

Tables 2 and 3 indicate statistical evaluation of CA125 and HE4 serum levels between individual stages of the

Table 1 Median HE4 and CA125 serum levels in relation to prognostic factors, including 2009 FIGO stage

Prognostic Factor 2009 FIGO stage	No. patients (%)	Median HE4 (range), pmol/L	Median CA125 (range), IU/mL
IA	69 (60.0)	63.0 (29.0–379.0)	18.0 (5.0–91.0)
IB	20 (17.5)	86.0 (42.0–350.0)	24.0 (11.0–70.0)
II	8 (7.0)	118.0 (54.0–330.0)	29.0 (10.0–126.0)
III	13 (11.0)	198.0 (55.0–1014.0)	41.0 (13.0–620.0)
IV	5 (4.5)	193.0 (68.0–364.0)	180.0 (18.0–1056.0)
Depth of invasion			
Endometrium	9 (8.0)	55.0 (32.0–126.0)	26.0 (9.0–91.0)
Myometrium 1–49%	67 (58.0)	70.0 (29.0–379.0)	19.0 (5.0–1056.0)
Myometrium ≥ 50%	26 (22.5)	113.5 (42.0–504.0)	24.5 (11.0–620.0)
Infiltration into serosa	13 (11.5)	198.0 (55.0–1014.0)	41.0 (13.0–344.0)
Tumor grade			
G1	16 (14.0)	60.0 (32.0–233.0)	18.5 (10.0–70.0)
G2	67 (58.0)	70.0 (29.0–558.0)	20.0 (5.0–620.0)
G3	32 (28.0)	121.0 (49.0–1014.0)	29.5 (10.0–1056.0)
Risk status of disease			
Low risk	56 (49.0)	60.0 (29.0–379.0)	17.5 (5.0–91.0)
High risk	59 (51.0)	109.0 (42.0–1014.0)	26.0 (10.0–1056.0)

CA, cancer antigen, HE4, human epididymis protein 4.

Table 2 Comparison of stage IA versus all other stages and their combinations for HE4

	2009 FIGO stage comparisons	No. patients	Cut-off HE4 (pmol/L)	No. patients (%) with HE4 > cut-off	Pearson χ^2 P
Highest sensitivity and specificity	IA	69	78.0	22 (32.0)	–
	IA	69	110.0	9 (13.0)	–
	IB	20	78.0	14 (70.0)	0.0051212*
	IB-II	28	78.0	14 (50.0)	0.0051223*
	IB-III	41	110.0	24 (59.0)	0.0000014*
	IB-IV	46	110.0	28 (61.0)	0.0000103*
Given 95% specificity	IA	69	238.5	4 (6.0)	–
	IB	20	238.5	2 (10.0)	0.8779
	IB-II	28	238.5	3 (11.0)	0.6781
	IB-III	41	238.5	9 (22.0)	0.0256*
	IB-IV	46	238.5	11 (24.0)	0.0110*

*Statistically significant result. HE4, human epididymis protein 4.

Table 3 Comparison of stage IA versus all other stages and their combinations for CA125

	2009 FIGO stage comparisons	No. patients	Cut-off CA125 (IU/mL)	No. patients (%) with HE4 > cut-off	Pearson χ^2 P
Highest sensitivity and specificity	IA	69	17.0	41 (59.0)	–
	IA	69	30.5	9 (13.0)	–
	IB	20	17.0	16 (80.0)	0.15440
	IB-II	28	17.0	18 (64.0)	0.05254
	IB-III	41	30.5	22 (54.0)	0.00185*
	IB-IV	46	30.5	24 (52.0)	0.00001*
Given 95% specificity	IA	69	43.0	4 (6.0)	–
	IB	20	43.0	4 (20.0)	0.13070
	IB-II	28	43.0	7 (25.0)	0.01880*
	IB-III	41	43.0	13 (32.0)	0.00077*
	IB-IV	46	43.0	17 (37.0)	0.00007*

*Statistically significant result. CA, cancer antigen.

disease and their combinations according to FIGO 2009 with the aim of achieving the highest sum of sensitivity and specificity and for 95% specificity. With regard to the distribution of serum levels of both markers in the analyzed sample, it was not possible to determine one cut-off value for the model of the maximum sum of sensitivity and specificity, but two values were generated. HE4 serum concentrations higher than 78.0 pmol/L occurred significantly less often with patients in stage IA than with patients in stage IB or with the combination of stages IB and II. When comparing HE4 serum concentrations in stage IA with the combinations of stages IB-III and IB-IV, the cut-off 110.0 pmol/L, with respect to the distribution of serum levels in the whole sample, was used. For 95% specificity, the HE4 cut-off reaches the value 238.5 pmol/L. There was no statistically significant difference among patients in stages IA and IB, respectively IA and the combination of stages IB and II. The difference was found only when comparing stage IA with the combination of stages IB-III, respectively IB-IV.

Conversely, in the case of CA125, a statistically significant difference for the cut-off 17.0 IU/mL was not detected between patients in stages IA and IB, respectively IA and the combination of stages IB and II. A statistically significant difference was found only when comparing patients in stage IA with patients in stages IB-III and IB-IV for the cut-off 30.5 IU/mL. For 95% specificity, the cut-off for CA125 reached 43.0 IU/mL. A statistically significant difference was detected only when comparing stages IA with the combination of stages IB-II, IB-III and IB-IV.

Furthermore, a statistically significant difference was found in the distribution of HE4 and CA125 serum levels when comparing groups of patients with tumors that were well and moderately differentiated to patients with tumors poorly differentiated ($P = 0.000254$ for HE4, $P = 0.0357$ for CA125) and also when comparing groups of patients with the low- and high-risk type of the disease ($P = 0.000009$ for HE4, $P = 0.00006$ for CA125).

Tables 4–7 present statistical parameters: sensitivity, specificity, negative predictive value (NPV), positive predictive value (PPV) and area under curve (AUC). These tables show the predictive ability of HE4 and CA125 in distinguishing the stage of the disease, and their combinations according to FIGO 2009 with the model of achieving the maximum sum of sensitivity and specificity and for 95% specificity. From a clinical perspective, it is again particularly important to distinguish mainly stages IA (myometrial invasion < 50%) and IB (myometrial invasion \geq 50%). In Table 4, the cut-off HE4 78.0 pmol/L for the differentiation of stage IA from IB showed sensitivity

Table 4 Predictive value of elevated HE4: Comparison of stage IA versus all other stages and their combinations

	2009 FIGO stage comparisons	Cut-off HE4 (pmol/L)	Sensitivity (95%CI)	Specificity (95%CI)	NPV (95%CI)	PPV (95%CI)	AUC (95%CI)
Highest sensitivity and specificity	IA vs IB	78.0	70.0% (45.7–88.1)	68.1% (55.8–78.8)	88.7% (79.7–94.0)	38.9% (28.9–49.9)	70.1% (57.1–83.1)
	IA vs IB-II	78.0	67.9% (47.7–84.1)	68.1% (55.8–78.8)	83.9% (74.9–90.2)	46.3% (36.0–57.0)	70.4% (58.9–81.9)
	IA vs IB-III	110.0	58.5% (42.1–73.7)	87.0% (76.7–93.9)	77.9% (70.8–83.7)	72.7% (57.9–83.8)	76.2% (66.8–85.6)
	IA vs IB-IV	110.0	60.9% (45.4–74.9)	87.0% (76.7–93.9)	76.9% (69.7–82.9)	75.7% (61.9–85.7)	77.2% (68.4–86.1)
Given 95% specificity	IA vs IB	238.5	10.0% (1.2–31.7)	94.2% (85.8–98.4)	78.3% (75.5–80.9)	33.3% (9.0–71.7)	70.1% (57.1–83.1)
	IA vs IB-II	238.5	10.7% (3.0–28.2)	94.2% (85.8–98.4)	72.2% (69.3–75.0)	42.9% (15.2–75.8)	70.4% (58.9–81.9)
	IA vs IB-III	238.5	22.0% (10.6–37.6)	94.2% (85.8–98.4)	67.0% (63.1–70.7)	69.2% (42.5–87.3)	76.2% (66.8–85.6)
	IA vs IB-IV	238.5	23.9% (12.6–38.8)	94.2% (85.8–98.4)	65.0% (61.0–68.8)	73.3% (48.2–89.0)	77.2% (68.4–86.1)

AUC, area under curve; CI, confidence interval; HE4, human epididymis protein 4; NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value.

Table 5 Predictive value of elevated CA125: Comparison of stage IA versus all other stages and their combinations

2009 FIGO stage comparisons	Cut-off CA125 (IU/mL)	Sensitivity (95%CI)	Specificity (95%CI)	NPV (95%CI)	PPV (95%CI)	AUC (95%CI)
Highest sensitivity and specificity						
IA vs IB	17.0	80.0% (56.3–94.3)	40.6% (28.9–53.1)	87.5% (76.4–94.6)	28.1% (23.4–34.4)	61.4% (46.5–76.4)
IA vs IB-II	17.0	57.1% (37.2–75.5)	66.7% (54.3–77.6)	79.3% (72.3–85.8)	41.0% (32.1–52.5)	62.8% (49.5–76.0)
IA vs IB-III	30.5	65.9% (49.4–79.9)	66.7% (54.3–77.6)	76.7% (69.1–83.8)	54.0% (45.6–63.7)	69.6% (58.7–80.4)
IA vs IB-IV	30.5	52.2% (36.9–67.1)	87.0% (76.7–93.9)	73.2% (67.7–78.9)	72.7% (60.3–83.9)	71.8% (61.6–81.9)
Given 95% specificity						
IA vs IB	43.0	20.0% (5.7–43.7)	94.2% (85.8–98.4)	80.2% (77.1–83.6)	50.0% (25.2–78.5)	61.4% (46.5–76.4)
IA vs IB-II	43.0	25.0% (10.7–44.9)	94.2% (85.8–98.4)	75.6% (72.0–79.4)	63.6% (40.1–84.6)	62.8% (49.5–76.0)
IA vs IB-III	43.0	31.7% (18.1–48.1)	94.2% (85.8–98.4)	69.9% (65.9–74.2)	76.5% (57.3–90.3)	69.6% (58.7–80.4)
IA vs IB-IV	43.0	37.0% (23.2–52.5)	94.2% (85.8–98.4)	69.1% (64.9–73.8)	81.0% (64.3–92.2)	71.8% (61.6–81.9)

AUC, area under curve; CA, cancer antigen; CI, confidence interval; NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value.

Table 6 Predictive value of elevated HE4 in relation to risk status of disease

Risk status of disease comparison (low vs high risk)	Cut-off HE4 (pmol/L)	Sensitivity (95%CI)	Specificity (95%CI)	NPV (95%CI)	PPV (95%CI)	AUC (95%CI)
Highest sensitivity and specificity	76.5	72.4% (59.1–83.3)	75.4% (62.2–82.9)	72.9% (63.3–80.7)	75.0% (64.9–82.9)	77.0% (68.4–85.6)
Given 95% specificity	242.0	19.0% (9.9–31.4)	94.7% (85.4–98.9)	53.5% (50.0–56.9)	78.6% (51.9–92.6)	77.0% (68.4–85.6)

AUC, area under curve; CI, confidence interval; HE4, human epididymis protein 4; NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value.

Table 7 Predictive value of elevated CA125 in relation to risk status of disease

Risk status of disease comparison (low vs high risk)	Cut-off CA125 (IU/mL)	Sensitivity (95%CI)	Specificity (95%CI)	NPV (95%CI)	PPV (95%CI)	AUC (95%CI)
Highest sensitivity and specificity	24.0	62.7% (49.1–75.0)	69.6% (55.9–81.2)	63.9% (56.4–72.0)	68.5% (60.0–77.2)	70.7% (61.2–80.2)
Given 95% specificity	43.0	30.5% (19.2–43.9)	94.7% (85.1–98.9)	56.4% (52.6–60.8)	85.7% (69.3–95.1)	70.7% (61.2–80.2)

AUC, area under curve; CA, cancer antigen; CI, confidence interval; NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value.

70.0%, specificity 68.1%, NPV 88.7%, PPV 38.9% and AUC 70.1% for the model of achieving the maximum sum of sensitivity and specificity. Sensitivity dramatically decreased with 95% specificity for the cut-off HE4 238.5 pmol/L for distinguishing stages IA and IB. In Table 5, the cut-off CA125 17.0 IU/mL for the differentiation of stage IA from IB showed sensitivity 80.0%, specificity 40.6%, NPV 87.5%, PPV 28.1% and AUC 61.4% for the model of achieving the maximum sum of sensitivity and specificity. There is also a significant decrease in sensitivity with 95% specificity for the cut-off CA125 30.5 IU/mL for distinguishing stages IA and IB.

Another model of statistical comparisons concerns groups of patients running low and high risk, which can be considered the most important in the preoperative algorithm in terms of deciding on the extent of surgical staging, particularly in relation to the implementation of systematic aortopelvic lymphadenectomy. Classification into these two basic groups is conditioned by the knowledge of the combination of information on the postoperative TNM classification and the degree of the tumor grade. Two logistic regression models were again created: for the maximum sum of sensitivity and specificity and for 95% specificity. The cut-off HE4 76.5 pmol/L for the differentiation of these two levels showed sensitivity 72.4%, specificity 75.4%, NPV 72.9%, PPV 75.0% and AUC 77.0% for the model of achieving the maximum sum of sensitivity and specificity. There was a particularly dramatic decrease in sensitivity (Table 6) for 95% specificity with the cut-off HE4 242 pmol/L. With the CA125 marker, the cut-off 24.0 IU/mL for the differentiation of these two levels showed a sensitivity of 62.7%, a specificity of 69.6%, NPV of 63.9%, PPV of 68.0% and AUC of 70.7% for an identical logistic regression model. There was a significant decrease in sensitivity (Table 7) for 95% specificity for the cut-off CA125 43.0 IU/mL.

Discussion

These days, imaging methods (ultrasound, magnetic resonance imaging [MRI], computed tomography [CT], and positron emission tomography [PET]-CT) are often used in determining the prognosis of patients with endometrial cancer. The differentiation of low-risk patients from the high-risk ones is based on two basic parameters, the stage of the disease and the tumor grade, whereas only histological evidence from a diagnostic endometrial biopsy is available at the time of decision-making. The determination of tumor grade from

endometrial biopsy is not accurate and in accordance with current data, a worse grade is detected even in 15–30% of definitive histological findings.^{7,8}

The assessment of tumor grade by imaging methods, mentioned in the previously published reports, concerns ultrasound diagnostics only and takes into account both echogenicity and tumor vascular morphology and is usually directly related to the assessment of myometrial invasion and cervical stromal involvement.^{9–11}

Significantly more of the published work sources focus on evaluating the stage of the disease.^{12–24} Published studies comparing transvaginal ultrasound (TVS), MRI, and possibly PET-CT in the diagnosis of myometrial invasion and cervical stromal involvement do not lead to entirely consensual conclusions.

In the study by Antonsen *et al.*,¹² 318 patients with endometrial cancer were evaluated by comparing PET-CT, MRI and ultrasound. The authors found PET-CT, MRI and ultrasound to be comparable in predicting myometrial invasion (overall diagnostic accuracy for PET/CT was 61%, for MRI 66% and for TVS 72%). The two following studies found no statistically significant difference between TVS and MRI when assessing myometrial invasion.^{13,14} In the study by Ozdemir *et al.*,¹³ 64 patients were evaluated while Savelli *et al.*¹⁴ analyzed 74 patients. According to Savelli *et al.*, overall diagnostic accuracy for TVS in the evaluation of myometrial infiltration was 84%, and the respective value for MRI was 82%. Conversely, Örtoft *et al.*¹⁵ showed a significantly higher specificity for MRI in comparison with ultrasound for the sample of 156 patients. Deep myometrial invasion was estimated with higher accuracy by MRI (82%) than TVS (74%) ($P < 0.02$).

Other studies evaluated the benefit of these two imaging methods in predicting cervical stromal invasion.^{15,16} Celik *et al.*¹⁶ (who analyzed 64 patients) and Örtoft *et al.*¹⁵ found no statistically significant difference between these two methods. Örtoft *et al.* reported similar accuracy for MRI (84%) and TVS (80%) for the sample of 156 patients. Savelli *et al.*¹⁴ showed that ultrasound (with sensitivity of 93% and specificity of 92%) was slightly superior to MRI (with sensitivity of 79% and specificity of 87%). In contrast, Cicinelli *et al.*¹⁷ preferred MRI.

Other authors evaluate the benefit of only MRI in the preoperative determination of myometrial invasion with different results.^{18–20} Horvath *et al.*¹⁸ analyzed 89 patients, and they found the sensitivity of detection of deep myometrial infiltration to be 71%, specificity 92% and accuracy 84%. Hwang *et al.*¹⁹ analyzed 53 patients and stated that MRI is limited in its ability to detect deep

myometrial invasion with respect to the results (sensitivity, specificity, and overall diagnostic accuracy were 50.0%, 89.7% and 79.2%, respectively). Conversely, Zamani *et al.*²⁰ reported higher sensitivity (82.4%), specificity (94.6%) and diagnostic accuracy (90.7%) in the sample of 54 patients.

Especially in the European area, many investigators recently reached a consensus.²¹ Ultrasound is suggested to be the method of first choice for evaluation of myometrial invasion and cervical stromal involvement because it is widely available, most cost-effective and least time-consuming. It is also generally recommended that MRI will be reserved for cases that are difficult to assess with ultrasound.

The limitations of the imaging methods in the staging of endometrial cancer are valid for the regional lymph area, too. While TVS and MRI play a decisive role in assessing myometrial invasion and cervical stromal involvement, CT and PET-CT are more significantly used in the assessment of lymph node involvement. According to the current published data, it is believed that PET-CT, CT and MRI show similar accuracy in detecting metastatic lymph nodes.^{12,22,23}

According to Loubeyre *et al.*,²⁴ in spite of the significant development of imaging methods in the last 25 years, an accurate non-invasive assessment of metastatic lymph nodes in patients with endometrial cancer remains an unmet medical need, because the sensitivity of CT and MRI is limited in these cases.

Thus, the current effort to identify sensitive biochemical markers useful for the diagnosis and prognosis of patients with endometrial cancer seems to be logical. The endeavor to search for new algorithms for an efficient use of biomarkers and of their combinations continues. However, it can be said that the clinical relevance of these biomarkers still remains limited. Recent studies have focused on conventional tumor markers, such as CA125 and CA19-9,²⁵ and more recent parameters (e.g. apolipoprotein-1, prealbumin, transferrin,²⁶ prolaktin,²⁷ and soluble mesothelin-related peptides).²⁸ These studies analyzed serum levels of biomarkers especially. The HE4 serum level interferes with some of the factors in analyses performed. These factors can further modify criteria for the use of HE4 in clinical practice. Higher serum concentrations can be expected, for example in connection with older age (>55 years), smoking and decline in renal function or liver disease. On the contrary, one study described a decrease in HE4 level in connection with obesity.^{29–31} The others sources for the analysis are in HE4, for example tissue microarrays, where the expression of the proteins is tested by immunohistochemistry.^{6,32}

In the case of HE4, the articles published so far focus their attention on, for example, the importance of HE4 in the diagnosis of endometrial cancer in comparison with CA125.^{33,34} Another view of the use of HE4 is raised by studies dealing with a prognostic significance of HE4 serum levels before treatment with respect to overall survival (OS) and disease-free survival compared with CA125. According to Mutz-Dehbalaiie *et al.*,³⁴ only HE4 was an independent prognostic factor for OS in the subgroup with an endometrioid subtype of endometrial cancer. Other studies (Bignotti *et al.*,³² Zanotti *et al.*)³⁵ demonstrated that only HE4 (and not CA125) significantly correlated with decreased OS, progression-free survival and disease-free survival. Saarelainen *et al.*³⁶ dealt with the prediction of pre-treatment HE4 and CA125 serum levels in relation to extrauterine spread of the disease and observed significantly higher levels of markers for metastases and a higher predictive ability of the combination of both markers compared with the isolated use of only one of them. There are also available studies dealing with the evaluation of HE4 serum levels in relation to endometrial cancer prognostic parameters.^{37–39} Moore *et al.*³⁷ analyzed 96 patients with the endometrioid subtype of endometrial cancer, 77% of which were diagnosed in stage I of the disease. For the cut-off 70 pmol/L, Moore observed a sensitivity of 94%, a specificity of 56%, PPV of 39% and NPV of 97% in the differentiation of stages IA and IB, and sensitivity of 82%, specificity of 56%, PPV of 56% and NPV of 82% in the differentiation of stage IA versus stage IB-IV. Kalogera *et al.*³⁸ evaluated 75 patients with endometrial cancer, of whom 51 had the endometrioid histological subtype. Patients with low risk from the group (i.e. myometrial invasion < 50%, primary tumor diameter < 2 cm) had a statistically significantly lower median of the HE4 serum level than other patients. Simultaneously, HE4 showed a greater sensitivity in detecting advanced stages of the disease compared to CA125. The most extensive study to date, by Brennan *et al.*,³⁹ analyzed 375 patients with endometrial cancer (316 with an endometrioid subtype and 280 with low-grade endometrioid subtype) in whom HE4 and CA125 serum analysis was performed. Receiver–operator curve analysis demonstrated that HE4 (AUC 0.76) was a better predictor of outer-half myometrial invasion than CA125 (AUC = 0.65), particularly in patients with low-grade endometrioid tumors (AUC 0.77 vs 0.64 for CA125).

In conclusion, in accordance with the above-mentioned data (including the contribution of different imaging methods), there are still some questions unaddressed in distinguishing low- and high-risk patients

with endometrial carcinoma and there is the need for a diagnostic marker that would be characterized by high sensitivity and specificity parameters, wide availability, low cost and time-effectiveness. The analysis of the level of a biochemical marker that would be determined by analysis of blood or other biological material with exact knowledge of the stage of the disease and tumor grade on the basis of complete surgical staging presents one of the options for finding such a marker. Our study represents a real clinical presentation of endometrioid adenocarcinoma, including a prevailing representation of patients diagnosed in the early stages of the disease. We showed a better correlation of the median and distribution of HE4 serum levels with prognostic factors (compared with CA125) while respecting the fundamental idea of distinguishing patients into groups with low and high risk. The parameters obtained are in a certain correlation with data from studies published in the field. At the same time, it is, however, necessary to state that the results published up to now do not unanimously support the idea of the introduction of HE4 as an independent marker in routine practice. The optimal cut-off for HE4 has not been established yet and further studies are still needed. The results of a more extensive study could establish whether or not it is possible to implement HE4 analysis in clinical practice in the future, hopefully with clear benefits for patient prognosis.

Disclosure

The authors declare that there are no conflicts of interest regarding the publication of this article.

References

1. Dunder P. Histological classification of endometrial cancer. In: Cibula D, Petruzelka L (eds). *Oncogynecology*. Prague: Grada Publishing, 2009; 459–463.
2. Bouchard D, Morriset D, Bourbonnais Y, Tremblay GM. Proteins with whey-acidic-protein motifs and cancer. *Lancet Oncol* 2006; 7: 167–174.
3. Kirchoff C. Molecular characterisation of epididymal proteins. *Rev Reprod* 1998; 3: 86–95.
4. Kirchoff C, Habben I, Ivell R, Krull N. A major human epididymis-specific cDNA encodes a protein with sequence homology to extracellular proteinase inhibitors. *Biol Reprod* 1991; 45: 350–357.
5. Drapkin R, von Horsten HH, Lin Y *et al.* Human epididymis protein 4 (HE4) is a secreted glycoprotein that is overexpressed by serous and endometrioid ovarian carcinomas. *Cancer Res* 2005; 65: 2162–2169.

6. Galgano MT, Hampton GM, Frierson HF. Comprehensive analysis of HE4 expression in normal and malignant human tissues. *Mod Pathol* 2006; **19**: 847–853.
7. Eltabbakh GH, Shamonki J, Mount SL. Surgical stage, final grade and survival of women with endometrial carcinoma whose preoperative endometrial biopsy shows well-differentiated tumors. *Gynecol Oncol* 2005; **99**: 309–312.
8. Leitaó MM Jr, Kehoe S, Barakat RR *et al.* Comparison of D&C and office endometrial biopsy accuracy in patients with FIGO grade 1 endometrial adenocarcinoma. *Gynecol Oncol* 2009; **113**: 105–108.
9. Alcazar J, Pineda L, Juez L *et al.* Usefulness of transvaginal ultrasound in the preoperative evaluation of G1/G2 endometrioid endometrial cancer. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2014; **44** (Suppl. 1): 88–89.
10. Epstein E, Van Holsbecke C, Mascilini F *et al.* Gray-scale and color Doppler ultrasound characteristics of endometrial cancer in relation to stage, grade and tumor size. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2011; **38**: 586–593.
11. Fischerova D, Frühauf F, Zikan M *et al.* Factors affecting sonographic preoperative local staging of endometrial cancer. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2014; **43**: 575–585.
12. Antonsen SL, Jensen LN, Loft A *et al.* MRI, PET/CT and ultrasound in the preoperative staging of endometrial cancer: A multicenter prospective comparative study. *Gynecol Oncol* 2013; **138**: 300–308.
13. Ozdemir S, Celik C, Emlik D *et al.* Assessment of myometrial invasion in endometrial cancer by transvaginal sonography, Doppler ultrasonography, magnetic resonance imaging and frozen section. *Int J Gynecol Cancer* 2009; **19**: 1085–1090.
14. Savelli L, Ceccarini C, Ludovisi M *et al.* Preoperative local staging of endometrial cancer: Transvaginal sonography vs. magnetic resonance imaging. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2008; **31**: 560–566.
15. Örtoft G, Dueholm M, Mathiesen O *et al.* Preoperative staging of endometrial cancer using TVS, MRI, and hysteroscopy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2013; **92**: 536–545.
16. Celik C, Ozdemir S, Kiresi D *et al.* Evaluation of cervical involvement in endometrial cancer by transvaginal sonography, magnetic resonance imaging and frozen section. *J Obstet Gynaecol* 2010; **30**: 302–307.
17. Cicinelli E, Marinaccio M, Barba B *et al.* Reliability of diagnostic fluid hysteroscopy in the assessment of cervical invasion by endometrial carcinoma: A comparative study with transvaginal sonography and MRI. *Gynecol Oncol* 2008; **111**: 55–61.
18. Horvath K, Pete I, Vereczkey I, Dudnyikova A, Gödeny M. Evaluation of the accuracy of preoperative MRI in measuring myometrial infiltration in endometrial carcinoma. *Pathol Oncol Res* 2014; **20**: 327–333.
19. Hwang JH, Lee KW, Lee JK. Magnetic resonance imaging of deep endometrial invasion for patients with endometrial carcinoma. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2009; **49**: 537–541.
20. Zamani F, Goodarzi S, Hallaji F *et al.* Diagnostic value of pelvic MRI for assessment of the depth of myometrial invasion and cervical involvement in endometrial cancer: Comparison of new versus old FIGO staging. *Iran J of Radiol* 2012; **9**: 202–208.
21. Epstein E, Blomqvist L. Imaging in endometrial cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2014; **28**: 721–739.
22. Inubashiri E, Hata K, Kanenishi K *et al.* Positron emission tomography with the glucose analog [18F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose for evaluating pelvic lymph node metastasis in uterine corpus cancer: Comparison with CT and MRI findings. *J Obstet Gynaecol Res* 2009; **35**: 26–34.
23. Park JY, Kim EN, Kim DY *et al.* Comparison of the validity of magnetic resonance imaging and positron emission tomography/computed tomography in the preoperative evaluation of patients with uterine corpus cancer. *Gynecol Oncol* 2008; **108**: 486–492.
24. Loubeyre P, Undurraga M, Bodmer A, Petignat P. Non-invasive modalities for predicting lymph node spread in early stage endometrial cancer? *Surg Oncol* 2011; **20**: e102–e108.
25. Cherchi PL, Dessole S, Ruiu GA *et al.* The value of serum CA124 and association CA125/CA19-9 in endometrial carcinoma. *Eur J Gynecol Oncol* 1999; **20**: 315–317.
26. Farias-Eisner G, Su F, Robbins T, Kotlerman J, Reddy S, Farias-Eisner R. Validation of serum biomarkers for detection of early- and late-stage endometrial cancer. *Am J Obstet Gynecol* 2010; **202**: 73.e1–73.e5.
27. Yurkovetsky Z, Ta'asan S, Skates S *et al.* Development of multimarker panel for early detection of endometrial cancer. High prognostic power of prolactin. *Gynecol Oncol* 2007; **107**: 58–65.
28. Moore RG, Brown AK, Miller MC *et al.* Utility of a novel serum tumor biomarker HE4 in patients with endometrioid adenocarcinoma of the uterus. *Gynecol Oncol* 2008; **110**: 196–201.
29. Bolstad N, Oijordsbakken M, Nustad K, Bjerner J. Human epididymis protein 4 reference limits and natural variation in a Nordic reference population. *Tumour Biol* 2012; **33**: 141–148.
30. Escudero JM, Auge JM, Filella X, Torne A, Pahisa J, Molina R. Comparison of serum human epididymis protein 4 with cancer antigen 125 as a tumor marker in patients with malignant and nonmalignant diseases. *Clin Chem* 2011; **57**: 1534–1544.
31. Nagy B Jr, Krasznai ZT, Balla H *et al.* Elevated human epididymis protein 4 concentrations in chronic kidney disease. *Ann Clin Biochem* 2012; **49**: 377–380.
32. Bignotti E, Ragnoli M, Zanotti L *et al.* Diagnostic and prognostic impact of serum HE4 detection in endometrial carcinoma patients. *Br J Cancer* 2011; **1049**: 1418–1425.
33. Angioli R, Plotti F, Capriglione S *et al.* The role of novel biomarker HE4 in endometrial cancer: A case control prospective study. *Tumour Biol* 2013; **34**: 571–576.
34. Mutz-Dehbalaie I, Egle D, Fessler S *et al.* HE4 is an independent prognostic marker in endometrial cancer patients. *Gynecol Oncol* 2012; **126**: 186–191.
35. Zanotti L, Bignotti E, Calza S *et al.* Human epididymis protein 4 as a serum marker for diagnosis of endometrial carcinoma and prediction of clinical outcome. *Clin Chem Lab Med* 2012; **50**: 2189–2198.
36. Saarelainen SK, Peltonen N, Lehtimäki T, Perheentupa A, Vuoto MH, Mäenpää JU. Predictive value of serum human epididymis protein 4 and cancer antigen 125 concentrations in endometrial carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 2013; **209**: 142.e1–142.e6.
37. Moore RG, Miller MC, Brown AK, Robison K, Steinhoff M, Lambert-Messerlian G. Utility of tumor marker HE4 to predict depth of myometrial invasion in endometrioid adenocarcinoma of the uterus. *Int J Gynecol Cancer* 2011; **21**: 1185–1190.
38. Kalogera E, Scholler B, Powless C *et al.* Correlation of serum HE4 with tumor size and myometrial invasion in endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2012; **124**: 270–275.
39. Brennan DJ, Hackethal A, Metcalf AM *et al.* Serum HE4 as a prognostic marker in endometrial cancer: A population based study. *Gynecol Oncol* 2014; **132**: 159–165.

3.1.2. Minar L, Klabensova I, Jandakova E, Zlamal F, Bienertova-Vasku J. Is human epididymis protein 4 an effective tool for the differential diagnosis of benign and malignant endometrial tumours? (2016). *European Journal of Gynaecological Oncology*, 37(5), pp. 617-622.

Is human epididymis protein 4 an effective tool for the differential diagnosis of benign and malignant endometrial tumours?

L. Minar¹, I. Klabenesova², E. Jandakova³, F. Zlamal⁴, J. Bienertova-Vasku⁴

¹ Department of Obstetrics and Gynaecology, Faculty of Medicine, Masaryk University Brno and University Hospital Brno, Brno

² Department of Biochemistry, University Hospital Brno, Brno; ³ Department of Pathology, University Hospital Brno, Brno

⁴ Department of Pathological Physiology, Faculty of Medicine, Masaryk University Brno, Brno (Czech Republic)

Summary

Purpose of investigation: This study was designed to evaluate the use of human epididymis protein 4 (HE4) as a biomarker in the differential diagnosis of malignant and benign endometrial tumours. **Materials and Methods:** The study, conducted between July 2009 and June 2014, included a total of 150 patients with endometrioid adenocarcinoma and a control group of 150 patients with benign endometrial lesions. The serum of all patients was analyzed with respect to HE4 and CA125 levels. The median and ranges of serum levels were determined in relation to histological results. The statistical analysis procedure employed in this study utilized logarithmic-transformed values of biomarkers and logistic regression. **Results:** An analysis of two groups of patients with different histologies yielded a statistically significant difference (p -value < 0.05) only in the case of HE4, in which case a cut-off value of 48.5 pmol/l resulted in an achieved sensitivity of 87.8%, a specificity of 56.6%, and a negative predictive value of 81.1%. **Conclusion:** In combination with clinical and ultrasound findings, HE4 could help with the differentiation of prognostically varied patient groups as well as with the decision-making process associated with the development of individual treatment plans. However, the optimal cut-off for HE4 has not been established yet and further studies are needed.

Key words: Benign endometrial tumours; Endometrial cancer; Human epididymis protein 4.

Introduction

Endometrial cancer is the most common malignancy of the female genital tract in the world and the seventh most common cause of cancer-related death in women in Western and Central Europe [1]. Prognosis for this group of gynaecological malignancies is relatively favourable, as long as they are diagnosed in the first stage, which is currently the case in almost 75% of patients [2]. The endometrioid histological type of endometrial cancer is the prevalent type of this malignancy (over 75% of all diagnosed cases) [3].

Despite relatively favourable prognosis, research has focused on the detection of a marker for efficient and economical screening and for early disease diagnosis. Such a marker could benefit women at increased risk (e.g. breast cancer patients treated with tamoxifen, women suffering from Lynch syndrome or patients with a positive BRCA1 mutation test result), as well as high-risk surgical patients (i.e. with potential complications due to internal co-morbidities).

Human epididymis protein 4 (HE4) is a biochemical marker used in the diagnosis and follow-up of ovarian can-

cer. Its diagnostic and treatment-predictive value for endometrial cancer is currently being examined. HE4 belongs to a group of proteins known as whey acidic four-disulfide core proteins (WFCD) and exhibits properties similar to trypsin inhibitor [4]. The protein has a molecular weight of 20–25 kDa in advanced glycosylated form and consists of a peptide chain consisting of two WFCD domains [5]. HE4 production has been detected primarily in the epithelium of the distal epididymis and it is assumed that, as a protease inhibitor, it is involved in immune processes and also affects sperm maturation [6, 7]. It has also been established that HE4 is expressed in many tissues, with the highest expression occurring in malignantly transformed epithelial tissues such as ovarian tissue (serous or endometrioid adenocarcinoma), as well as some types of endometrial adenocarcinomas, especially endometrioid and lung cancer [8–10].

Materials and Methods

Two sets of patients were employed in order to examine the role of the HE4 marker in the differential diagnosis of endometrial tumours between July 2009 and June 2014. The first group consisted

Revised manuscript accepted for publication May 20, 2015

of 150 patients diagnosed with endometrial carcinoma, i.e. its endometrioid subtype. The second group comprised a control group of patients with benign lesions of the endometrium. All 150 patients in this group underwent an endometrial biopsy simultaneously with the members of the first group; in the case of the control group, this procedure excluded the existence of precancerous conditions or malignant findings. Biopsy indications included clinical symptoms (i.e. irregular premenopausal, perimenopausal or postmenopausal bleeding) or suspected ultrasound findings (i.e. suspected endometrial hyperplasia in postmenopausal women or a suspected endometrial polyp). The average age of patients with malignant findings was 65.6 years (40–87) while the average age of women with benign findings stood at 61.8 years (43–81).

Histopathological diagnosis was established on the basis of endometrial curettage or hysteroscopy; diagnosis was followed by blood sampling designed to determine HE4 and CA125 serum levels. Serum samples were separated by centrifugation and immediately processed. In case processing within a 24-hour period was not possible, collected samples were frozen and stored at -80°C until concentration analysis, subsequently performed on an Architect 1000 chemiluminiscent immunoassay analyzer. Exclusion criteria for inclusion in either of the two groups included the presence of other malignant diseases; none of the patients were treated for benign gynecological diseases (endometriosis, pelvic infection, benign ovarian tumor, etc.) and non-gynecological comorbidities (e.g. liver or autoimmune diseases) associated with elevated CA125 and for benign co-morbidities associated with elevated HE4 (e.g. kidney and liver diseases). All patients included in the malignancy cohort underwent definitive surgical treatment – hysterectomy, bilateral salpingo-oophorectomy, aortopelvic lymphadenectomy, and excisions of suspicious lesions and adhesions of the peritoneal cavity.

Data analysis

In patient groups used in this study, histological findings are always defined by a range of CA125 and HE4 serum levels, assessed according to a median rather than a mean. The median is used to describe selected characteristics instead of an arithmetic mean, especially as the distribution of both biomarkers is not normal (i.e. it is skewed heavily to the right). Using a mean would not be correct in such circumstances as such an approach would be too dependent on extreme values. A logarithmic transformation of HE4 and CA125 levels was carried out for statistical evaluation purposes in order to achieve a normal distribution of both biomarkers. A two-sample *t*-test was used and a *p*-value was determined. Associations with a *p*-value < 0.05 were considered significant. Logistic regression models developed for subsequent statistical assessment were designed to operate with two identified cut-off values, i.e. highest sensitivity and specificity and a given specificity of 95 %.

Results

The distribution of patients with endometrioid adenocarcinoma according to the FIGO 2009 staging is presented in Table 1.

A low-risk form of the disease, complete with all five prognostic factors (i.e. myometrial invasion < 50%, tumour diameter ≤ two cm, no cervical involvement, tumour grade 1 or 2, and the absence of the extrauterine disease) was established in the case of 73 patients (i.e. 49 %). A high-risk form of the disease where at least one of these factors was

Table 1. — Distribution of patients with endometrioid adenocarcinoma including median serum HE4 levels according to FIGO 2009 staging.

FIGO 2009 Stage	N (%)	Median HE4 (range) (pmol/l)
IA	90 (60.0)	63.0 (29.0–379.0)
IB	26 (17.5)	86.0 (42.0–350.0)
II	10 (6.5)	118.0 (54.0–330.0)
III	17 (11.5)	198.0 (55.0–1014.0)
IV	7 (4.5)	193.0 (68.0–364.0)

FIGO = International Federation of Gynaecology and Obstetrics.

Table 2. — Median CA125 and HE4 serum levels in relation to histology.

Histology	N (%)	Median CA125 (range) / IU/ml	Median HE4 (range) / pmol/l
Benign	150	23.0 (5.0–140.0)	45.0 (7.0–185.0)
Malignant (Stage I-II)	126	20.0 (5.0–126.0)	70.0 (29.0–379.0)
Malignant (Stage I-IV)	150	21.0 (5.0–1056.0)	74.0 (29.0–1014.0)

Table 3. — HE4 serum level in relation to histology – *t*-test.

Histology	<i>p</i> (HE4)
Benign vs. malignant (Stage I-II)	<i>p</i> < 0.001*
Benign vs. malignant (Stage I-IV)	<i>p</i> < 0.001*

*statistically significant result.

absent was established in the case of 77 patients (i.e. 51%).

Table 2 presents the median and range of CA125 and HE4 serum concentrations in three sets: patients with benign lesions, endometrial adenocarcinoma patients suffering from the first two stages of the disease (prevalent both in this study and in general clinical practice), and all patients with malignancies. In the case of CA125, the benign group median was quite paradoxically higher, while an increase in the malignant group median was registered in the case of HE4.

Biomarker serum concentrations were subsequently subjected to statistical analysis in accordance with individual histological findings. In order to compare CA125 and HE4 serum levels between groups of women with malignancies and those with benign tumours, a *t*-test of logarithmic-transformed values of the analyzed markers was performed. A statistically significant difference was established only in the case of HE4 and not in the case of CA125 (Table 3).

A logistic regression model was developed for further evaluation in which CA125 and HE4 were included as independent variables and histological findings were included as the dependent variable. CA125 was found to be insignificant in both models (i.e. benign findings vs. all stages of malignancy as well as benign vs. malignant Stage I and II findings), and the final models were thus created

Table 4. — Logistic regression model – predictive value of HE4 in differentiation histology (benign vs. malignant, Stage I–IV).

Histology comparison (benign vs. malignant, Stage I–IV)	Cut off HE4 (pmol/l)	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	NPV (95% CI)	PPV (95% CI)	AUC (95% CI)
Highest sensitivity and specificity	48.5	87.8 % (80.4–93.2)	56.6 % (46.6–66.2)	81.1 % (73.5–87.8)	68.7 % (64.5–73.4)	76.9 % (71.2–83.3)
Given 95% specificity	99.0	37.4% (28.6–46.9)	93.4% (86.9–97.3)	57.9% (54.8–61.5)	86.0% (76.5–92.9)	76.9% (71.2–83.3)

CI = confidence interval; NPV = negative predictive value; PPV = positive predictive value, AUC = area under curve.

Table 5. — Logistic regression model – predictive value of HE4 in differentiation histology (benign vs. malignant, Stage I–II).

Histology comparison (benign vs. malignant, Stage I–II)	Cut off HE4 (pmol/l)	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	NPV (95% CI)	PPV (95% CI)	AUC (95% CI)
Highest sensitivity and specificity	48.5	85.6% (77.0–91.9)	56.6% (46.6–66.2)	81.1% (73.6–87.7)	64.3% (59.8–69.5)	73.6% (67.3–80.7)
Given 95% specificity	99.0	28.9% (20.1–39.0)	93.4% (86.9–93.0)	58.9% (56.1–62.2)	80.0% (67.5–89.7)	73.6% (67.3–80.7)

CI = confidence interval; NPV = negative predictive value; PPV = positive predictive value, AUC = area under curve.

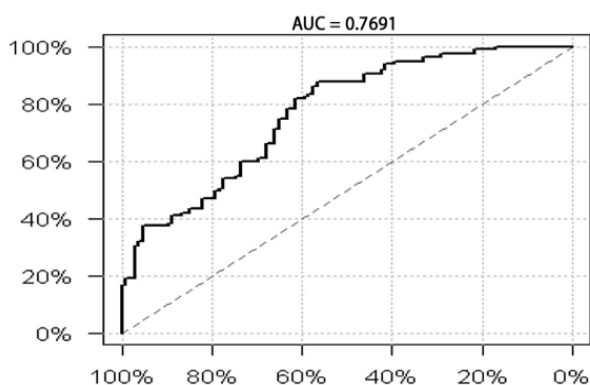


Figure 1. — ROC curve for differentiation between benign and malignant (Stage I–IV) disease.

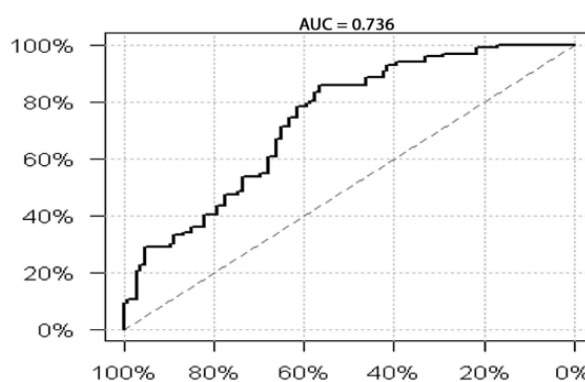


Figure 2. — ROC curve for differentiation between benign and malignant (Stage I–II) disease.

with a single independent variable, i.e. the logarithmic-transformed values of HE4.

Table 4 shows the predictive value of HE4 in the differential diagnosis of endometrial lesions using models for achieving the highest sum of sensitivity and specificity and at a specificity of 95 %; a ROC curve is provided in Figure 1. The model for achieving the highest sum of sensitivity and specificity produced a HE4 cut-off value of 48.5 pmol/l for this differentiation, with a sensitivity of 87.8%, specificity of 56.6%, negative predictive value (NPV) of 81.1%, positive predictive value (PPV) of 68.7%, and AUC of 76.9 %.

Table 5 shows the predictive value of HE4 in the differential diagnosis of benign endometrial lesions and Stage I and II malignancies, likewise using models for achieving the highest sum of sensitivity and specificity and at a specificity of 95%; a ROC curve is provided in Figure 2. The model for achieving the highest sum of sensitivity and

specificity produced a HE4 cut-off value of 48.5 pmol/l for this differentiation, with a sensitivity of 85.6%, specificity of 56.6%, NPV of 81.1%, PPV of 64.3%, and AUC of 73.6 %.

Discussion

A number of studies aimed at identifying sensitive biochemical markers useful for the diagnosis and prognosis of patients with endometrial cancer have been published. Although efforts dedicated to the search of new algorithms for the efficient use of biomarkers or a combination thereof are ongoing, it may be said that their clinical benefits remain limited. The object of these studies generally include tumour markers such as antigens – CA125 [11, 12], CA19-9 [13], CEA, and new parameters such as apolipoprotein-1, prealbumin, transferrin [14], prolactin [15], serum amyloid-A [16] or soluble mesothelin related peptides (SMRP) [17].

In the past several years, a range of works have focused on the potential utilization of HE4 in the above context. To some extent, this marker has already established itself in the diagnosis and follow-up of some ovarian cancer histotypes by way of the so-called ROMA (risk of ovarian malignancy algorithm) index, which processes logarithmic-transformed HE4 and CA125 levels and reflects the current status of menopausal patients [18]. The first author to connect the question of clinical utility of HE4 and the issue of endometrial cancer was Moore *et al.* [18] and while subsequent works by others gradually emerged, most were usually limited to an examination of the diagnostic superiority of HE4 in comparison with the more conventional CA125 marker. Most of Moore's studies generally note the elevation of the biomarker for all stages of the disease and point out a greater sensitivity with respect to the detection of its early stages in comparison with CA125. At a specificity of 95%, HE4 sensitivity stands at 45.5% and CA125 sensitivity stands at 24.6%, regardless of disease stage; in Stage I, HE4 exhibits a sensitivity of approximately 17% higher than CA125 [17]. According to Omer *et al.*, who examined HE4 in a group of 64 patients with endometrial cancer and a control group of 60 patients with benign tumours, a cut-off of 59.7 pmol/l provided a sensitivity of 75% at a specificity of 65.5% [16]. Recent research into HE4 conducted by Angioli *et al.* examined two cut-off values, i.e. 70 and 150 pmol/l; at a specificity of 100%, the achieved sensitivity stood at 59.4% and 35.6%, respectively. In the case of CA125, a cut-off of 35 IU/ml and a specificity of 62.14% resulted in a sensitivity of 19.8% [19]. A study by Zanotti *et al.* analyzed 195 patients with endometrial cancer and a control group of 125 healthy women. HE4 serum concentrations in patients with malignancies were found to be significantly higher regardless of the stage and grade of the tumour in comparison with healthy controls. In the case of a given specificity of 95%, HE4 exhibited a higher sensitivity regarding the detection of endometrial cancer, namely 66%, while CA125 sensitivity stood at 35% [20].

The present study, which compared two histologically different groups, highlights a significant difference ($p < 0.001$) in median HE4 serum levels, i.e. 45 pmol/l in patients with benign tumours and 74 pmol/l in patients with malignancies. By contrast, CA125 median values (paradoxically slightly higher for women with benign tumours at 23 IU/l and 21 IU/l in the case of patients with malignancies) is statistically insignificant ($p = 0.939$). On logistic regression, CA125 was determined as insignificant in terms of differentiation between benign and malignant lesions, while HE4 – at a cut-off value of 48.5 pmol/l – reached a sensitivity of 87.8%, specificity 56.6%, and negative predictive value of 81.1%, with an AUC value of 0.769 according to the ROC curve. As comparisons of initial stages are prevalent in current clinical practice, this study focused on a comparison of a group of women with benign tumours and patients with endometrial cancer

in Stages I and II, employing logistic regression to examine CA125, which also proved to be insignificant in terms of differentiation between benign and malignant lesions, and HE4, which – at a cut-off of 48.5 pmol/l – reached a sensitivity of 85.6% and positive predictive value of 64.3%, with an AUC value of 0.736 according to the ROC curve.

Conclusion

The set of malignancies examined here includes a dominant histological subtype of endometrial cancer while also relatively accurately representing the real clinical presentation of endometrioid adenocarcinoma, including a prevailing representation of patients diagnosed in the early stages of the disease.

This study demonstrated the correlation between HE4 serum levels with malignant histology; moreover, a comparison with CA125 indicated that HE4 is statistically significant with respect to the differential diagnosis of benign and malignant lesions of the endometrium.

The diagnostic benefits of HE4 could be considered especially in the case of patients at increased risk of endometrial cancer as well as in the case of patients with serious internal co-morbidities. In combination with clinical and ultrasound findings, HE4 could help with the differentiation of prognostically varied patient groups as well as with the decision-making process associated with the development of individual treatment plans.

However, the optimal cut-off for HE4 has not been established yet and further studies are needed. The results of more an extensive study could establish whether or not it is possible to implement HE4 analysis in routine clinical practice in the future, hopefully with clear benefits for patient diagnosis, prognosis, and follow-up.

References

- [1] Ferlay J., Shin H.R., Bray F., Norman D., Mathers C., Parkin D.M.: "Globocan 2012 v1.1, cancer incidence and mortality worldwide: IARC cancerbase no. 10". Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2012. Available at: <http://globocan-iarc.fr>.
- [2] DiSaia P.J., Creasman W.T.: (eds). *Clinical gynaecologic oncology*. 7th ed. Philadelphia: Mosby, 2007, 812.
- [3] Dunder P.: "Histological classification of endometrial cancer". In: Cibula D., Petruzelka L. (eds). *Oncogynecology*. Prague: Grada Publishing, 2009, 459.
- [4] Bouchard D., Morriset D., Bourbonnais Y., Tremblay G.M.: "Proteins with whey-acidic-protein motifs and cancer". *Lancet Oncol.*, 2006, 7, 167.
- [5] Bingle L., Singleton V., Bingle C.D.: "The putative ovarian tumor marker gene HE4 (WFCD2), is expressed in normal tissues and undergoes complex alternative splicing to yield multiple protein isoforms". *Oncogene*, 2002, 21, 2768.
- [6] Kirchhoff C., Habben I., Ivell R., Krull N.: "A major human epididymis-specific cDNA encodes a protein with sequence homology to extracellular proteinase inhibitors". *Biol. Reprod.*, 1991, 45, 350.
- [7] Kirchhoff C.: "Molecular characterisation of epididymal proteins". *Rev. Reprod.*, 1998, 3, 86.
- [8] Galgano M.T., Hampton G.M., Frierson H.F.: "Comprehensive

- analysis of HE4 expression in normal and malignant human tissues". *Mod. Pathol.*, 2006, 19, 847.
- [9] Drapkin R., von Horsten H.H., Lin Y., Mok S.C., Crum Ch.P., Welch W.R., *et al.*: "Human epididymis protein 4 (HE4) is a secreted glycoprotein that is overexpressed by serous and endometrioid ovarian carcinomas". *Cancer Res.*, 2005, 65, 2162.
- [10] Hellström I., Raycraft J., Hayden-Ledbetter M., Ledbetter J.A., Schummer M., McIntosh M., *et al.*: "The HE4 (WFCD2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma". *Cancer Res.*, 2003, 63, 3695.
- [11] Chung H.H., Kim J.W., Park N.H., Song Y.S., Kang S.O., Lee H.P., *et al.*: "Use of preoperative serum CA125 levels for prediction of lymph node metastasis and prognosis in endometrial cancer". *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 2006, 85, 1501.
- [12] Ebina Y., Sakuragi N., Hareyama H., Todo Y., Nomura E., Takeda M., *et al.*: "Para-aortic lymph node metastasis in relation to serum CA125 levels and nuclear grade in endometrial carcinoma". *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 2002, 81, 458.
- [13] Cherchi P.L., Dessole S., Ruiu G.A., Ambrosini G., Farina M., Capobianco G., *et al.*: "The value of serum CA124 and association CA125/CA19-9 in endometrial carcinoma". *Eur. J. Gynecol. Oncol.*, 1999, 20, 315.
- [14] Farias-Eisner G., Su F., Robbins T., Kotlerman J., Reddy S., Farias-Eisner R.: "Validation of serum biomarkers for detection of early- and late-stage endometrial cancer". *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2010, 202, 73.e1.
- [15] Yurkovetsky Z., Ta'asan S., Skates S., Rand A., Lomakin A., Linkov F., *et al.*: "Development of multimarker panel for early detection of endometrial cancer. High prognostic power of prolactin". *Gynecol. Oncol.*, 2007, 107, 58.
- [16] Omer B., Genc S., Takmaz O., Dirican A., Kusku-Kiraz Z., Berkman S., *et al.*: "The diagnostic role of human epididymis protein 4 and serum amyloid-A in early-stage endometrial cancer patients". *Tumour Biol.*, 2013, 34, 2645.
- [17] Moore R.G., Brown A.K., Miller M.C., Badgwell D., Lu Z., Allard W.J., *et al.*: "Utility of a novel serum tumor biomarker HE4 in patients with endometrioid adenocarcinoma of the uterus". *Gynecol. Oncol.*, 2008, 110, 196.
- [18] Moore R.G., Miller M.C., Disilvestro P., Landrum R.M., Gajewski W., Ball J.J., *et al.*: "Evaluation of the diagnostic accuracy of the risk of ovarian malignancy algorithm in women with a pelvic mass". *Obstet. Gynecol.*, 2011, 118, 280.
- [19] Angioli R., Plotti F., Capriglione S., Montera R., Damiani P., Ricciardi R., *et al.*: "The role of novel biomarker HE4 in endometrial cancer: a case control prospective study". *Tumour Biol.*, 2013, 34, 571.
- [20] Zanutti L., Bignotti E., Calza S., Bandiera E., Ruggeri G., Galli C., *et al.*: "Human epididymis protein 4 as a serum marker for diagnosis of endometrial carcinoma and prediction of clinical outcome". *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2012, 50, 2189.

Address reprint requests to:
 L. MINAR, M.D., Ph.D.
 Department of Obstetrics and Gynaecology
 Faculty of Medicine, Masaryk University Brno
 and University Hospital Brno
 Obilni trh 11
 602 00 Brno (Czech Republic)
 e-mail: lubosminar@seznam.cz

3.2. Human epididymis protein 4 a jeho význam pro diferenciální diagnostiku ovariálních tumorů

Ovariální rezistence představují frekventní problematiku gynekologických patologií bez ohledu na menopauzální status pacientek. Ve většině případů se jedná o funkční nebo benigní nálezy. Tyto jsou zpravidla diagnostikovány a řešeny na základní úrovni gynekologické péče, někdy i bez nutnosti operační intervence s adekvátní dispenzarizací. Podmínkou je existence citlivých metod, které pomáhají v diferenciální diagnostice. Problematika ovariálních lézí se vyznačuje specifíkem, které tyto patologie odlišuje od patologií dalších gynekologických orgánů. A sice, že v těchto případech zpravidla nemáme vzhledem k anatomické lokalizaci děložních adnex předoperačně k dispozici histologický nález, který získáváme až peroperačně. Z tohoto důvodu musí být speciální důraz kladen právě na předoperační diferenciaci pravděpodobné biologické povahy ovariálních nálezu. Na základě těchto informací pak probíhá distribuce pacientek k další péči. Zásadním momentem, který ve svém důsledku výrazně ovlivňuje prognózu pacientek, je referování, došetření a vlastní terapie pacientek se zhoubným nádorem vaječníku na úrovni onkogynekologických center, která disponují příslušnými specializovanými týmy.

Dvě základní metody uplatňující se v diferenciaci ovariálních tumorů představují ultrazvukové vyšetření a stanovení nádorových markerů. Ultrazvukové vyšetření na expertní úrovni prováděné sonografistou erudovaným v onkogynekologii přitom hraje stěžejní roli [24,25]. Avšak adekvátní vyhodnocení povahy ultrazvukových nálezu vyžaduje značnou zkušenost, která je sice dostupná na úrovni onkogynekologických center, nikoliv však na nižších úrovních péče [26]. Z tohoto pohledu zaujímá velice důležitou úlohu právě problematika jednoduše interpretovatelných nádorových markerů vyšetřitelných ze snadno dostupného biologického materiálu (např. z krevního séra) [27].

Klíčovým historickým markerem z tohoto pohledu je antigen CA125 s etablovanou horní mezí fyziologického rozmezí [28]. Problémem je nižší senzitivita v časných stádiích nemoci, a proto

je přístup v této problematice zaměřen na hledání dalších markerů a jejich využití v rámci kombinovaných nádorových indexů s cílem dosáhnout zlepšení diagnostické hodnoty. V tomto ohledu se začal uplatňovat lidský epididymální protein 4 vyznačující se ve srovnání s CA125 vyšší specificitou a nižší mírou falešné positivity při přítomnosti benigních ovariálních lézí (např. endometriózy) [29-32]. V úvahu je naopak nutno brát jeho vyšší falešnou pozitivitu danou koincencí s některými dalšími malignitami (karcinom plic nebo endometria) nebo renálním selháním [33]. Dalším směrem ve zvýšení efektivity využití nádorových markerů v diferenciální diagnostice je konstrukce nádorových indexů. V nich jsou kromě vlastních nádorových markerů zakomponovány rovněž individuální charakteristiky nemocných s cílem zvýšit efektivitu na podkladě individualizace diagnostického procesu. Etablovaným indexem v klinické praxi je z tohoto pohledu ROMA index (Risk of Ovarian Malignancy Algorithm), který je kalkulován ze sérových hodnot CA125, HE4 a menopauzálního statutu pacientek [34-36].

Dalším trendem vedoucím ke zjednodušení kalkulace indexů a tím k možnosti co nejplošnějšího využití i z geografického hlediska při současném zvýšení (nebo alespoň zachování) diferenciálně-diagnostického přínosu metody bylo hledání jednodušších proměnných ke kalkulaci dalších indexů [37]. Pozornost autora se zaměřila tímto směrem s analýzou přínosu nového indexu (Copenhagen Index, CPH-I), který inkorporuje, kromě sérových hodnot CA125 a HE4, parametr věku jako snadno dosažitelnou proměnnou. Přínos tohoto indexu pro klinickou praxi je deklarován analýzou vlastního souboru pacientek, výstupy analýzy byly publikovány v časopise, který je oficiální publikací Mezinárodní federace gynekologie a porodnictví (FIGO) (viz příloha 3.2.1).

3.2.1. Minar L, Felsing M, Cermakova Z, Zlamal F, Bienertova-Vasku J. Comparison of the Copenhagen Index vs ROMA for the preoperative assessment of women with ovarian tumors. (2018). *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 140(2), pp. 241-246.

Comparison of the Copenhagen Index versus ROMA for the preoperative assessment of women with ovarian tumors

Lubos Minar^{1,2,*} | Michal Felsinger^{1,2} | Zdenka Cermakova³ | Filip Zlamal^{4,5} | Julie Bienertova-Vasku^{4,5}

¹Department of Gynecology and Obstetrics, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

²University Hospital Brno, Brno, Czech Republic

³Department of Biochemistry, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic

⁴Department of Pathological Physiology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

⁵Research Centre for Toxic Compounds in the Environment, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic

*Correspondence

Lubos Minar, Department of Gynecology and Obstetrics, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno and University Hospital Brno, Obilni trh 11, Brno, Czech Republic.
Email: lubosminar@seznam.cz

Funding Information

Ministry of Health of the Czech Republic - Conceptual Development of Research Organization; Masaryk University; RECETOX Research Infrastructure

Abstract

Objective: To compare the Copenhagen Index (CPH-I) and the Risk of Ovarian Malignancy Algorithm (ROMA) in the differential diagnosis of ovarian tumors.

Methods: In a retrospective study, data were reviewed from women with ovarian tumors who attended University Hospital Brno, Czech Republic, between July 2011 and June 2015. The women were classified into the benign tumor group or malignant tumor group (borderline and malignant tumors). Serum levels of CA125 and HE4 were extracted from medical records. The two tumor indices were calculated using relevant clinical data.

Results: Among 267 included women, 110 had benign tumors, 42 had borderline ovarian tumors, and 115 had malignant tumors. The two indices showed similar discriminatory performance with no significant differences ($P > 0.05$). In the differentiation of benign tumors from all stages of borderline tumor and ovarian cancer, ROMA showed a sensitivity of 71% at a specificity of 88%, whereas CPH-I showed a sensitivity of 69% at a specificity of 85%.

Conclusion: CPH-I is a potential tumor index that is independent of menopausal status. It might be applied as a simple alternative to ROMA in settings of basic medical care.

KEYWORDS

Cancer antigen 125; Copenhagen Index; Human epididymis protein 4; Ovarian tumor; Risk of Ovarian Malignancy Algorithm

1 | INTRODUCTION

Pelvic adnexal masses are fairly common in the female population irrespective of menopausal status. They are benign in most cases and can be managed in non-specialized centers, sometimes with only follow-up and without the need for surgical treatment. Nevertheless, an accurate differential diagnosis—which helps to determine treatment strategies and, in the case of suspicious lesions, whether a patient should be referred to an onco-gynecologic center—has a crucial function. Specifically, expert ultrasonography examination plays an important part in the differential diagnosis of adnexal masses.^{1–3} However, the evaluation of these lesions requires considerable experience that, although usually available at specialized

onco-gynecologic centers, might not be offered at facilities not specializing in these pathologies.

Standardized testing for serum tumor markers constitutes a universally available diagnostic tool. The key marker investigated for epithelial ovarian cancer (EOC) is primarily cancer antigen 125 (CA125). Its sensitivity varies depending on the stage of the disease. Abnormal serum levels are present in 80%–90% of women with stage III–IV disease, but in only approximately 50% of those with stage I disease.^{4,5} Another laboratory marker used for the differential diagnosis of adnexal masses is human epididymis protein 4 (HE4), which is frequently overexpressed in cases of EOC. Even though HE4 has higher specificity than CA125, it has a higher rate of false-positivity in the presence of some malignancies (e.g. lung cancer, endometrial cancer),

renal disease, and effusions in body cavities.^{6–8} As compared with CA125, however, HE4 is associated with lower rates of false-positivity in benign gynecologic diseases (especially endometriosis).^{9,10}

Efforts are continuing in the search for indices based on known serum levels of tumor markers that, in combination with individualized characteristics of the patient, provide the potential for the simplification and simultaneous personalization of the diagnostic process. First described by Moore et al.,¹¹ the Risk of Ovarian Malignancy Algorithm (ROMA) is based on CA125 and HE4 levels and menopausal status, and has been incorporated into clinical practice.^{12–20} However, a shortcoming of studies assessing ROMA is the use of different definitions of menopause (e.g. absence of menstrual bleeding for more than 1 year, age ≥ 50 years for women who have undergone hysterectomy, and follicle-stimulating hormone levels >40 IU/L).^{21–23}

In line with this, the search for new measures and simple sensitive indices continues. In a pilot study, Karlsen et al.²⁴ reported a novel marker, the Copenhagen Index (CPH-I), that is calculated from the serum levels of CA125 and HE4, and the patient's age as an immediately available variable. The presumption that CPH-I might yield high sensitivity is based on the fact that HE4 serum levels increase continuously with age without a sharp change at the time of menopause.^{25,26}

The aim of the present study was to compare the performance of CPH-I and ROMA, and to assess the potential contribution of CPH-I to the differential diagnosis of ovarian tumors.

2 | MATERIALS AND METHODS

In a retrospective study, data were reviewed from women with ovarian tumors diagnosed between July 1, 2011, and June 30, 2015, at the Department of Gynecology and Obstetrics at the University Hospital Brno in the Czech Republic. The analysis included all women with both benign tumors and malignant tumors categorized as borderline ovarian tumor (BOT), EOC, and non-epithelial ovarian cancer who were treated surgically. Exclusion criteria were the presence of another malignancy and simultaneous treatment for benign non-gynecologic comorbidities and gynecologic extra-ovarian processes associated with elevated serum levels of HE4 and CA125 (i.e. liver and kidney disorders, autoimmune disease, pelvic inflammation, or large fibroids). The Ethical Committee of the University Hospital Brno, Czech Republic approved the study (reference number 160117). All participants gave written informed consent at the time of surgical treatment for the use of their anonymized data in future studies.

Study data were extracted from medical records. All women included in the study had undergone intraoperative blood sampling to determine venous serum levels of the tumor markers CA125 and HE4. Serum samples were separated by centrifugation and immediately processed. The quantitative determination of CA125 and HE4 was performed by chemiluminescent immunoassay using an Architect 1000i analyzer (Abbott, Abbott Park, IL, USA). Information on the biology of an ovarian tumor was obtained by histopathologic examination; for women in the malignant group, the stage of disease was also determined.

Prognostic index values (ROMA and CPH-I) were calculated for all women on the basis of their CA125 and HE4 serum levels, and menopausal status (ROMA) or age (CPH-I). Menopausal status was determined according to the serum level of follicle-stimulating hormone with a cutoff value of 40 IU/L. ROMA and CPH-I indices were calculated with respect to cutoff points of 13.1% for premenopausal women and 27.7% for postmenopausal women using the formula of Moore et al.,¹¹ and 7% using the formula of Karlsen et al.,²⁴ respectively.

Data analyses were performed using SAS version 9.4 (SAS Institute, Cary, NC, USA) and receiver operative curve (ROC) analysis was done with R version 3.2.1 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Categorical variables were reported as number (percentage) and continuous variables as median (range). Pearson χ^2 test was used to evaluate inter-group differences and $P < 0.05$ was considered significant.

3 | RESULTS

During the study period, 267 women met the study criteria and were included in the analysis. Histologically benign findings were established for 110 women, whereas 42 women were diagnosed with BOT, 103 with EOC, and 12 with non-epithelial ovarian cancer.

Among the 110 women diagnosed with benign tumors, 48 (43.6%) had epithelial tumors, 14 (12.7%) germ cell tumors, 10 (9.1%) sex cord stromal tumors, 30 (27.3%) endometriomas, and 8 (7.3%) functional cysts. All 42 women with BOT were in the early stage of the disease (stage I–II). Among the 103 women with EOC, 70 patients (68.0%) had advanced disease (stage III–IV); this finding is in agreement with the distribution of stages of ovarian epithelial malignancies observed in clinical practice. Among the 12 women with non-epithelial ovarian cancer, four were diagnosed at stage III and eight were diagnosed at an early stage of disease.

The key characteristics of individual patient subgroups according to histopathologic diagnosis are listed in Table 1. The median age of women in the benign group and BOT group was similar, and the range was nearly identical. Similarly, median age was very similar in the EOC and non-epithelial ovarian cancer groups. Whereas menopausal status was balanced among patients with benign lesions, postmenopausal patients constituted the majority of all other groups, particularly in the EOC group. Women with EOC had the highest serum levels of CA125 and HE4. This finding was probably significantly influenced by the high prevalence of advanced stages of EOC. Therefore, the predicted probability of malignancy was highest for the EOC group as compared with the other groups.

The ability of the CPH-I and ROMA indices to differentiate various ovarian tumor groups and subgroups was compared (Table 2). The discriminatory performance of the two indices was similar; no significant difference was observed between the two indices in any comparison ($P > 0.05$). The highest discriminatory ability of the indices, measured by area under the curve (AUC), was obtained when comparing benign tumors versus EOC stages III–IV and all malignant tumors (EOC and

TABLE 1 Characteristics of the study women by tumor type.^a

Characteristic	Benign ovarian tumors (n=110)	Borderline ovarian tumor (n=42)	Epithelial ovarian cancer (n=103)	Non-epithelial ovarian cancer (n=12)
Age, y	55.0 (17.0–83.0)	57.0 (15.0–83.0)	64.0 (34.0–91.0)	62.0 (22.0–78.0)
No. of premenopausal/postmenopausal women	55/55	17/25	28/75	4/8
HE4, pmol/L	46.5 (20.3–193.2)	67.2 (24.2–198.1)	246.1 (34.1–11625.0)	52.9 (32.9–246.4)
CA125, IU/mL	19.9 (5.3–1111.0)	42.1 (8.1–620.4)	281.3 (5.5–5500.0)	42.2 (13.7–330.3)
Predicted probability of ROMA, %	8.4 (1.0–71.1)	18.2 (1.4–72.4)	84.4 (3.4–99.9)	25.8 (2.9–86.8)
Predicted probability of CPH-I, %	2.2 (0.2–63.8)	5.5 (0.2–60.1)	75.4 (0.6–100.0)	6.3 (0.3–82.4)
No. with disease stage I–II/III–IV	–	42/0	33/70	8/4

Abbreviations: HE4, human epididymis protein 4; CA125, cancer antigen 125; ROMA, Risk of Ovarian Malignancy Algorithm; CPH-I, Copenhagen Index.
^aValues are given as median (range) unless stated otherwise.

TABLE 2 Comparison of CPH-I and ROMA in the discrimination of ovarian tumor groups.

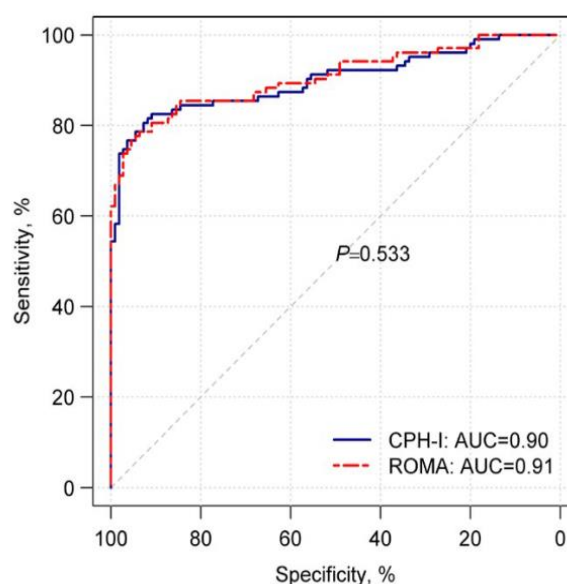
Group comparison	AUC CPH-I (95% CI)	AUC ROMA (95% CI)	P value
Benign vs BOT	0.65 (0.55–0.75)	0.69 (0.59–0.79)	0.180
Benign vs BOT + OC stages I–II	0.68 (0.60–0.75)	0.71 (0.63–0.78)	0.113
Benign vs BOT + EOC stages I–II	0.70 (0.62–0.78)	0.73 (0.65–0.80)	0.223
Benign vs BOT + OC stages I–IV	0.81 (0.76–0.86)	0.83 (0.78–0.88)	0.099
Benign vs BOT + EOC stages I–IV	0.83 (0.78–0.88)	0.84 (0.80–0.89)	0.211
Benign vs OC stages I–II	0.70 (0.59–0.81)	0.72 (0.62–0.83)	0.242
Benign vs EOC stages I–II	0.77 (0.66–0.87)	0.78 (0.68–0.88)	0.654
Benign vs OC stages III–IV	0.96 (0.93–0.99)	0.97 (0.94–0.99)	0.349
Benign vs EOC stages III–IV	0.96 (0.93–0.99)	0.97 (0.94–0.99)	0.537
Benign vs OC stages I–IV	0.87 (0.82–0.92)	0.88 (0.83–0.93)	0.176
Benign vs EOC stages I–IV	0.90 (0.86–0.95)	0.91 (0.86–0.95)	0.533
BOT vs OC stages I–II	0.59 (0.46–0.72)	0.59 (0.46–0.72)	0.982
BOT vs EOC stages I–II	0.67 (0.54–0.80)	0.65 (0.52–0.79)	0.577
BOT vs OC stages III–IV	0.93 (0.89–0.98)	0.93 (0.88–0.97)	0.448
BOT vs EOC stages III–IV	0.94 (0.90–0.98)	0.93 (0.88–0.98)	0.204
BOT vs OC stages I–IV	0.81 (0.75–0.88)	0.81 (0.74–0.87)	0.694
BOT vs EOC stages I–IV	0.85 (0.79–0.91)	0.84 (0.78–0.90)	0.281

Abbreviations: CPH-I, Copenhagen Index; ROMA, Risk of Ovarian Malignancy Algorithm; AUC, area under curve; CI, confidence interval; BOT, borderline ovarian tumor; OC, malignant ovarian tumor (EOC + non-epithelial OC); EOC, epithelial ovarian cancer;.

non-epithelial ovarian cancer) of stages III–IV. The CPH-I and ROMA indices showed similarly high differentiation of benign tumors from EOC of all stages (Fig. 1).

In the differentiation between benign findings and early stages of malignancy, the performance of both indices decreased. ROMA seemed to be slightly more efficient than CPH-I in differentiating between benign tumors and BOT plus EOC stage I–II (Fig. S1). Both indices showed decreased performance in the discrimination between benign lesions and BOT plus stage I–II malignant tumors (Fig. S2).

In the discrimination of benign tumors from a group comprising BOT and all stages of malignant tumors, the performance of both ROMA and CPH-I was higher owing to the preponderance of advanced stages of disease (Fig. 2). The differentiation of benign tumors from the group comprising BOT and all stages of EOC was slightly more sensitive (Table 2).

**FIGURE 1** Comparison of receiver operator characteristic curves for CPH-I and ROMA in the discrimination of benign tumors from epithelial ovarian cancer stages I–IV. Abbreviations: CPH-I, Copenhagen Index; ROMA, Risk of Ovarian Malignancy Algorithm; AUC, area under the curve.

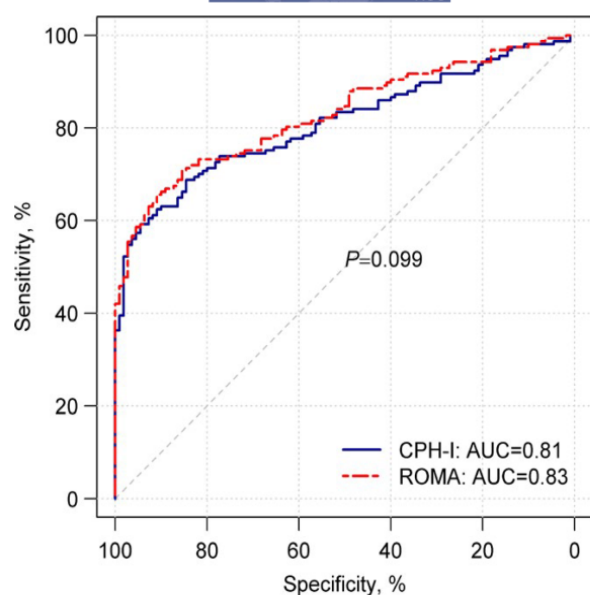


FIGURE 2 Comparison of receiver operator characteristic curves for CPH-I and ROMA in the discrimination of benign tumors from all malignant tumors (borderline ovarian tumors and ovarian cancer stages I–IV). Abbreviations: CPH-I, Copenhagen Index; ROMA, Risk of Ovarian Malignancy Algorithm; AUC, area under the curve.

The sensitivity and specificity of CPH-I and ROMA with respect to the discrimination of benign lesions from different groups of ovarian tumors were determined (Table 3). The best results were achieved for the discrimination of benign tumors from EOC of all stages. The performance of both indices decreased for the differentiation of benign tumors from a group including BOT and all stages of malignant tumors. Regarding the ability to differentiate between benign lesions and a combination of BOT and early stages of malignancy, both indices decreased in sensitivity.

4 | DISCUSSION

The present retrospective study included women with all histologic types of primary ovarian tumors—i.e. both benign lesions and malignant tumors, including BOT, EOC and non-epithelial ovarian cancer. The results demonstrate that CPH-I and ROMA have similar discriminatory performance; no significant difference between CPH-I and ROMA was identified in any evaluation in the study. In differentiating between benign tumors and all stages of BOT and malignant tumors, the AUC was 0.81 for CPH-I and 0.83 for ROMA. Regarding other intergroup comparisons, the best performance was achieved in the discrimination of benign tumors from EOC of all stages, with an AUC of 0.91 for ROMA and an AUC of 0.90 for CPH-I.

Karlsen et al.²⁴ were the first to evaluate the potential benefit of CPH-I in a differential diagnosis of ovarian tumors on the basis of a multicenter study. Only data from women with benign tumors and EOC were evaluated, and CPH-I, ROMA, and the Risk Malignancy Index (RMI) were evaluated. Whereas CPH-I and ROMA use serum tumor markers and individual patient characteristics (age or menopausal status), RMI incorporates ultrasonography features of the lesion with menopausal status and serum CA125. The study was based on two patient cohorts: a training population from one center, and a validation population from eight centers. The analysis resulted in AUC values of 0.960 (CPH-I), 0.954 (ROMA), and 0.959 (RMI) for the training study, and 0.951 (CPH-I), 0.953 (ROMA), 0.935 (RMI) for the validation study.²⁴ These findings are consistent with those of the present study: in the discrimination of benign tumors from EOC, the AUC was 0.91 for ROMA and 0.90 for CPH-I. Although the performance of ROMA was slightly higher, there was no significant difference between the two indices.

TABLE 3 Performance of CPH-I and ROMA in the discrimination of benign tumors from BOT and OC at standard cutoff points.^a

Comparison	Sensitivity, %	Specificity, %	Positive predictive value, %	Negative predictive value, %
Benign vs BOT + OC stages I–IV				
CPH-I	69 (61–76)	85 (76–91)	86 (79–92)	65 (57–73)
ROMA	71 (64–78)	88 (81–94)	90 (83–94)	68 (60–76)
Benign vs EOC stages I–IV				
CPH-I	80 (72–87)	85 (76–91)	84 (76–91)	80 (72–87)
ROMA	78 (70–85)	88 (81–94)	87 (79–93)	80 (71–86)
Benign vs BOT + EOC stages I–II				
CPH-I	49 (38–61)	85 (76–91)	69 (54–80)	71 (62–79)
ROMA	57 (45–69)	88 (81–94)	77 (64–87)	75 (67–82)
Benign vs BOT + OC stages I–II				
CPH-I	47 (36–58)	85 (76–91)	70 (56–81)	68 (59–76)
ROMA	53 (42–64)	88 (81–94)	77 (64–87)	71 (63–79)

Abbreviations: CPH-I, Copenhagen Index; ROMA, Risk of Ovarian Malignancy Algorithm; BOT, borderline ovarian tumor; OC, malignant ovarian tumor (EOC + non-epithelial ovarian cancer); EOC, epithelial ovarian cancer.

^aValues in parentheses are 95% confidence intervals.

Notably, in the discrimination of benign tumors from BOT and OC of all stages, the discriminatory performance of both indices decreased, although the performance of ROMA remained slightly (but nonsignificantly) higher. Nonetheless, the inclusion of all types of primary malignant ovarian tumor and their proportional representation in the present study, including the stages of disease, reflect the distribution of these tumors observed in clinical practice. As compared with an assessment limited to benign tumors and EOC, therefore, the present analysis might provide a more appropriate format for understanding the actual contribution of CPH-I to clinical practice. The decrease in the discriminatory performance for any type of malignant tumor to 0.81 for CPH-I and 0.83 for ROMA observed in the present study should be taken into account during diagnostic decision-making in cases of various suspicious ovarian lesions ascertained at the level of basic ultrasonography. In other words, the possibility of less common tumors (i.e. BOT or non-epithelial ovarian cancer) should not be ruled out in these cases.

Ultrasonography is the dominant diagnostic method with respect to ovarian tumors, placing considerable demands on the specialists in charge of such diagnoses.^{27,28} This consequently creates an important need for a simple and reliable laboratory marker or a marker index with high sensitivity and specificity. Such a marker should be accessible at the stage of basic medical care and incorporate a degree of personalization—i.e. individual patient characteristics and laboratory marker serum levels. CPH-I seems to satisfy these conditions fairly well.

The present study has some limitations, including its monocentric design and retrospective nature. The findings of the analysis should be confirmed in wider populations.

In conclusion, CPH-I might be applicable as a biochemical tumor index that is independent of menopausal status. It can be applied as a simple alternative to ROMA in settings of basic medical care where expert ultrasonography is not available. Further investigation of the utility of CPH-I in populations of different ethnic origin is the next logical step in the assessment of CPH-I.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

LM conceived the study, coordinated its planning and implementation, supervised data analysis, interpreted the results, and wrote the manuscript. MF and ZC coordinated data acquisition, participated in the data analysis, and wrote the manuscript. FZ performed data analysis, and interpreted the results, and wrote the manuscript. JB-V interpreted the results and supervised preparation and revision of the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

The work was supported by the Ministry of Health of the Czech Republic - Conceptual Development of Research Organization (FNBR 65269705), Masaryk University (CETOEN PLUS CZ.02.1.01/0.0/0.0/15 003/0000469), and RECETOX Research Infrastructure (LM2015051 Project of the Ministry of Education, Youth and Sports, Czech Republic).

CONFLICTS OF INTEREST

The authors have no conflicts of interest.

REFERENCES

- Sayasneh A, Kaijser J, Preisler J, et al. Accuracy of ultrasonography performed by examiners with varied training and experience in predicting specific pathology of adnexal masses. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015;45:605–612.
- Piovano E, Cavallero C, Fuso L, et al. Diagnostic accuracy and cost-effectiveness of different strategies to triage women with adnexal masses: A prospective study. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2016;50:395–403.
- Timmerman D, Van Calster B, Testa A, et al. Predicting the risk of malignancy in adnexal masses based on the Simple Rules from the International Ovarian Tumor Analysis group. *Am J Obstet Gynecol.* 2016;214:424–437.
- Duffy MJ, Bonfrer JM, Kulpa J, et al. CA 125 in ovarian cancer: European Group on Tumour Markers guidelines for clinical use. *Int J Gynecol Cancer.* 2005;15:679–691.
- Sturgeon CM, Duffy MJ, Stenman UH, et al. National Academy of Clinical Biochemistry laboratory medicine practice guidelines for use of tumour markers in testicular, prostate, colorectal, breast, and ovarian cancers. *Clin Chem.* 2008;54:e11–e79.
- Galgano MT, Hampton GM, Frierson HF. Comprehensive analysis of HE4 expression in normal and malignant human tissue. *Mod Pathol.* 2006;19:847–853.
- Escudero JM, Auge JM, Filella X, Torne A, Pahisa J, Molina R. Comparison of serum human epididymis protein 4 with cancer antigen 125 as a tumor marker in patients with malignant and nonmalignant diseases. *Clin Chem.* 2011;57:1534–1544.
- Nagy B Jr, Krasznai ZT, Balla H, et al. Elevated human epididymis protein 4 concentrations in chronic kidney disease. *Ann Clin Biochem.* 2012;49:377–380.
- Drapkin R, von Horsten HH, Lin Y, et al. Human epididymis protein 4 (HE4) is a secreted glycoprotein that is overexpressed by serous and endometrioid ovarian carcinomas. *Cancer Res.* 2005;65:2162–2169.
- Moore RG, Brown AK, Miller MC, et al. The use of multiple novel tumour bio-markers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol.* 2008;108:402–408.
- Moore RG, McMeekin DS, Brown AK, et al. A novel multiple marker bioassay utilizing HE4 and CA 125 for the prediction of ovarian cancer in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol.* 2009;112:40–46.
- Ortiz-Muñoz B, Aznar-Oroval A, García García A, et al. HE4, Ca125 and ROMA algorithm for differential diagnosis between benign gynaecological diseases and ovarian cancer. *Tumour Biol.* 2014;35:7249–7258.
- Fujiwara H, Suzuki M, Takeshima N, et al. Evaluation of human epididymis protein 4 (HE4) and Risk of Ovarian Malignancy Algorithm (ROMA) as diagnostic tools of type I and type II epithelial ovarian cancer in Japanese women. *Tumour Biol.* 2015;36:1045–1053.
- van Gorp T, Cadron I, Despiere E, et al. HE4 and CA125 as a diagnostic test in ovarian cancer: Prospective validation of the Risk of Ovarian Malignancy Algorithm. *Br J Cancer.* 2011;104:863–870.
- Wiwanitkit V. HE4, CA-125, and cystic ovarian mass. *J Gynecol Oncol.* 2012;23:133.
- Montagnana M, Danese E, Ruzzenente O, et al. The ROMA (Risk of Ovarian Malignancy Algorithm) for estimating the risk of epithelial ovarian cancer in women presenting with pelvic mass: Is it really useful? *Clin Chem Lab Med.* 2011;49:521–525.
- Wilailak S, Chan KK, Chen CA, et al. Distinguishing benign from malignant pelvic mass utilizing an algorithm with HE4, menopausal status, and ultrasound findings. *J Gynecol Oncol.* 2015;26:46–53.
- Mi D, Zhang YX, Wang C, Feng Q, Qi P, Chen SQ. Diagnostic and prognostic value of serum human epididymis protein 4 in patients with

- primary fallopian tube carcinoma. *J Obstet Gynaecol Res.* 2016;42:1326–1335.
19. Dayyani F, Uhlig S, Colson B, et al. Diagnostic performance of Risk of Ovarian Malignancy Algorithm against CA125 and HE4 in connection with ovarian cancer: A meta-analysis. *Int J Gynecol Cancer.* 2016;26:1586–1593.
 20. Terlikowska KM, Dobrzycka B, Witkowska AM, et al. Preoperative HE4, CA125 and ROMA in the differential diagnosis of benign and malignant adnexal masses. *J Ovarian Res.* 2016;19:43–47.
 21. Wang J, Gao J, Yao H, Wu Z, Wang M, Qi J. Diagnostic accuracy of serum HE4, CA125 and ROMA in patients with ovarian cancer: A meta-analysis. *Tumour Biol.* 2014;35:6127–6138.
 22. Moore RG, Miller MC, Disilvestro P, et al. Evaluation of diagnostic accuracy of the risk of ovarian malignancy algorithm in women with a pelvic mass. *Obstet Gynecol.* 2011;118:280–288.
 23. Van Gorp T, Veldman J, Van Calster B, et al. Subjective assessment by ultrasound is superior to the Risk of Malignancy Index (RMI) or The Risk of Ovarian Malignancy algorithm (ROMA) in discriminating benign from malignant adnexal masses. *Eur J Cancer.* 2012;48:1649–1656.
 24. Karlsen MA, Högdall EV, Christensen IJ, et al. A novel diagnostic index combining HE4, CA125 and age may improve triage of women with suspected ovarian cancer - an international multicenter study in women with an ovarian mass. *Gynecol Oncol.* 2015;138:640–646.
 25. Bolstad N, Oijordsbakken M, Nustad K, Bjerner J. Human epididymis protein 4 reference limits and natural variation in a Nordic reference population. *Tumour Biol.* 2012;33:141–148.
 26. Moore RG, Miller MC, Eklund EE, Lu KH, Bast RC Jr, Lambert-Messerlian G. Serum levels of the ovarian cancer biomarker HE4 are decreased in pregnancy and increase with age. *Am J Obstet Gynecol.* 2012;206:349.e1–349.e7.
 27. Kaijser J, Van Gorp T, Smet ME, et al. Are serum HE4 or ROMA scores useful to experienced examiners for improving characterization of adnexal masses after transvaginal ultrasonography? *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2014;43:89–97.
 28. Fischerova D, Burgetova A. Imaging techniques for the evaluation of ovarian cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2014;28:697–720.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

Figure S1. Comparison of receiver operator characteristic curves for CPH-I and ROMA in the discrimination of benign tumors from borderline ovarian tumors and epithelial ovarian cancer stages I–II. Abbreviations: CPH-I, Copenhagen Index; ROMA, Risk of Ovarian Malignancy Algorithm; AUC, area under the curve.

Figure S2. Comparison of receiver operator characteristic curves for CPH-I and ROMA in the discrimination of benign tumors from borderline ovarian tumors and ovarian cancer stages I–II. Abbreviations: CPH-I, Copenhagen Index; ROMA, Risk of Ovarian Malignancy Algorithm; AUC, area under the curve.

3.3. MikroRNA v onkogynekologickém výzkumu se zaměřením na karcinom ovaria a endometria

MikroRNA získávají velice důležité místo v onkogynekologickém základním výzkumu. Jejich výskyt není omezen pouze na buňky a tkáně, ale jsou přítomny i jako různé extracelulární frakce, tedy ve značném množství i v tělních tekutinách jako ve snadno dostupném biologickém materiálu [13]. Všechny tělní tekutiny obsahují buněčnou i nebuněčnou frakci mikroRNA. Terminologicky se hovoří o cirkulující mikroRNA v souvislosti s krevním oběhem, tento termín se tedy používá především pro sérum/plazmu, ev. plnou krev, případně pro mikroRNA cirkulujících buněk a krevních elementů [38,39]. V případě ostatních tělních tekutin (mj. moč, peritoneální výpotek, resp. ascites) se jedná o extracelulární (cell-free) mikroRNA [40-42].

Plazma a krevní sérum jsou široce využívány pro hodnocení exprese mikroRNA, rozvíjí se však i studie zaměřené na detekci jejich diagnostického a prognostického potenciálu v dalších tělesných tekutinách [43-45]. Autor je součástí výzkumného týmu, jehož předmětem zájmu je detekce deregulace exprese mikroRNA v souvislosti s ovariálním a endometriálním karcinomem v moči a ascitu. Pomocí molekulárně-biologických metod je zkoumána exprese kandidátských mikroRNA v moči s důrazem na zjištění difference mezi patologickými a kontrolními vzorky nebo v závislosti na absolvované terapii a jejím rozsahu, resp. komplexnosti. V rámci výzkumu jsou podrobovány analýze rovněž rozdílné metody izolace mikroRNA z moči a v souvislosti s tím posuzována variabilita v deregulacích exprese v různých frakcích mikroRNA. Zkoumán je rovněž vliv celé řady dalších faktorů, které mohou ovlivnit expresi mikroRNA v moči, tedy diagnostický potenciál extracelulární mikroRNA, jako např. hormonální stav organismu, zevní vlivy jako nutriční faktory nebo kouření. Této problematice je věnována **příloha 3.3.1**.

Další směr zájmu je věnován potenciálnímu využití mikroRNA derivované ascitem v souvislosti s karcinomem vaječníku. Ascitická tekutina představuje negativní prognostický faktor, který je frekventně zastoupen především v pokročilých stádiích nemoci, vyskytuje se však i v časných

stádiích [46,47]. Výzkum se zaměřuje na rozsáhlé profilové zpracování exprese mikroRNA (v řádu několika stovek typů) z extracelulárních frakcí ascitické tekutiny a provedení srovnání se vzorky plazmy zdravých kontrol. V publikačním výstupu výzkumné skupiny, jejímž je autor členem, byla zjištěna signifikantně rozdílná exprese týkající se cca 20% analyzovaných mikroRNA. Exprese vybraných mikroRNA pak byla dále hodnocena v extendovaných souborech zahrnujících serózní, mucinozní a endometroidní histotypy ovariálního karcinomu. Výstupem bylo zjištění, že rozdílné úrovně exprese některých typů mikroRNA jsou asociovány s výraznou diferencí týkající se celkového přežití nemocných. Tato iniciální zjištění signalizují, že ascitem derivované mikroRNA by měly být dále zkoumány a vyšetřovány jako potenciální diagnostický a prognostický faktor ovariálního karcinomu (viz **příloha 3.2.2.**).

3.3.1. Zavesky L, Jandakova E, Turyna R, Langmeierova L, Weinberger V, Minar L. Supernatant versus exosomal urinary microRNAs. Two fractions with different outcomes in gynaecological cancers. (2016). *Neoplasma*, 63(1), pp. 621-632.

Supernatant versus exosomal urinary microRNAs. Two fractions with different outcomes in gynaecological cancers

L. ZAVESKY^{1,*}, E. JANDAKOVA², R. TURYNÁ³, L. LANGMEIEROVA⁴, V. WEINBERGER⁵, L. MINAR⁵

¹Institute of Biology and Medical Genetics, First Faculty of Medicine, Charles University Prague and General University Hospital in Prague, Albertov 4, CZ-128 00 Prague 2, the Czech Republic; ²Institute of Pathology, University Hospital Brno, Obilni trh 11, CZ-625 00 Brno, the Czech Republic; ³Institute for the Care of Mother and Child, Podolske nabrezi 157, CZ-147 00, Prague 4, the Czech Republic; ⁴Faculty Transfusion Centre, General University Hospital in Prague, U Nemocnice 2, CZ-128 08 Prague, the Czech Republic; ⁵Department of Obstetrics and Gynaecology, University Hospital Brno, Obilni trh 526/11, CZ-602 00 Brno, the Czech Republic

*Correspondence: ludek.zavesky@gmail.com

Received June 26, 2015 / Accepted August 13, 2015

MicroRNAs (miRNAs) are key regulatory molecules implicated in fundamental cell processes. Recent investigations have been focused to investigate their diagnostic potential also in various body fluids. Plasma and serum are widely used for these purposes. Urinary miRNAs, as the easily available type of sample, have been explored particularly in urological diseases recently. However, we have shown previously that differential expression of urinary cell-free miRNAs may be observed also in gynaecological cancers, such as ovarian and endometrial cancers. In the present article, we focus on the differences in particular urine cell-free miRNA abundance among different samples including particularly ovarian and endometrial cancers and rare gynaecological diagnoses involved in the study. Using raw abundance miRNA expression data, we confirmed significant up-regulation of miR-92a in ovarian cancer, and significant down-regulation of miR-106b in endometrial cancers. As miR-21 appeared up-regulated in the endometrial cancer similarly as in the verification process, where also miR-106b resulted in significant down-regulation in ovarian cancer, these miRNAs may be good candidates for further evaluation as novel diagnostics.

To find out why supernatant but not exosomal urine miRNAs fraction resulted in significant results in regards to de-regulation of expression, we performed a comparison of the same urine samples isolated by these two manners. We show that diagnostic potential of cell-free urinary miRNAs may depend on the urine fraction used for the isolation. While particular urinary miRNAs may be enriched, other may reveal unchanged or diminished expression in the exosomal fraction in comparison with supernatant fraction, giving differences also between cancer and control samples. More research will be needed to further explore which kind of cell-free samples would give better results for diagnostic purposes in various diagnoses using urinary samples and investigating cell-free miRNAs expression. Meanwhile, different urine fractions should be explored for their miRNA expression to establish novel diagnostic urinary miRNA markers.

Key words: ovarian cancer, endometrial cancer, cell-free urine, microRNAs, exosomes, diagnostics

Ovarian cancer is the deadliest gynaecological cancer while endometrial cancer is the most common gynaecological cancer in developed countries [1-2]. Epithelial ovarian cancer accounting for about 90% ovarian cancer cases is typical by a heterogeneous histopathological nature resulting in several subtypes based both on classical histological or molecular classifications [3-4]. Different parts of the gynaecological tract are suspected to play a key role in ovarian carcinogenesis while processes of epithelial to mesenchymal (and vice versa) transition and cancer stem cells may be implicated [5-7]. Two types

of endometrial cancer have been recognized, however novel ongoing classifications based on the molecular traits suggest new insights into the endometrial cancer classification [8].

The vast majority of ovarian cancer cases are diagnosed in the late stages resulting in significant decrease in overall survival [1, 9]. Disease recurrence and resistance to chemotherapy are common obstacles in the achievement of the treatment success [10]. In endometrial cancer, the majority of cases are diagnosed based on uterine bleeding, however, there is a proportion of patients which do

not exhibit early disease symptoms. Currently, there is no generally accepted marker that could be used in screening of these two cancers. Similarly, the novel diagnostic markers for the early diagnosis of ovarian and endometrial cancers are still needed [11–15].

With the shift from the tissue and cell lines-based investigations towards the clinically more relevant samples such as body fluids, their diagnostic potential has emerged in many diseases recently. Serum and plasma samples are the most prominent investigated sample types; however urine has attracted several studies seeking novel diagnostic markers or tools for ovarian cancer as well. Different approaches have been applied in search for novel urine diagnostic tools exploring for example proteins such as HE-4 [16] or using novel proteomic methods [17], fluorescence characteristics [18–19], or microRNAs expression (see next).

MicroRNAs (miRNAs) are key regulatory molecules operating in a post-transcriptional regulation of gene expression. Being implicated in the fundamental cell processes, they have been found associated with the pathological states including carcinogenesis [20], and also occurring in various body fluids [21]. However, there is only a limited number of studies focused on body fluids based miRNAs expression available in gynaecological cancers (reviewed in [22]). Only two studies have been published for urinary miRNAs in ovarian cancer recently [23–24], one of these including also the endometrial cancer [23]. In addition to ovarian and endometrial cancers, the cervical cancer represents the third most important gynaecological cancer. As far as we are aware, there has not been any study published for urinary miRNAs in this cancer. The vast majority of urinary miRNAs research has been published in urological cancers such as bladder, prostate and kidney cancers (see [26]). However, it may be assumed that studies will be coming soon also in other cancers, breaking the view that urinary miRNA markers are not suitable for the diagnostic purposes in non-urological diseases. Many obstacles yet prevent introduction of urinary miRNAs as cancer diag-

nostics regarding particularly methodological aspects and insufficient number of independent studies (see [22]).

As above mentioned, we have explored the novel diagnostic potential using urine miRNAs samples of ovarian cancer and endometrial cancer patients recently [23]. We have found that miRNAs may not only be found in cell-free urine, but may be differentially expressed between the cancer and control samples using supernatant miRNAs, but not the exosomal miRNAs. Using supernatant fractions of urine, we have shown that miR-92a may be up-regulated significantly and miR-106b down-regulated significantly in ovarian cancer. In endometrial cancer, we have found miR-106b down-regulated in endometrial cancer [23].

In the present article, we extended this urinary microRNA research including several other gynaecological diagnoses in addition to ovarian and endometrial cancers. We explored the expression in further analyses showing differences in overall abundance of particular miRNAs across different samples. We compared the same samples isolated both as supernatant and exosomal fractions of urinary miRNAs, showing that these fractions may harbour different diagnostic potential associated with different microRNA content. Elucidating the factors affecting urinary miRNA expression is necessary for further investigations and their interpretations. These factors may have important impact on establishing particular miRNAs as diagnostic markers with respect to the methodology applied in various body fluids and clinical diagnoses associated with the gynaecological tract.

Material and methods

Clinical samples, modes of sampling, and isolation of RNA and qPCR analyses generally follow the description (including detailed clinicopathological assessment) provided previously [23], except for the extended data set with additional diagnoses provided in the present study.

Clinical samples. Briefly, second morning urine of patients with epithelial ovarian cancer and fallopian tube cancer,

Table 1. Summary of clinicopathological data for patients and samples used in the S1 experiment

Type of sample	FIGO stage	Grade	Age at surgery	Metastases status at surgery	Recurrence ¹	Death ¹
Epithelial ovarian cancer						
<i>Serous pre-surgery</i>						
UCB310A	1c	III	53	M0	no	no
UCB318A	3a	III	55	yes, in omentum	yes (10)	yes (12)
UCB417A	3c	III	64	yes, in omentum and peritoneum	no	no
<i>Mucinous (pre-surgery)</i>						
UCB315A	1c	II	72	M0	no	no
<i>Serous post-chemotherapy (disease recurrence)</i>						
UCB425C ²	3c	III	56	M0	yes (16)	no
Fallopian tube cancer (pre-surgery)						
UCB902A	3c	II	77	yes, extensively including omentum	yes (15)	no

¹ month after surgery, ² five months after surgery, 2 months after chemotherapy (used in [23] in extended data set)

Table 2. Summary of clinicopathological data for patients and samples used in the S2 experiment

Type of sample	FIGO stage	Grade	Age at surgery	Metastases status at surgery	Recurrence ¹	Death ¹
Epithelial ovarian cancer						
<i>Serous pre-surgery</i>						
UCP12	3c	III	68	yes, in peritoneum	n/a	n/a
<i>Serous post-surgery</i>						
UCB318C (7 months after surgery, 8 days after chemotherapy)	3a	III	55	yes, in omentum	yes (10)	yes (12)
<i>Mucinous (pre-surgery)</i>						
UCB315A	1c	II	72	M0	no	no
<i>Mixed endometrioid ovarian cancer/endometrioid endometrial cancer (pre-surgery)</i>						
UCP5	3c	III	57	n/a	n/a	n/a
Endometrial cancer						
<i>Type 1 endometrioid endometrial cancer</i>						
UCP8	1a	II	77	n/a	n/a	n/a
UCP9 (mixed with undifferentiated carcinoma)	n/a	n/a	86	n/a	n/a	n/a
UCP11	3b	n/a	64	n/a	n/a	n/a
UCP13	n/a	n/a	91	n/a	n/a	n/a
UCP15	n/a	II-III	71	n/a	n/a	n/a
Benign samples – ovarian type						
UFB01 (ovarian fibroma)	-	-	66	-	-	-
UCP14 (ovarian thecofibroma)	-	-	74	-	-	-
Benign samples – endometrial type						
UCP7 (endometrial polyp)	-	-	65	-	-	-
UCP10 (endometrial leiomyomas)	-	-	68	-	-	-

¹ month after surgery

endometrial cancer and eventually other gynaecological diagnoses* was collected before the surgery, and partially collected as post-surgery, and post-chemotherapy ovarian cancer samples at the University Hospital Brno (FN Brno, samples designated as UCB) and the Institute of the Care of Mother and Child Prague (ÚPMD Praha – Podolí, samples designated as UCP). Control urine samples came from the Transfusion Department, General University Hospital Prague (VFN Praha) and were provided by healthy blood donor volunteers (post-menopausal women). These samples were used as the reference for post-menopausal patients. Additionally, pre-menopausal women using and not-using hormonal contraception were isolated as pooled urine to observe potential differences. All patients enrolled in the study were Caucasians of the Czech nationality and provided written informed consent. This research was approved by a multicentre Ethical Committee of the General University Hospital Prague. Urine Collection and Preservation Tubes (Norgen Biotek Corp., Canada) en-

suring stabilization of urine samples were used for the urine collection. A brief summary of samples and clinical diagnoses used in three experiments (see later) is given in table 1 (S1 experiment), table 2 (S2 experiment) and tables 3a,b (Exosome experiment), Supplementary Table 1 (additional diagnoses in the Exosome experiment), and Supplementary Table 2 (control samples).

Urine processing. The protocol for processing the whole urine (Urine Total RNA Purification Maxi Kit, Slurry Format, Norgen Biotek Corp., Canada) was followed according to manufacturer instructions with some modifications ensuring isolation of cell-free urine fractions. Methods are described in detail in [23]. Briefly, in the Supernatant-1 experiment (further S1 experiment), urine samples were centrifuged for 10 minutes at 100 x g at RT, and then supernatant was centrifuged at 500 x g for 10 minutes at RT. In the Supernatant-2 (further S2 experiment), urine samples were centrifuged for 10 minutes at 300 x g at 4°C, and then supernatant was

*Note 1: Fallopian tube is very closely related to ovarian cancer (e.g., in the annual SEER Cancer Statistics Review reports of the National Cancer Institute, Bethesda, USA, it is treated with ovarian cancer), therefore in some analyses this diagnosis was processed within ovarian cancer set. Note 2: Krukenberg carcinoma of ovary is a secondary cancer coming primarily from other body tissues, particularly of gastrointestinal tract. In our case, the origin could not be evaluated. Note 3: Malignant diffuse large B-Cell lymphoma infiltrating extensively ovaries and fallopian tubes was included in our clinical sample set. In these analyses, we included it as a reference pathological material and for illustration of different miRNAs pattern in urine of this patient.

Table 3a. Summary of clinicopathological data for patients and samples used in the Exosome experiment (ovarian and fallopian tube cancers)

Type of sample	FIGO stage	Grade	Age at surgery	Metastases status at surgery	Recurrence ¹	Death ¹
Epithelial ovarian cancer						
<i>Serous (pre-surgery)</i>						
UCB318A	3a	III	55	yes, in omentum	yes (10)	yes (12)
UCB417A	3c	III	64	yes, in omentum and peritoneum	no	no
UCP12	3c	III	68	yes, in peritoneum	n/a	n/a
UCB322A (13 days after neoadjuvant chemotherapy)	3a	II	68	yes, in peritoneum	n/a	yes (9)
<i>Serous (post-surgery)</i>						
UCB417B	3c	III	Ibid.	Ibid.	Ibid.	Ibid.
UCB322B (23 days after neoadjuvant chemotherapy)	3a	II	Ibid.	Ibid.	Ibid.	Ibid.
<i>Serous post-chemotherapy (disease recurrence)</i>						
UCB318B ²	3a	III	Ibid.	Ibid.	Ibid.	Ibid.
UCB318C ³	3a	III	Ibid.	Ibid.	Ibid.	Ibid.
<i>Mucinous (pre-surgery)</i>						
UCB315A	1c	II	72	M0	no	no
<i>Mixed endometrioid ovarian cancer/endometrioid endometrial cancer (pre-surgery)</i>						
UCP5	3c	III	57	n/a	n/a	n/a
<i>Fallopian tube (pre-surgery)</i>						
UCP1	3c	II	62	n/a	n/a	n/a
<i>Fallopian tube (post-surgery)</i>						
UCB902B	3c	II	77	yes, extensively including omentum	yes (15)	no

¹ month after surgery, ² chemotherapy 7th day after surgery, sampling B here 10th day after surgery, ³ 7 months after surgery, 8 days after chemotherapy

Table 3b. Summary of clinicopathological data for patients and samples used in the Exosome experiment (endometrial cancer and benign samples)

Endometrial cancer	FIGO stage	Grade	Age at surgery
<i>Type 1 endometrioid endometrial cancer</i>			
UCP8	1a	II	77
UCP9 (mixed with undifferentiated carcinoma)	n/a	n/a	86
UCP11	3b	n/a	64
UCP13	n/a	n/a	91
UCP15	n/a	II-III	71
UCP16	3a	I	61
UCP17	n/a	II	55
UCP19	n/a	I	57
UCP21	n/a	I	64
<i>Type 2 endometrial cancer</i>			
UCP22	n/a	III	51
<i>Benign samples – ovarian type</i>			
UFB01 (ovarian fibroma)	-	-	66
UCP2 (ovarian thecofibroma)	-	-	68
UCP14 (ovarian thecofibroma)	-	-	74
<i>Benign samples – endometrial type</i>			
UCP7 (endometrial polyp)	-	-	65
UCP10 (endometrial leiomyomas)	-	-	68
UCP18 (intramural tumor)	-	-	53

centrifuged at 2,000 x g for 20 minutes at 4°C. Initial input urine volume was 2 ml in S1 and S2 experiments. *Note: this supernatant is not exosomes-free. We use the term supernatant, but this should not be confused with the exosome-depleted supernatant.*

In the Exosome experiment, urine samples were processed following manufacturer protocol for Urine Exosome RNA Isolation Kit (Norgen Biotek Corp., Canada). Initial mean input urine volume was 3 ml. Prior to isolation, urine samples were centrifuged at 1,000 x g, for 10 minutes at RT and stored at 2°C – 8°C until further processing. Two additional centrifugations were then applied, the first at 300 x g, for 10 min., at 15°C, and the second at 2,000 x g, for 10 minutes, at 15°C. Next, supernatant was filtered through a sterile, 0.2 µm PVDF filter (Whatman Puradisc 13mm, GE Healthcare Life Sciences) to 15-ml tube to ensure isolation of vesicles up to 200 nm.

Quality and quantity control of RNA. Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific), and Agilent 2100 Bioanalyzer with Agilent RNA 6000 Pico Kit (alternatively Agilent RNA 6000 Nano Kit, Agilent Small RNA kit) (Agilent Technologies), and Qubit fluorometer (Life Technologies) were employed for assessing quality and concentration of samples.

Detection of expression of microRNAs. Individual TaqMan microRNA assays (Life Technologies) were applied in real-time PCR analyses. Single-stranded cDNA was generated

from total RNA using TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies) following manufacturer's protocol and scaled-down (1/2, total volume 7.5 μ l) reaction volumes. For each sample, the same input of total RNA volume was used. List of microRNA assays used in the experiments is provided in Supplementary Table 3. In the Exosome experiment, RNA input volume in the reverse transcription was increased to 4.6 μ l (in relation to manufacturer's protocol), and cDNA input increased to 1.85 μ l in the amplification reactions (in relation to manufacturer's protocol). PCR amplifications were performed in scaled-down reactions (1/2, total volume 10 μ l) in triplicates (S1 and S2 experiments), or duplicates (Exosome experiment) on the Applied Biosystems 7900HT thermocycler (Life Technologies). No-template controls, no-real-time PCR controls, and inter-plate controls were included in the analyses.

Data processing and statistical analyses. Expression data were captured using SDS 2.4 and RQ 1.2.1 software and processed using primarily Real-time PCR Miner to obtain efficiency-corrected expression data. Relative expressions of microRNAs were calculated as follows. First, adjusted efficiency was calculated. It was $1 + \text{mean efficiency of genes (Real-time PCR Miner)}$, or 2 in Cy0 and delta Ct methods. Next, this adjusted efficiency was powered to Ct (i.e., $(1+E)^{\Delta Ct}$ in Real-time PCR Miner data), or using Cy0, or Ct value.

Geometric mean was calculated for each sample and all miRNAs investigated, and used as the normalization factor in parts calculating logistic regression in preliminary ROC analyses in ovarian and endometrial cancers in S1 and S2 experiments, and in part 3.2 comparing S2 experiment data with Exosome experiment data. Cy0 and delta Ct methods were applied within the verification process (see [23] and Supplementary File Verification). Expression data were log-transformed prior to statistical analyses.

Expression was also calculated as the percentage abundance across the miRNAs investigated within the experiments as the alternative normalization used in the present study. Here, the total miRNA expression was calculated as the sum of the normalized individual miRNAs (i.e., 100%), and a proportion for each miRNA was obtained by dividing its expression by the total expression of selected miRNAs (raw data are presented and applied in statistical processing). Abundance data were not log-transformed in the statistical processing.

Statistical analyses (Mann-Whitney test, Wilcoxon test or paired samples t-test, multivariate regression model) were performed using MedCalc Statistical Software (p-value was set as 0.05).

Results

Urine microRNAs expression in the S1 experiment. As we have shown previously [23], two miRNAs were found to be up-regulated significantly (miR-92a, miR-200b), and

two miRNAs down-regulated significantly (miR-106b, miR-100) in comparison of ovarian cancer samples (UCB310A, UCB315A, UCB318A, and UCB417A) plus fallopian tube cancer (UCB902A) and controls in S1 experiment. The investigated miRNAs were miR-21, miR-223, miR-92a, miR-200b, miR-16, miR-29a, miR-367, miR-106b, miR-100, miR-20a and miR-1228. Up-regulation of miR-92a, miR-200b and down-regulation of miR-106b was found in sample sets involving only serous ovarian cancers and serous ovarian cancers along with fallopian tube cancer, and extended serous ovarian cancer set including post-chemotherapy sample UCB425C (as this patient suffered from recurrence). In all these mentioned combinations, miR-100 could not be confirmed as down-regulated significantly. Similarly, further extending data set with UCP 5 and UCP 12 ovarian cancer samples resulted in a confirmation of results for miR-106b and miR-200b (miR-92a was not assessed in S2 experiment), but not for miR-100 (see [23]). As regards miR-200b, this miRNA could not be confirmed as up-regulated significantly in the verification process (alternative processing algorithms and normalization procedures, see Supplementary File Verification).

In the present study, we performed several other analyses to further explore the data of the S1 experiment. First, we tested combined expression of two selected miRNAs pairs (ratio miR-92a/106b, miR-92a/miR-100) in comparison of ovarian cancer samples (UCB310A, UCB315A, UCB318A, and UCB417A) plus fallopian tube cancer (UCB902A) and controls. In these miRNAs ratio-based combinations, there was a significant difference between pre-surgery cancer samples and controls ($P = 0.0027$). *Note: This ratio-based combination of miRNAs expression differs from the combined expression calculated in the MedCalc module (see later).*

We next sought, whether diagnostic accuracy in terms of correct classification within ROC analysis of the obtained data indicates the promising diagnostic potential of the miRNAs investigated. We performed preliminary tests (more samples should be included to be more conclusive) on correctness of classification and ROC analysis using logistic regression module (MedCalc). These results confirmed the exceptional position of down-regulated miR-106b (AUC 0.969, 95% CI 0.764 to 1.000) and miR-100 (AUC 0.846, 95% CI 0.601 to 0.970), and up-regulated miR-92a (AUC 1.000, 95% CI 0.815 to 1.000) and miR-200b (AUC 1.000, 95% CI 0.782 to 1.000) as it was discovered in previous analyses, also as good classifiers for cancer samples (Supplementary Table 4). We applied a multivariate regression model and combined expression data for miR-106b/miR-100, and miR-100/miR-92a. This approach improved correct classification to 100% and AUC to 1.000 (Supplementary table 4).

Further, we analysed the microRNAs abundance and differences in proportions between the pre-surgery cancer and control samples within the applied miRNAs set (expression of all the miRNAs investigated was set to 100%). This is to illustrate the different relative proportions of particular miRNAs within urine samples, which cannot be observed in otherwise

presented data (e.g. fold differences, or normalized expression). We also used this approach to test the performance when analysing raw abundance data (%) in comparison with previously applied standard processing procedures (normalized data) and verifications.

Using raw abundance data (%), two miRNAs (miR-106b and miR-1228) appeared to be the most abundant miRNAs, both with a decrease observed in cancer samples. Other investigated miRNAs had remarkably decreased relative proportion in samples. Relative miRNA abundances in S1 experiment are depicted in Figure 1. Fold-differences of cancer samples and control samples based on percentage abundance are given in Supplementary Figure 1.

Interestingly, when the raw abundance data (not log-transformed) were analysed statistically between ovarian cancer (additionally also with fallopian tube) and control samples, three miRNAs, i.e. miR-92a ($P = 0.0013$ incl. tube, $P = 0.0032$ excl. tube), miR-200b ($P = 0.0013$ incl. tube, $P = 0.0032$ excl. tube) and miR-16 ($P = 0.0433$ incl. tube, $P = 0.0894$ excl. tube, here non-significantly) appeared significantly up-regulated, however miR-106b was not found significantly down-regulated (even after the log-transformation of data). Expression of miR-92a was found up-regulated in concordance with normal data processing and verifications. However, it should be noted that miR-106b was found down-regulated both in standard data processing and confirmed in data verifications (see Supplementary File Verification). In case of miR-200b, this was

found up-regulated partially in the verification, while miR-16 was not found de-regulated in the verification.

In the S2 Experiment, the results based on relative (percentage) abundance appeared in congruence with the other results (see later). It may indicate that using percentage abundance may be congruent with other results in some cases, but it may be possibly affected by normalization procedures (e.g., in our case of miR-106b geo-mean normalization in standard procedure in contrast to raw abundance data). Combination of various procedures should be preferred to obtain more comprehensive and reliable picture on expression de-regulations. Nevertheless, we intended to show these data both for the overall abundance overview and their potential to exhibit clear differences in expression when a relative small set of miRNAs is being investigated.

Urine microRNAs expression in the S2 experiment. Differences in microRNA expression (miR-21, miR-223, miR-200b, miR-16, miR-29a, miR-367, miR-106b, miR-100, miR-20a and miR-1228) between ovarian cancer, endometrial cancer, and control samples have been studied previously [23]. In both cancer groups, only the down-regulated expression of miR-106b was statistically significant. In various combinations of ovarian cancer samples, miR-106b retained capacity to discriminate cancer samples from control samples: a) UCB315A, UCB318C (post-surgery, post-chemotherapy), UCP12, and mixed ovarian and endometrial cancer UCP5 ($P = 0.0036$), b) UCB315A, UCB318C, UCP12 ($P = 0.0094$) and c) UCB315A and UCP12 ($P = 0.0285$) [23].

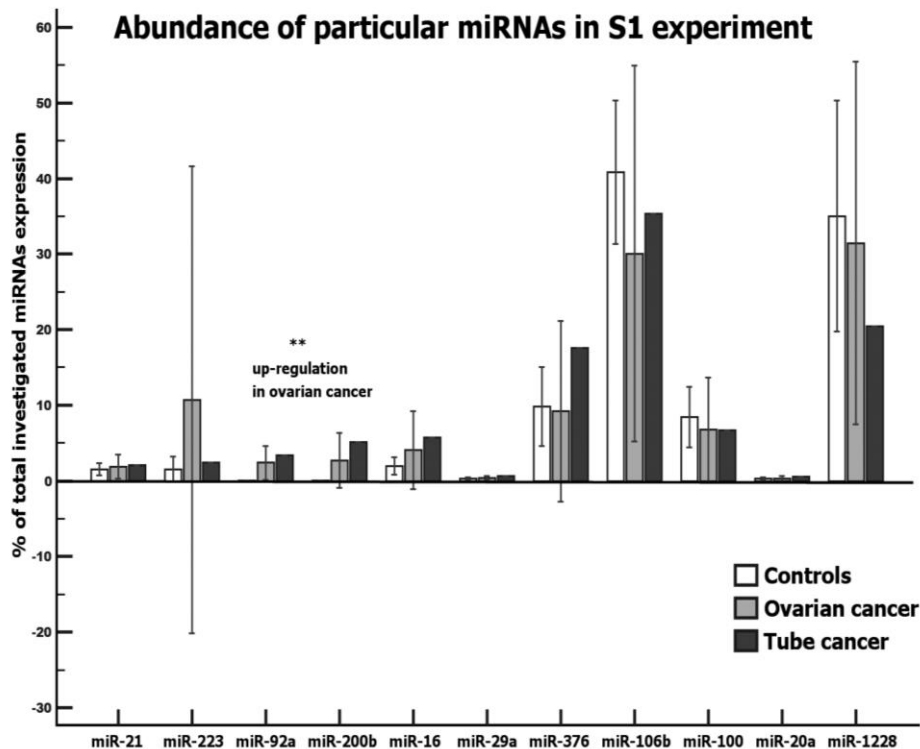


Figure 1. Percentage abundance of particular miRNAs within the S1 experiment including ovarian cancer, fallopian tube cancer and controls. Error bars indicate 95% CI for the mean.

In a preliminary logistic regression model applied in the present study in ovarian cancer (samples UCB315A, DCUCB318C, DCUCP5, UCP12), miR-106b was able to classify correctly 100% cases, with good performance found in preliminary ROC analysis (AUC 1.000, s.e. 0.000, 95% C.I. 0.794 to 1.000). Multiple logistic regression model (MedCalc) was then applied to identify combinations of miRNAs to improve the percentage of a correct classification. Here, a combination of miR-100 and miR-367 resulted in 86.67% correct classification (AUC 0.944, s.e. 0.0648, 95% C.I. 0.696 to 0.999).

In endometrial cancer (samples UCP8, UCP9, UCP11, UCP13, UCP15) and controls, a preliminary logistic regression model confirmed the good classification status for miR-106b (88.24% correct classification, AUC 0.983, s.e. 0.0261, 95% C.I. 0.777 to 1.000). Multiple logistic regression model (MedCalc) revealed a combination of miR-106b either with miR-21, miR-200b, or miR-29a to improve correct classification to 100% (AUC 1.000, s.e. 0.000, 95% C.I. 0.805 to 1.000 in all the combinations). Another combination, miR-21 with miR-29a was also acceptable (correct classification 88.24%, AUC 0.967, s.e. 0.0415, 95% C.I. 0.750 to 1.000). It should be emphasized that more samples should be included to provide ROC analyses more reasonable and conclusive. Thus, these data should be considered particularly as illustrative.

Fold-differences identified in pathological samples in contrast to controls based on percentage abundance are illustrated in Supplementary Figure 2.

Next, we explored the microRNAs abundance and differences in proportions between the pre-surgery cancer and control samples within the applied miRNAs set (expression of all the miRNAs investigated was set to 100%). In control samples, miR-106b and miR-1228 appeared as the most abundant (Figure 2). In pathological samples, the abundance of particular miRNAs varied extensively, but miR-1228 was expressed most abundantly (see Figure 2).

Similarly as in S1 Experiment, we explored the performance of raw abundance data (%) in statistical analyses of S2 Experiment. In ovarian cancer (samples 315A, 318C, UCP5, UCP12), we found miR-106b significantly down-regulated ($P = 0.0153$), along with miR-367 significantly up-regulated in ovarian cancer samples ($P = 0.0203$). In case of miR-106b, this result is congruent with standard normalized and log-transformed data and verifications. However, in miR-367 this could not be confirmed in either alternative data processing previously (see Supplementary File Verification).

In endometrial cancer (samples UCP 8, 9, 11, 13, 15), we found miR-106b significantly down-regulated ($P = 0.0061$), while miR-21 was shown up-regulated significantly ($P = 0.0350$). In case of miR-106b, the results are corresponding with standard normalized and log-transformed data and verifications. In miR-21, this result is in line with different verification procedures (see Supplementary File Verification).

Differences between cancer groups and controls using exosomal miRNAs. We could not find any significant dif-

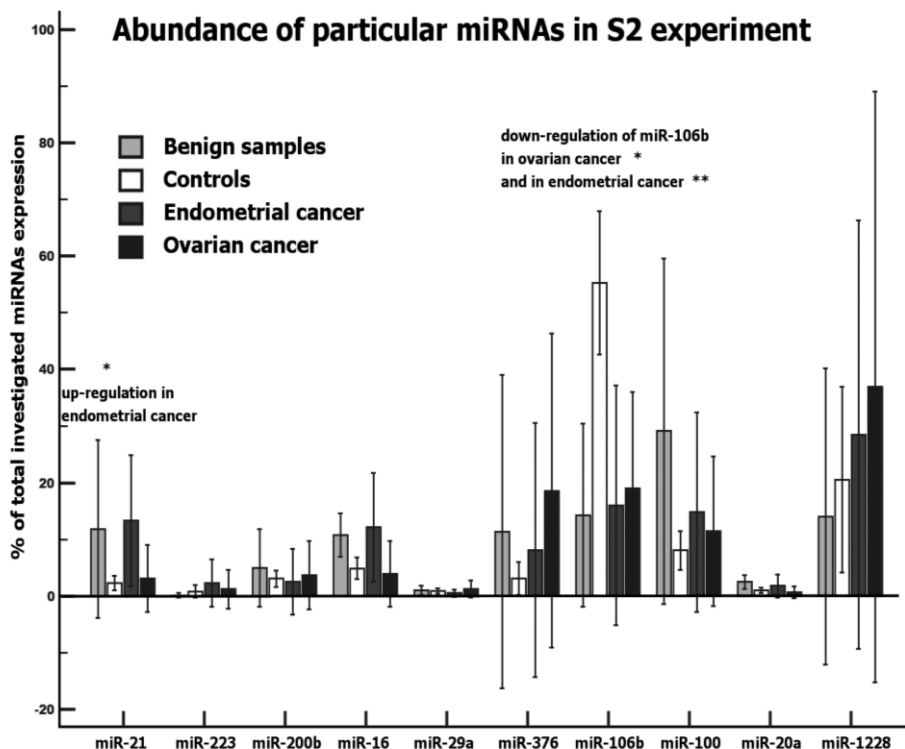


Figure 2. Percentage abundance of particular miRNAs within the S2 experiment including ovarian cancer, endometrial cancer, benign and control samples. Error bars indicate 95% CI for the mean.

ferences between pathological samples (particularly ovarian and endometrial cancers) and control samples using exosomal miRNAs, while using supernatant miRNAs the results were more promising (see above and in [23]). This may implicate that different isolation procedures and/or the differences in the miRNA content themselves may affect the results so that one methodology (supernatant) may be superior to another methodology (exosomes) in particular miRNAs. In our case, these effects resulted in the impossibility to find significant deregulation in miRNA expression in any combination of pathological samples and controls using exosomal miRNAs. However, with respect to a limited number of samples and a selection of several candidate miRNAs, we cannot conclude that exosomal miRNAs are generally less suitable for diagnostic purposes. In the expression analyses, exosomal miRNAs were expressed; however, many missing values affected the analyses negatively. However, we did observe differences in miRNAs abundance and fold differences in their expression between the pathological samples and controls (Figure 3), and Supplementary Table 5 (ovarian cancer), Supplementary Table 6 (endometrial cancer), Supplementary Table 7 (other diagnoses), Supplementary Table 8 (controls), and Supplementary Table 9 (fold differences to control samples). In additional diagnoses (Supplementary Table 1), insufficient number of cases for one particular diagnosis disabled to perform reasonable statistics (pathological samples versus controls), in contrast to ovarian cancer, endometrial cancer, and benign samples.

Therefore, these data are treated here only as differences in the percentage abundance and fold differences.

In our pilot study, we could not find statistically significant differences between pre- and post-surgery ovarian cancer samples using supernatant fractions [23]. However, this does not mean that the differences do not exist at all. As regards these effects in exosomal miRNAs, we were limited by a low number of available samples. However, we observed significant increases and decreases between the pre- and post-surgery samples of malignant granulosa tumor of ovary (UCB331, see Supplementary Table 7). We observed also the changes in expression within the course of therapy in UCB322 (see Supplementary Table 7).

With respect to generally limited information on urinary miRNAs regarding the menopausal status of patients, we included in the Exosome experiment also two pre-menopausal groups of patients (using and not using the hormonal contraception, pooled urine samples isolated), in addition to post-menopausal control patients used as controls for post-menopausal pathological samples in all experiments. Interestingly, the preliminary data showed differences involving decreases and increases in relative expression and percentage abundance (see Supplementary Table 8). The limited number of samples does not allow making definite conclusions. However, it is probable that hormonal status of patients may affect the results and should be considered while involving patients as controls in the miRNAs studies based

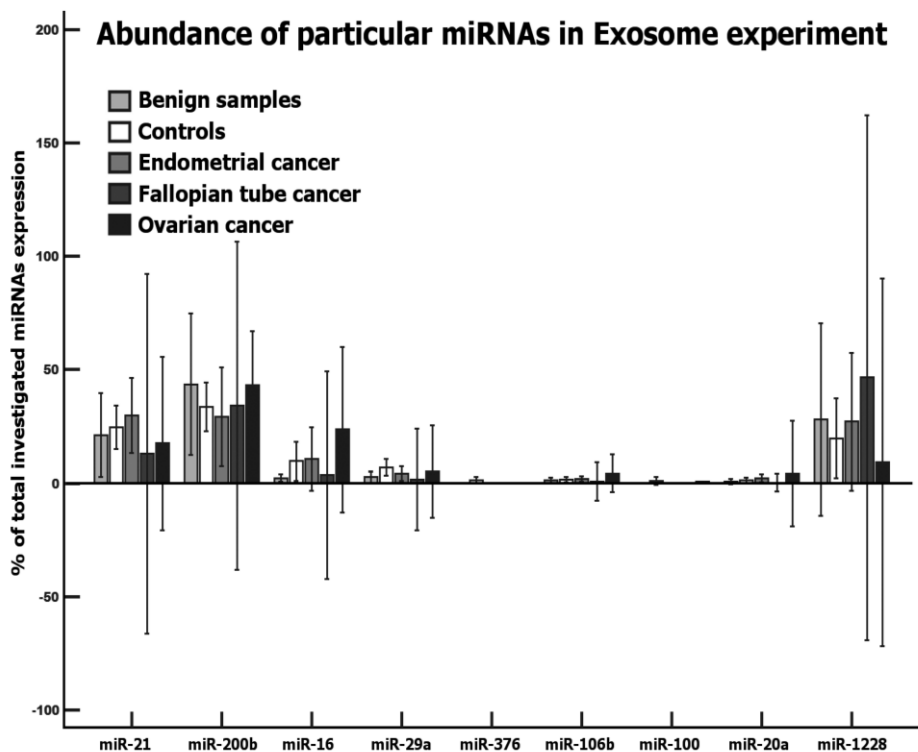


Figure 3. Percentage abundance of particular miRNAs within the Exosome experiment including ovarian cancer, endometrial cancer, benign and control samples. Error bars indicate 95% CI for the mean.

on body fluids. Further research is warranted to elucidate these factors in detail.

Despite interesting expression pattern of exosomal urinary miRNAs, the differences could not be evaluated as the significant changes between cancer and control samples. Therefore, we decided to further inspect the differences between the same samples isolated either as supernatant, or exosomal fraction of urine. As supernatant fraction yielded promising and significant diagnostic differences in contrast to exosomal fraction, we expected that the differences between the fractions may be attributed to a different composition of fractions rather than to be a technical issue. The results of this approach are presented in the next section.

Impact of isolation procedure on results: S2 experiment versus Exosome experiment. We compared results from two experiments using the supernatant (S2 experiment) and exosomal RNA (Exosome experiment) coming from the same urine samples and geometric mean-normalized data. When analysing pathological samples (UCP5, UCP7 to UCP15, $n = 10$) isolated in S2 and Exosome experiments, there was miR-200b up-regulated in the exosomal fraction ($P = 0.0078$, Supplementary Figure 3), and miR-16 ($P = 0.0020$, Supplementary Figure 4) along with miR-106b ($P = 0.0078$, Supplementary Figure 5) down-regulated in the exosomal fraction, other four tested miRNAs (miR-21, miR-29a, miR-20a, and miR-1228) remained unchanged statistically.

We analysed also the performance of control samples (UN9, 10, 11, 13, 32, 33, 41, 42, 44, $n = 9$) in a comparison of S2 and Exosome experiments. Here, we found higher expression of miR-21 ($P = 0.0006$, Supplementary Figure 6), miR-200b ($P = 0.0005$, Supplementary Figure 7), and miR-29a ($P = 0.0032$, Supplementary Figure 8) isolated as exosomal miRNAs in comparison with S2-isolated samples. miR-106b appeared as down-regulated in exosomal fraction ($P < 0.0001$, Supplementary Figure 9) while miR-20a, miR-16 and miR-1228 did not differ significantly between S2 and Exosome experiments.

Discussion

Understanding the mechanisms affecting the microRNAs expression and detection belongs to crucial factors necessary for an appropriate interpretation of results of the expression studies. The source of RNA samples may be one of the most important factors. Circulating miRNAs in blood and in other body fluids such as urine may reflect the impact of many cells and body compartments contributing to a global miRNA expression (reviewed in [22]). Therefore, it is very difficult to ascertain the particular source of hundreds of miRNAs and their clear relationship to a pathological state such as cancer.

Many miRNA expression studies have been focused on the expression of exosomal miRNAs, particularly in plasma. However, it should be emphasized that there is a limited number of studies that identify differences between cell-free fraction and exosomes with respect to the differences in miRNA content and expression. Turchinovich et al. [27]

has suggested that only a very limited proportion of plasma miRNAs is distributed in vesicles such as exosomes. On the contrary, they consider that circulating extracellular miRNAs are mostly (90% to 95%) microvesicle-free and associated with the RNA-binding Argonaute proteins [28].

On the other hand, Cheng et al. [29] indicated both the impact of isolation procedure on exosomal miRNA fraction amount estimates, and also on their expression, in a preliminary study on three patients and their plasma/serum. Comparison of cell-free plasma/serum samples and exosomes isolated by ultracentrifugation or by the commercial kit revealed an enrichment of exosomes with miRNA. The authors also observed high variation in proportions of particular miRNAs in exosomal fractions isolated by the two methods.

As regards urinary miRNAs, there is very limited knowledge on their exact origin as relevant *in vivo* studies are still lacking. Transrenal passage of the miRNAs from the blood could be suspected along with other sources involved in cell-cell communication or passive leakage from the injured or dead cells [30]. Within the vast majority of papers on urine miRNA expression, the focus has been put on the diseases with a direct association with the urological system affected either by cancer or organ dysfunctions and injuries. The cells within the tract and associated with the tumor tissues have been mostly considered as the basis for the assessment of deregulated expression or considered as the basic source of differentially expressed cell-free miRNAs [31-34].

However, urinary miRNAs have been explored in several other diagnoses recently. For example, urinary miR-1 has been shown as the marker for acute myocardial infarction [35], or along with serum as the marker suitable for monitoring open-heart surgeries with cardiopulmonary bypass [36]. Down-regulated expression of miR-203 in urine has been identified as the biomarker for the severity of inflammation in children with atopic dermatitis [37]. The study focused on forty-eight dyspnea STAMPEDE subjects and analyzing bronchoalveolar lavage (BAL), urine and serum identified several candidate miRNAs. For example, miR-371a-5p was found to be similarly overexpressed in BAL, urine and serum [38]. Very recently, Erbes et al. [39] investigated expression of several candidate urinary miRNAs in breast cancer. They sustained the potential role of urinary miRNAs as non-invasive innovative biomarkers for breast cancer detection.

Similarly as a handful of above-mentioned studies, we have suggested a theory that the pathological states may be reflected not only in the blood but eventually in cell-free urine also in other types of diagnoses than those related to urogenital tract. In our case, we focused on gynaecological cancers. As a proof of principle, we have performed a pilot study based on urine of ovarian and endometrial cancers, identifying several candidate miRNAs with a novel diagnostic potential [23]. However, there exist several constraints that should be taken into consideration, e.g. a limited number of patients and candidate miRNAs investigated.

To investigate the differences between supernatant and exosomal fractions, we performed the above-mentioned experiments. There exist, however, several limitations, such as the fact that the supernatant still contained the exosomes and was not exosome-depleted, limited number of samples, one methodology to isolate exosomes. Based on our results, we may conclude that the alternations in expression rather reflect the real differences between the two fractions. Different miRNAs may reveal different expression levels in comparison of the supernatant fraction (S2 experiment) with exosomal fraction (Exosome experiment). The support for this assumption may be found in the distinct expression pattern in miRNAs investigated, including all the changes possible, i.e. increased, decreased and unchanged expression, differing also between the pathological and control samples. This may suggest that particular miRNAs may be enriched or diminished in exosomal fraction of miRNA. It is congruent at least partially with another observation in the preliminary study of Cheng et al. [40] suggesting the enrichment of miRNAs in urinary exosomes in contrast to cell-free urine. The authors also observed differences in the representation of the most up-regulated miRNAs between different methods of exosomal RNA isolation and in contrast to cell-free miRNAs [40].

Conclusions

We have demonstrated that miRNAs may be found down-regulated in cell-free urine of ovarian cancer and endometrial cancer patients. We further explored the differences between the supernatant fraction and exosomal fraction of urine. The aim was to elucidate why supernatant fraction but not the exosomal fraction has exhibited a diagnostic potential. The differences between the fractions regarding the miRNA content may be suspected as one of the main reasons for these observations. There is currently no consensus whether the exosomes or circulating supernatant-based miRNAs should be preferred in investigations searching for novel diagnostic miRNAs. Which portion of the circulating miRNome (supernatant versus exosomal RNA) represents more truly the pathological states and performs better in diagnostic applications thus should be further elucidated.

Our results might indicate that the source of miRNAs should be carefully considered as it may result in the differences in diagnostic performance of particular miRNAs. Moreover, the differences we have observed between three groups of female patients (pre-menopausal using and not using contraceptives, post-menopausal) may indicate the impact of patient's hormonal status on the miRNAs expression in urine. Similarly, other factors such as the isolation procedures, normalization, biological variation, along with the impact of external factors such as food and smoking suggested recently to affect miRNA expression (see [22] for a review) should be further taken into consideration when exploring the diagnostic potential of cell-free miRNAs, either coming from supernatant and/or exosomal fractions of body fluids. We

propose that different isolation techniques using supernatant, exosomes-depleted supernatant, and exosomal fractions of urine should be now explored to establish novel diagnostic urinary miRNA markers in terms of the best diagnostic accuracy for gynaecological cancers. Many obstacles thus remain to be solved prior to introducing cell-free urinary miRNAs as novel diagnostic tools.

Supplementary information is available in the online version of the paper.

Acknowledgements: The financial support from the Charles University Prague (project PRVOUK-P27/LF1/1) and from the Ministry of Health of the Czech Republic (project FNBr 65269705) is appreciated. We would like to express great thanks to Avast Foundation, Ferona, a.s. and CEPS, a.s. for their kind support of our research.

References

- [1] SIEGEL R, MA J, ZOU Z, JEMAL A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer Journal for Clinicians* 2014; 64: 9–29. <http://dx.doi.org/10.3322/caac.21208>
- [2] JEMAL A, BRAY F, CENTER MM, FERLAY J, WARD E et al. Global cancer statistics. *CA Cancer Journal for Clinicians* 2011; 61: 69–90. <http://dx.doi.org/10.3322/caac.20107>
- [3] KURMAN RJ, SHIH IM. Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer-Shifting the paradigm. *Human Pathology* 2011; 42: 918–31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2011.03.003>
- [4] KOSHIYAMA M, MATSUMURA N, KONISHI I. Recent concepts of ovarian carcinogenesis: Type I and type II. *BioMed Research International* 2014; 2014: 934261. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/934261>
- [5] ZAVESKY L, JANCARKOVA N, KOHOUTOVA M. Ovarian cancer: Origin and factors involved in carcinogenesis with potential use in diagnosis, treatment and prognosis of the disease. *Neoplasma* 2011; 58: 457–68. <http://dx.doi.org/10.4149/neo.2011.06.457>
- [6] BURGOS-OJEDA D, RUEDA BR, BUCKANOVICH RJ. Ovarian cancer stem cell markers: Prognostic and therapeutic implications. *Cancer Letters* 2012; 322: 1–7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2012.02.002>
- [7] AHMED N, ABUBAKER K, FINDLAY JK. Ovarian cancer stem cells: Molecular concepts and relevance as therapeutic targets. *Molecular Aspects of Medicine* 2014; 39: 110–125. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2013.06.002>
- [8] MURALI R, SOSLOW RA, WEIGELT B. Classification of endometrial carcinoma: More than two types. *The Lancet Oncology* 2014; 15: e268–e278. [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70591-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70591-6)
- [9] SMITH RA, BROOKS D, COKKINIDES V, SASLOW D, BRAWLEY OW. Cancer screening in the United States, 2013: A review of current american cancer society guidelines, current issues in cancer screening, and new guidance on cervical cancer screening and lung cancer screening. *CA Cancer Journal for Clinicians* 2013; 63: 87–105. <http://dx.doi.org/10.3322/caac.21174>

- [10] VAN JAARSVELD MT, HELLEMAN J, BERNIS EM, WIE-MER EA. MicroRNAs in ovarian cancer biology and therapy resistance. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2010; 42: 1282–90. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2010.01.014>
- [11] NOLEN BM, LOKSHIN AE. Screening for ovarian cancer: Old tools, new lessons. *Cancer Biomarkers* 2010; 8: 177–86.
- [12] LUTZ AM, WILLMANN JK, DRESCHER CW, RAY P, COCHRAN FV et al. Early diagnosis of ovarian carcinoma: Is a solution in sight. *Radiology* 2011; 259: 329–45. <http://dx.doi.org/10.1148/radiol.11090563>
- [13] BREIJER MC, PEETERS JA, OPMEER BC, CLARK TJ, VERHEIJEN RH et al. Capacity of endometrial thickness measurement to diagnose endometrial carcinoma in asymptomatic postmenopausal women: A systematic review and meta-analysis. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 2012; 40: 621–9. <http://dx.doi.org/10.1002/uog.12306>
- [14] FAMBRINI M, SORBI F, SISTI G, CIONI R, TURRINI I ET AL. Endometrial carcinoma in high-risk populations: Is it time to consider a screening policy? *Cytopathology* 2014; 25: 71–7. <http://dx.doi.org/10.1111/cyt.12131>
- [15] ZAVESKY L, JANDAKOVA E, TURYNA R, LANGMEIEROVA L, WEINBERGER V ET AL. microRNAs in diagnosis of ovarian cancer. Potential, Challenges, Pitfalls, in *Ovarian Cancer: Risk Factors, Therapies and Prognosis*. Nova Science Publishers, 2015, in press.
- [16] MACUKS R, BAIDEKALNA I, DONINA S. Urinary Concentrations of Human Epididymis Secretory Protein 4 (He4) in The Diagnosis of Ovarian Cancer: A Case-Control Study. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2012, 13: 4695–4698. <http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.2012.13.9.4695>
- [17] PETRI AL, SIMONSEN AH, YIP TT, HOGDALL E, FUNG ET et al. Three new potential ovarian cancer biomarkers detected in human urine with equalizer bead technology. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica* 2009; 88: 18–26. <http://dx.doi.org/10.1080/00016340802443830>
- [18] ZVARIK M, MARTINICKY D, HUNAKOVA L, LAJDOVA I, SIKUROVA L. Fluorescence characteristics of human urine from normal individuals and ovarian cancer patients. *Neoplasma* 2013; 60: 533–537. http://dx.doi.org/10.4149/neo_2013_069
- [19] BIRKOVA A, GRESOVA A, STEFFEKOVA Z, KRAUS V, OSTRO A et al. Changes in urine autofluorescence in ovarian cancer patients. *Neoplasma* 2014; 61: 724–731. http://dx.doi.org/10.4149/neo_2014_088
- [20] IORIO MV, CROCE CM. MicroRNA dysregulation in cancer: Diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Molecular Medicine* 2012; 4: 143–59. <http://dx.doi.org/10.1002/emmm.201100209>
- [21] WEBER JA, BAXTER DH, ZHANG S, HUANG DY, HUANG KH et al. The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids. *Clinical Chemistry* 2010; 56: 1733–1741. <http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2010.147405>
- [22] ZAVESKY L, JANDAKOVA E, TURYNA R, LANGMEIEROVA L, WEINBERGER V et al. New perspectives in diagnosis of gynaecological cancers: Emerging role of circulating microRNAs as novel biomarkers. *Neoplasma* 2015; 62(4): 509–520. http://dx.doi.org/10.4149/neo_2015_062
- [23] ZAVESKY L, JANDAKOVA E, TURYNA R, LANGMEIEROVA L, WEINBERGER V et al. Evaluation of cell-free urine microRNAs expression for the use in diagnosis of ovarian and endometrial cancers. A pilot study. *Pathology Oncology Research* 2015. <http://dx.doi.org/10.1007/s12253-015-9914-y>
- [24] ZHOU J, GONG G, TAN H, DAI F, ZHU X et al. Urinary microRNA-30a-5p is a potential biomarker for ovarian serous adenocarcinoma. *Oncology Reports* 2015; 33: 2915–2923. <http://dx.doi.org/10.3892/or.2015.3937>
- [25] ZHANG DZ, LAU KM, CHAN ES, WANG G, SZETO CC et al. Cell-Free Urinary MicroRNA-99a and MicroRNA-125b Are Diagnostic Markers for the Non-Invasive Screening of Bladder Cancer. *PLOS ONE* 2014, 9, Article Number: e100793, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0100793>
- [26] MLCOCHOVA H, HEZOVA R, STANIK M, SLABY O. Urine microRNAs as potential noninvasive biomarkers in urologic cancers. *Urologic Oncology-Seminars and Original Investigations* 2014; 32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.urolonc.2013.04.011>
- [27] TURCHINOVICH A, WEIZ L, LANGHEINZ A, BURWINKEL B. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Research* 2011; 39: 7223–33. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkr254>
- [28] TURCHINOVICH A, CHO WC. The origin, function and diagnostic potential of extracellular microRNA in human body fluids. *Frontiers in Genetics* 2014; 5 (Article 30). <http://dx.doi.org/10.3389/fgene.2014.00030>
- [29] CHENG L, SHARPLES R, SCICLUNA BJ, HILL AF. Exosomes provide a protective and enriched source of miRNA for biomarker profiling compared to intracellular and cell-free blood. *Journal of Extracellular Vesicles* 2014; 3, <http://dx.doi.org/10.3402/jev.v3.23743>
- [30] YANG X, GREENHAW J, SHI Q, SU Z, QIAN F et al. Identification of urinary microRNA profiles in rats that may diagnose hepatotoxicity. *Toxicological Sciences* 2012; 125: 335–44. <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfr321>
- [31] RALLA B, STEPHAN C, MELLER S, DIETRICH D, KRISTIANSEN G et al. Nucleic acid-based biomarkers in body fluids of patients with urologic malignancies. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 2014; 51: 200–31. <http://dx.doi.org/10.3109/10408363.2014.914888>
- [32] YAMADA Y, ENOKIDA H, KOJIMA S, KAWAKAMI K, CHIYOMARU T et al. MiR-96 and miR-183 detection in urine serve as potential tumor markers of urothelial carcinoma: correlation with stage and grade, and comparison with urinary cytology. *Cancer Sci.* 2011; 102: 522–529. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01816.x>
- [33] ARGYROPOULOS C, WANG K, MCCLARTY S, HUANG D, BERNARDO J et al. Urinary MicroRNA Profiling in the Nephropathy of Type 1 Diabetes. *PLoS ONE* 2013; 8: e54662. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0054662>
- [34] WANG N, ZHOU Y, JIANG L, LI D, YANG J et al. Urinary MicroRNA-10a and MicroRNA-30d Serve as Novel, Sensitive and Specific Biomarkers for Kidney Injury. *PLoS ONE* 2012; 7: e51140. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0051140>

- [35] CHENG Y, WANG X, YANG J, DUAN X, YAO Y et al. A translational study of urine miRNAs in acute myocardial infarction. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2012; 53: 668–76. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.08.010>
- [36] ZHOU X, MAO A, WANG X, DUAN X, YAO Y et al. Urine and Serum MicroRNA-1 as Novel Biomarkers for Myocardial Injury in Open-Heart Surgeries with Cardiopulmonary Bypass. *PLoS ONE* 2013; 8(4): e62245. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0062245>
- [37] LV Y, QI R, XU J, DI Z, ZHENG H et al. Profiling of serum and urinary microRNAs in children with atopic dermatitis. *PLoS ONE* 2014; 9: e115448. doi: 10.1371/journal.pone.0115448. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0115448>
- [38] BROWN JN, BREWER HM, NICORA CD, WEITZ KK, MORRIS MJ et al. Protein and microRNA biomarkers from lavage, urine, and serum in military personnel evaluated for dyspnea. *BMC Medical Genomics* 2014; 7: 58. <http://dx.doi.org/10.1186/1755-8794-7-58>
- [39] ERBES T, HIRSCHFELD M, RUCKER G, JAEGER M, BOAS J et al. Feasibility of urinary microRNA detection in breast cancer patients and its potential as an innovative non-invasive biomarker. *BMC Cancer* 2015; 15: 193. doi: 10.1186/s12885-015-1190-4. <http://dx.doi.org/10.1186/s12885-015-1190-4>
- [40] CHENG L, SUN X, SCICLUNA BJ, COLEMAN BM, HILL AF. Characterization and deep sequencing analysis of exosomal and non-exosomal miRNA in human urine. *Kidney International* 2014

3.3.2. Zavesky L, Jandakova E, Weinberger V, Minar L, Hanzikova V, Duskovala D, Zaveska Drabkova L, Svobodova I, Horinek A. Ascites-derived extracellular microRNAs as potential biomarkers for ovarian cancer. *Reproductive Sciences*, 2018. <http://doi:10.1177/1933719118776808>.

Ascites-Derived Extracellular microRNAs as Potential Biomarkers for Ovarian Cancer

Reproductive Sciences
1-13

© The Author(s) 2018

Reprints and permission:

sagepub.com/journalsPermissions.nav

DOI: 10.1177/1933719118776808

journals.sagepub.com/home/rsx



Luděk Závěský, PhD¹, Eva Jandáková, MD², Vít Weinberger, MD, PhD³,
Luboš Minář, MD, PhD³, Veronika Hanzíková⁴, Daniela Dušková, MD, PhD⁴,
Lenka Závěská Drábková, RNDr, PhD⁵, Iveta Svobodová, MSc¹,
and Aleš Hořínek, Ing.¹

Abstract

Ovarian cancer as the most fatal gynecological malignancy is often manifested by excessive fluid accumulation known as ascites or effusion. Ascites-derived microRNAs (miRNAs) may be closely associated with ovarian cancer progression. However, our knowledge of their roles, altered expression, and clinical outcomes remained limited. In this study, large-scale expression profiling of 754 human miRNAs was performed using real-time quantitative polymerase chain reaction and 384-well TaqMan array human miRNA A and B cards to identify differentially expressed miRNAs between extracellular fraction of the ascitic fluid associated with high-grade serous ovarian carcinomas and control plasma. Of the 754 miRNAs, 153 were significantly differentially expressed relative to the controls. Expression of 7 individual miRNAs (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141, miR-429, miR-1290, and miR-30a-5p) was further validated in extended sample sets, including serous, endometrioid, and mucinous subtypes. All miR-200 family members and miR-1290 were conspicuously overexpressed, while miR-30a-5p was only weakly overexpressed. The ability of miRNAs expression to discriminate the pathological samples from the controls was strong. Receiver operating characteristic curve analyses found area under the curve (AUC) values of 1.000 for miR-200a, miR-200c, miR-141, miR-429, and miR-1290 and of AUC 0.996 and 0.885 for miR-200b and miR-30a-5p, respectively. Preliminary survival analyses indicated low expression level of miR-200b as significantly related to longer overall survival (hazard ratio [HR]: 0.25, mean survival 44 months), while high expression level was related to poor overall survival (HR: 4.04, mean survival 24 months). Our findings suggested that ascites-derived miRNAs should be further explored and evaluated as potential diagnostic and prognostic biomarkers for ovarian cancer.

Keywords

ovarian cancer, ascites, microRNA, diagnostic markers, prognostic markers, miR-200a,b,c, miR-141, miR-429, miR-1290, effusion

Introduction

Ovarian cancer is the most fatal gynecological malignancy with high metastatic potential and chemotherapeutic resistance. The disease is usually diagnosed in the advanced stages, leading to high levels of recurrence and substantially reduced survival relative to early diagnosis.¹ Advanced stages are often manifested by ascites or effusion, the excessive accumulation of fluid within the peritoneal, and/or pleural cavity, but this fluid may also occur in early stages. The presence of ascites is a poor prognostic indicator, even in women with stage I/II disease,² but dramatically decreases survival rates in advanced stages.³

Lymphocytes, mesothelial cells, macrophages, and malignant tumor cells (including cancer stem cells) occur in ascitic fluid in an environment of soluble growth factors, cytokines, chemokines, and extracellular matrix fragments.^{4,5} All these biologically active components may be linked to carcinogenesis, invasion, metastatic spread, chemoresistance, and the recurrence of ovarian cancer. Within this environment, the

associated regulatory mechanisms may involve microRNAs (miRNAs) functioning at both cellular and extracellular levels, respectively.

¹ First Faculty of Medicine, Institute of Biology and Medical Genetics, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic

² Institute of Pathology, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic

³ Department of Obstetrics and Gynecology, University Hospital Brno and Masaryk University in Brno, Brno, Czech Republic

⁴ Faculty Transfusion Centre, General University Hospital in Prague, Prague, Czech Republic

⁵ Institute of Experimental Botany, Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic

Corresponding Author:

Luděk Závěský, First Faculty of Medicine, Institute of Biology and Medical Genetics, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Albertov 4, 12800 Prague, Czech Republic.

Email: ludek.zavesky@vfn.cz

MiRNAs are posttranscriptional regulators of gene expression with promising potential in cancer diagnostics, various therapeutic applications, and as novel biomarkers for monitoring the disease progression, predicting the response to treatment or estimating clinical outcomes.⁶⁻⁹ Expression and potential functional roles of ascites-derived miRNAs have been investigated only in a handful of recent pilot studies focused on cancer cells,^{10,11} extracellular miRNAs,¹² or exosomal miRNAs.^{13,14}

However, among the only available studies published up to now and focused on ascitic fluid-derived miRNAs in ovarian cancer, there is no study performing comprehensive large-scale profiling and validation of miRNA expression using entire cell-free fractions of ascitic fluid. Our knowledge of crucial regulatory processes and the roles of miRNAs in pathological fluids associated with ovarian cancer is limited. The aim of the present study was to explore and evaluate the expression of ascites-derived extracellular miRNAs and their possible associations with disease characteristics, cancer progression, and patient outcomes in ovarian cancer.

Material and Methods

Patients

This study was carried out in compliance with the Helsinki Declaration and was approved by a multicentric ethics committee of the General University Hospital in Prague (VFN Praha). All patients provided written informed consents. Patients initially diagnosed with primary ovarian cancer or pelvic mass and treated at the Faculty Hospital in Brno (FN Brno) were enrolled in this study and provided intraoperatively collected samples of ascitic fluid or peritoneal lavages. According to the histopathological examination, the analyzed samples included mostly (~85%) primary ovarian carcinomas (OCs) and partially the indistinguishable samples of either primary ovarian/fallopian tube/peritoneal origin. Patients with mixed-histology ovarian tumors, Brenner tumor, granulosa tumor, recurrent OC, or who had received neoadjuvant chemotherapy treatment before the sampling were suspended from the study due to their limited numbers for relevant conclusions. In total, 18 ascitic fluid samples and 8 peritoneal lavage samples associated with 16 high-grade serous OCs, 1 low-grade serous OC, 1 high-grade fallopian tube/OC (primary site of origin possible either in fallopian tube or in ovary; the sample was analyzed with OCs according to standard clinical practice), 3 high-grade mucinous OCs, 2 high-grade endometrioid OCs, 1 high-grade serous peritoneal carcinoma, and 2 high-grade serous OC/peritoneal carcinoma were analyzed in this study. As a negative control, postmenopausal healthy women (n = 34) provided control blood samples at the Faculty Transfusion Center (VFN Praha). All patients were Caucasians. Clinicopathological characteristics are summarized in Table 1. Sample combinations used in the analyses (validation experiment) are listed in Supplemental Table S1.

Table 1. Clinicopathological Characteristics of Patients.

Parameters (Samples)	Patients (%)
Pelvic carcinoma (ovarian carcinoma, fallopian tube carcinoma, peritoneal carcinoma)	26 (100)
Primary ovarian serous carcinoma	17 (65)
High-grade (A2, A3, A6-9, A11-12, A14, L1, L3-4, L6-9)	16 (62)
Low-grade (L5)	1 (4)
Primary fallopian tube/ovarian high-grade serous carcinoma (A13)	1 (4)
Primary ovarian high-grade mucinous carcinoma (A15-17)	3 (12)
Primary ovarian high-grade endometrioid carcinoma (A18-19)	2 (8)
Primary peritoneal high-grade serous carcinoma (A5)	1 (4)
Primary ovarian/peritoneal high-grade serous carcinoma (A1, A4)	2 (8)
Ascites	18 (69)
Malignant (A1-6, A8-9, A11-19)	17 (65)
Nonmalignant (A7)	1 (4)
Lavage	8 (31)
Malignant (L3-6)	4 (15)
Nonmalignant (L1, L7-9)	4 (15)
Median age	Years (range)
Ascites (A1-9, A11-19)	60 (46-84)
Lavages (L1, L3-9)	62 (31-82)
Lymph node metastasis	
N0 (A5-6, A8, A11, A13, A16, L3-6, L8-9)	12 (46)
N1 (A1-4, A7, A9, A12, A14, A18-19, L1, L7)	12 (46)
Unknown (A15, A17)	2 (8)
Residual tumor	
R0 (no residual tumor; A1, A5-7, A9, A12, A15-16, A19, L3-6, L8)	14 (54)
R1 (≤1 cm; L7, L9)	2 (8)
R2 (>1 cm; A2-4, A8, A11, A13, A17)	7 (27)
Unknown (A14, A18, L1)	3 (12)
FIGO stage	
FIGO I/II (Ib: A7; Ic: A17, L5; IIb: L7; IIc: A13, A14)	6 (23)
FIGO III/IV (IIIa: A12, A16, L8; IIIb: A8, A11, L4, L9; IIIc: A1-3, A5-6, A9, A15, A18-19, L1, L3, L6)	19 (73)
Unknown (A4)	1 (4)
Healthy postmenopausal women	34 (100)
Control plasma (RPI-34, n = 34)	Years (range)
Median age	56 (47-77)

Abbreviations: A, ascites; FIGO, International Federation of Gynecology and Obstetrics; L, peritoneal lavages; RP, control plasma.

Clinical Samples

All samples were collected in special stabilization tubes ensuring inactivation of RNases. Ascitic fluid and ascites-derived lavages (effusions collected with saline solution) were collected in urine preservation tubes (Norgen Biotek, Canada, cat no 18122). Blood samples were collected in cell-free RNA BCT tubes (Streck, Omaha, United States, cat no 218975), and isolated plasma was used as the preferred standard control. Effusions (ascites and lavages) were considered “malignant” in cytologically positive samples (malignant cells present in the fluid) and “nonmalignant” in cytologically negative samples (no malignant cells present in the fluid).

Sample Preparation and Isolation of Total RNA

Pure cell-free fractions were obtained via 2 consecutive centrifugations of the fluids, at 1300g for 15 minutes at room temperature and at 2500g for 10 minutes at 4°C. Total RNA (including exosomal RNA) was isolated using a plasma/serum circulating and exosomal RNA purification maxi kit (slurry format; Norgen Biotek, cat no 50900).

Large-Scale Screening of MiRNA Expression

The screening phase of the study involved large-scale real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) analyses using 384-well TaqMan array human microRNA A and B cards (Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific, Foster City, United States, cat no 4444913) containing assays for 754 unique human miRNAs. A total of 11 samples (5 ascitic fluid samples, A2, A3, A6, A8, and A11 and 6 plasma samples, RP1-6) were initially analyzed using the type A cards. A total of 8 samples (4 ascitic fluid samples, A6, A7, A9, and A11, and 4 plasma samples, RP4-7) were analyzed using type B cards. We analyzed 1 sample per a card (no sample pooling). All pathological samples analyzed in the screening experiment were associated with primary high-grade serous OC.

Validation of Differential MiRNA Expression

With respect to results of the screening phase, 7 single miRNA assays (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141, miR-429, miR-1290, and miR-30a-5p) and 3 endogenous controls (miR-17, miR-93-5p, and miR-425; Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific, Foster City, United States) were used for validating the differential expression in the ascitic fluid and lavage samples relative to the plasma samples. Different combinations of samples were analyzed to increase the reliability of the results and to limit potential bias (Supplemental Table S1).

Reverse Transcription

Total RNA was reverse transcribed into complementary DNA (cDNA) in the screening phase using a TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit and Megaplex RT primers (Human Pool A v2.1 and Human Pool B v3.0; Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific, Foster City, United States). Reverse transcription in the validation phase used the TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit and miRNA-specific RT primers following modified manufacturer's instructions, that is, a scaled-down format (1/2 volume).

Real-Time PCR Amplification

The cDNA samples were preamplified in the screening phase using Megaplex PreAmp primers (Human Pool A v2.1 and Human Pool B v3.0; Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific, Foster City, United States). The reactions contained less nuclease-free water than that in the manufacturer's

protocol (2.5 µL instead 7.5 µL), and the difference was replaced with cDNA. The reaction mix for the RT-PCR amplifications consisted of TaqMan universal PCR master mix, no AmpErase UNG (450 µL), nuclease-free water (430 µL instead of 441 µL in the protocol), and preamplified cDNA (not diluted in Tris-EDTA buffer, a volume of 20 µL instead of 9 µL in the protocol). The RT-PCR amplifications in the validation phase were performed in scaled-down reactions (1/2, total volume of 10 µL) in triplicate in a 96-well MicroAmp optical 96-well reaction plates using Xceed qPCR Probe 2× Mix HI-ROX buffer as a master mix (IAB, Czech Republic, cat no HPCR10502L). The RT-PCR reactions were run using an Applied Biosystems 7900HT fast RT-PCR system thermocycler (Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific, Foster City, United States).

Normalization of miRNA Expression Data

Global means were used in the screening phase to normalize the expression data for the TaqMan array miRNA type A cards. Candidate endogenous controls for the validation phase in this experiment were identified using the geNorm module¹⁵ of qbase+ (Biogazelle, Belgium). Geometric means of miR-378, miR-30e-3p, miR-432, miR-320b, miR-1244, miR-151-3p, and miR-409-3p identified by geNorm were used to normalize the data for the TaqMan array miRNA type B cards because global means did not yield significant results. Three miRNAs suggested by geNorm (miR-17, miR-93-5p, and miR-425) in the screening experiment were further evaluated in the validation phase using geNorm and BestKeeper¹⁶ algorithms, and the geometric means of their expression were used for normalization.

Statistical Analyses

Expression data (log-transformed) were analyzed using qbase+¹⁷ and MedCalc statistical software, version 18.2.1, (bvba, Ostend, Belgium). Data processed in qbase+ were corrected for multiple testing using the Benjamini-Hochberg procedure. Mann-Whitney *U* tests, logistic regression, and receiver operating characteristic (ROC) curve analyses were used to find out fold differences (FD) in expression between pathological and control samples and to evaluate the area under the curve (AUC) values along with percentage of correct classification. Clinicopathological parameters examined were grouped in relation to histological subtype, age, grade, stage, residual tumor, and lymph node metastasis. Kaplan-Meier plots and log-rank tests were used to estimate overall- and progression-free survival in preliminary analyses. Progression-free survival was defined as time from primary surgery/ascitic fluid/lavage sampling until disease progression or death. Overall survival was defined as time from primary surgery/ascitic fluid/lavage sampling until death from any cause or end of follow-up. In the survival analyses, miRNA expression was divided into 2 groups (low expression and high expression) based on median miRNA expression in the representative sample set validation

Table 2. Fold Differences Between Ascitic Fluid and Control Plasma in TaqMan Array MiRNA Type A Cards and Consistently Overexpressed MiRNAs.^a

MiRNA	FD (Ct ≤40)	P	FD (Ct <35)	95% CI Low	95% CI High	P
miR-200a	2 036.958	.011	783.107	157.691	3 888.974	.031
miR-200b	1 155.152	.011	584.179	204.353	1 669.975	.031
miR-200c	520.841	.011	288.326	56.956	1 459.572	.018
miR-204	236.075	.011	130.686	21.831	782.327	.018
miR-141	210.382	.011	116.463	32.515	417.153	.018
miR-203	189.848	.011	105.095	23.807	463.936	.018
miR-193b	151.818	.011	84.043	33.815	208.881	.018
miR-10b	119.503	.011	66.154	5.323	822.118	.031
miR-886-3p	80.169	.011	44.380	7.864	250.449	.018
miR-31	76.314	.011	42.245	18.108	98.560	.018
miR-10a	70.742	.011	39.161	8.569	178.968	.018
miR-452	69.267	.011	38.345	14.573	100.891	.018
miR-99a	59.031	.011	32.678	5.528	193.188	.018
miR-224	37.903	.011	20.982	5.349	82.310	.018
miR-886-5p	25.354	.011	14.035	4.640	42.458	.018
miR-95	24.157	.011	13.373	4.785	37.372	.018
miR-100	20.470	.011	11.332	2.621	48.993	.018
miR-99b	19.011	.011	10.524	5.589	19.815	.018
miR-483-5p	13.933	.011	7.713	2.095	28.403	.018
miR-574-3p	8.514	.011	4.713	3.046	7.293	.018
miR-342-3p	7.054	.011	3.905	2.192	6.957	.018
miR-146b-5p	6.386	.011	3.535	1.993	6.269	.018
miR-155	5.554	.011	3.074	1.773	5.332	.018

Abbreviations: CI, confidence interval; FD, fold difference; miRNA, microRNA.

^aOnly significant differences ($P < .05$) are noted and include miRNAs overexpressed using both Ct cutoffs.

set (VS) VII. P values $< .05$ were considered statistically significant in all statistical tests.

Results

Screening Phase

Using TaqMan array miRNA type A cards, 2 analytical approaches were applied using global mean normalization, that is, analyses including (group 1) or not including (group 2) data points with Ct > 35 (the cutoff value Ct < 35), and miRNA expression was compared between the ascitic fluid and plasma samples.

We identified 134 miRNAs in group 1 that were significantly differentially expressed, with 82 miRNAs underexpressed and 52 miRNAs overexpressed. Twenty-three of the overexpressed miRNAs (Table 2) and 51 of the underexpressed miRNAs (Table 3) were consistently expressed in both groups 1 and 2. Among these miRNAs, the 4 miR-200 family members were notably overexpressed, that is, miR-200a (783-fold), miR-200b (584-fold), miR-200c (288-fold), and miR-141 (117-fold). miR-451 was the most significantly underexpressed miRNA (−1082-fold). Twenty-nine of the overexpressed miRNAs and 31 of the underexpressed miRNAs were significantly differentially expressed only in group 1 (Supplemental Table S2). The most conspicuously differentially expressed miRNA specific to group 1 were the overexpressed miR-135b (31 358-fold) and the underexpressed miR-18a

(−813-fold). Group 2 had 2 overexpressed miRNAs (miR-708, 19-fold; miR-125b, 15-fold) and 7 underexpressed miRNAs (miR-486-3p was underexpressed the most, −15-fold), specifically in this group (Supplemental Table S3).

Using TaqMan array microRNA type B cards, the analysis of miRNA expression using the cutoff Ct < 35 (only this procedure yielded significant results) identified 10 significantly overexpressed miRNAs, with miR-1290 overexpressed the most (89-fold). Nine significantly underexpressed miRNAs were also found, with miR-766 underexpressed the most (−139-fold; for details, see Supplemental Table S4).

Validation Phase

The expression of 7 miRNAs (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141, miR-429, miR-1290, and miR-30a-5p) identified in the screening phase as potential biomarkers was evaluated in the validation phase analyzing different sample combinations (VS I-VIII; see Supplemental Table S1). In these combinations, ascitic fluid and lavages were analyzed either separately or altogether along with various combinations of input samples with respect to histological subtype (high-grade serous carcinomas, endometrioid, mucinous carcinomas), malignancy of ascites (nonmalignant samples in some analyses were excluded), and primarily in comparison with plasma control samples. Alternatively, malignant samples were compared with nonmalignant samples.

Table 3. FDs Between Ascitic Fluid and Control Plasma in TaqMan Array MiRNA Type A Cards and Consistently Underexpressed MiRNAs.^a

MiRNA	Minus FD (Ct ≤40)	P	Minus FD (Ct <35)	95% CI Low (minus)	95% CI High (minus)	P
miR-451	598.843	.011	1 081.769	3 019.676	387.533	.018
miR-185	310.425	.011	260.640	575.569	118.028	.031
miR-15b	138.183	.011	249.618	456.172	136.591	.018
miR-223	131.143	.011	236.902	755.220	74.313	.018
miR-142-3p	106.116	.011	191.692	665.192	55.241	.018
miR-16	101.453	.011	183.268	400.573	83.848	.018
miR-652	86.518	.011	66.579	209.182	21.191	.031
miR-126	76.626	.011	138.420	322.409	59.428	.018
miR-26b	69.606	.011	40.518	75.762	21.669	.031
miR-19a	69.221	.011	80.826	139.057	46.980	.031
miR-20a	45.640	.011	82.446	173.103	39.268	.018
miR-19b	27.853	.011	50.315	87.871	28.810	.018
miR-301a	43.401	.011	34.675	66.850	17.986	.031
miR-20b	26.450	.011	47.780	124.771	18.297	.018
miR-140-5p	25.665	.011	46.362	76.233	28.196	.018
miR-140-3p	25.047	.011	41.931	92.403	19.028	.031
miR-106b	24.881	.011	44.946	81.356	24.831	.018
miR-25	23.222	.011	41.948	74.975	23.470	.018
miR-374a	21.698	.011	39.195	169.944	9.040	.018
miR-93	20.514	.011	37.057	65.974	20.815	.018
miR-192	19.671	.011	35.534	70.411	17.932	.018
miR-29c	18.436	.011	27.388	53.460	14.032	.031
miR-199a-3p	17.559	.036	17.245	72.266	4.115	.031
let-7b	17.498	.011	31.609	105.259	9.492	.018
miR-302b	17.217	.011	31.101	96.755	9.997	.018
miR-17	16.745	.011	30.249	61.102	14.975	.018
miR-532-3p	15.367	.011	8.257	19.703	3.460	.031
miR-590-5p	14.579	.011	26.336	44.049	15.745	.018
miR-208	14.354	.011	25.930	62.696	10.724	.018
miR-486-5p	12.497	.011	22.575	39.935	12.762	.018
miR-425	12.339	.011	22.289	27.030	18.379	.018
miR-145	13.099	.011	16.141	84.504	3.083	.031
miR-195	11.888	.011	21.474	42.774	10.781	.018
miR-324-3p	10.140	.011	18.318	45.336	7.401	.018
miR-454	9.217	.011	16.650	31.566	8.782	.018
miR-30c	9.048	.011	16.345	45.589	5.860	.018
miR-191	7.550	.011	13.639	22.260	8.356	.018
miR-618	6.556	.036	11.843	52.234	2.685	.031
let-7a	6.384	.011	11.532	22.961	5.792	.018
let-7d	6.345	.011	11.462	18.574	7.074	.018
miR-30b	6.009	.036	10.855	30.621	3.848	.018
miR-26a	4.688	.011	8.468	11.945	6.003	.018
miR-221	4.473	.011	8.081	20.841	3.133	.018
miR-194	4.473	.019	8.081	24.977	2.614	.018
miR-181a	4.344	.011	7.847	10.328	5.962	.018
miR-92a	3.762	.036	6.796	14.268	3.237	.018
miR-186	3.518	.011	6.354	9.149	4.413	.018
miR-532-5p	3.303	.011	5.966	8.479	4.198	.018
miR-501-5p	2.886	.011	5.213	7.073	3.842	.018
let-7g	2.643	.036	4.774	10.731	2.123	.018
miR-28-5p	2.328	.011	4.205	7.908	2.236	.018

Abbreviations: CI, confidence interval; FD, fold difference; miRNA, microRNA.

^aOnly significant differences ($P < .05$) are noted and include miRNAs underexpressed using both Ct cutoffs.

Remarkably, the similar expression pattern, that is, all miRNAs of the miR-200 family and miR-1290 with strongly increased expression, and miR-30a-5p with weakly increased expression, was observed across all sample combinations, independently on the fluid type (ascitic fluid vs lavage) or histological subtype (serous, mucinous, and endometrioid carcinomas). The results obtained in the validation phase were consistent with the screening phase except for miR-30a-5p. This miRNA was underexpressed in cancer samples in comparison with control samples in the

screening phase but was only weakly overexpressed in the validation phase.

Validation Set I

In this sample combination, primary high-grade serous OCs (malignant ascites) were compared with postmenopausal control plasma samples.

The expression of miR-200 family ranged from 1698-fold (miR-200c) to 3657-fold (miR-200a) when comparing malignant ascitic fluid-derived miRNAs of high-grade serous OCs to control plasma-derived miRNAs (Supplemental Table S1). In this comparison, increased expression of miR-1290 was also notable (1535-fold). On the contrary, the lowest fold-difference was observed for miR-30a-5p (4.7-fold; for details, see Table 4).

Validation Set II

In this sample combination, primary serous OCs (~88% high-grade peritoneal lavages) were compared with postmenopausal control plasma samples.

Independent evaluation of ascitic fluid-derived miRNAs collected as peritoneal lavages (mostly high-grade, serous OCs) and compared with plasma controls (Supplemental table S1) revealed similar results and miR-200a exhibited the most increased expression (1905-fold). Interestingly, the fold-differences of other miR-200 family members were mostly lower, while fold-difference for miR-1290 was almost 2-fold higher in comparison with VS II to the VS I results (for details, see Table 4). The congruent results obtained for ascites and peritoneal lavages suggest that both types of samples are usable for this kind of research.

Validation Set III

In this sample combination, primary serous OCs (~88% high-grade malignant peritoneal lavages) were compared with non-malignant peritoneal lavages.

In an effort to further evaluate the potential differences between malignant and nonmalignant effusions (the latter used in some other investigations as controls), we compared the expression of 4 malignant lavages with 4 nonmalignant lavages (mostly high-grade serous OCs; Supplemental Table S1). There was limited number of nonmalignant effusions for definite conclusions. However, no significant differences were found for the validated miRNAs. Nonsignificantly decreased expression was found for the 4 investigated miRNAs (miR-429, miR-1290, miR-200a, and miR-30a5p), and non-significantly increased expression was noted for miR-200c, miR-200b, and miR-141, in comparison with malignant versus nonmalignant samples (for details, see Table 4). It could be assumed that the absence of malignant cells in the effusion itself is a poor indicator of nonmalignant status of the fluid particularly in otherwise malignant disease. This also limits the usability of such samples as controls.

Table 4. Fold-Differences Between Ascitic Fluid/Lavages Versus Control Plasma in Validation of MiRNAs Expression.^{a,b}

	FD	95% CI Low	95% CI High	P
miR-200c				
VS I	1697.61	1045.67	2756.03	.00000000
VS II	469.82	302.57	729.54	.00000002
VS III	2.34	0.42	13.02	.60000000
VS IV	691.93	383.44	1248.64	.00370370
VS V	1525.91	964.08	2415.16	.00030030
VS VI	1398.10	883.85	2211.56	.00000000
VS VII	930.21	610.78	1416.72	.00000000
VS VIII	1480.83	761.33	2880.31	.00036036
miR-429				
VS I	2417.14	1250.19	4673.36	.00000000
VS II	474.00	241.40	930.73	.00000002
VS III	0.71	0.09	5.44	.88571429
VS IV	770.22	243.74	2433.91	.00370370
VS V	2584.94	1004.34	6653.04	.00030030
VS VI	1340.75	679.98	2643.59	.00000000
VS VII	1188.40	694.39	2033.86	.00000000
VS VIII	1008.73	390.88	2603.20	.00036036
miR-200b				
VS I	1815.73	976.38	3376.65	.00000000
VS II	288.84	114.60	728.00	.00000014
VS III	7.78	0.22	281.35	.60000000
VS IV	603.16	192.13	1893.52	.00370370
VS V	2121.98	839.22	5365.48	.00030030
VS VI	1411.73	799.93	2491.45	.00000000
VS VII	814.76	422.52	1571.15	.00000000
VS VIII	781.35	304.92	2002.23	.00036036
miR-141				
VS I	1734.82	824.83	3648.75	.00000000
VS II	464.51	233.08	925.70	.00000002
VS III	2.39	0.54	10.62	.60000000
VS IV	270.13	75.63	964.83	.00370370
VS V	648.83	232.76	1808.62	.00030030
VS VI	1337.81	674.68	2652.71	.00000000
VS VII	777.70	447.44	1351.74	.00000000
VS VIII	733.95	255.50	2108.41	.00036036
miR-1290				
VS I	1534.58	432.08	5450.26	.00000000
VS II	2917.32	945.20	9004.18	.00000002
VS III	0.23	0.01	8.91	.68000000
VS IV	635.74	95.61	4227.15	.00370370
VS V	3857.60	895.22	16622.77	.00030030
VS VI	1928.90	624.29	5959.87	.00000000
VS VII	2194.90	869.27	5542.06	.00000000
VS VIII	57.73	10.45	319.02	.03063063
miR-200a				
VS I	3656.88	1732.58	7718.42	.00000000
VS II	1905.00	899.37	4035.08	.00000002
VS III	0.92	0.24	3.47	.88571429
VS IV	1752.96	414.66	7410.53	.00370370
VS V	3801.85	1175.54	12295.72	.00030030
VS VI	2787.28	1419.00	5474.94	.00000000
VS VII	2630.97	1597.79	4332.23	.00000000
VS VIII	837.08	254.92	2748.77	.00036036
miR-30a-5p				
VS I	4.72	2.77	8.06	.00033592
VS II	2.26	1.28	3.96	.00186986
VS III	0.23	0.03	1.91	.60000000

(continued)

Table 4. (continued)

	FD	95% CI Low	95% CI High	P
VS IV	1.71	0.87	3.38	.01904762
VS V	2.30	1.30	4.07	.00283140
VS VI	3.19	1.79	5.71	.00090527
VS VII	3.25	2.03	5.18	.00000098
VS VIII	1.26	0.72	2.19	.14800515

Abbreviations: CI, confidence interval; FD, fold difference; miRNA, microRNA; VS, validation set.

^aSample combinations are listed in Supplemental Table S1.

^bP values <.05 were considered statistically significant. Nonsignificant results are indicated in italics.

Validation Sets IV and V

In these sample combinations, primary endometrioid OCs (ascitic fluid, VS IV) and primary mucinous OCs (ascitic fluid, VS V) were compared with postmenopausal control plasma samples.

Evaluation of miRNA expression showed that both endometrioid (VS IV) and mucinous (VS V) subtypes (Supplemental Table S1) have similar expression pattern, as it was observed in VS I in high-grade serous samples. Of note, the expression was higher in mucinous samples as compared to endometrioid samples (for details, see Table 4).

Validation Sets VI and VII

In these sample combinations, primary high-grade serous OCs (malignant ascites and malignant lavages, VS VI) and primary OCs of serous, endometrioid, and mucinous subtypes (VS VII), ascites and lavages (both malignant and nonmalignant), were compared with postmenopausal control plasma samples.

In both VS VI and VS VII (Supplemental Table S1), miR-200 family members and miR-1290 were highly expressed, and miR-30a-5p had significantly but weakly (~3-fold) elevated expression in both sample combinations (for details, see Table 4).

Validation Set VIII

In this sample combination, primary OC/peritoneal carcinoma (ascitic fluid) were compared with postmenopausal control plasma samples.

In some cases, the primary origin of advanced serous pelvic carcinoma may be either in the ovary or in the peritoneum, and it is impossible to identify the exact primary site. Two such samples (A1 and A4—high-grade serous carcinomas) were combined with A5 (primary serous peritoneal carcinoma) in the VS VIII, and their expression was compared with plasma controls. Highest overexpression of all miR-200 family members (range 734-fold in miR-141 to 1481-fold in miR-200c) in pathological samples was accompanied with remarkably less elevated expression of miR-1290 (58-fold), and almost unchanged expression of miR-30a-5p (FD = 1.3; for details, see Table 4).

Logistic Regression and ROC Curve Analysis (Ovarian Cancer vs Control Plasma)

The ability of particular miRNAs to discriminate samples of all subtypes of OCs (VS VII, malignant and nonmalignant samples of ascitic fluid and lavages, n = 23) from control plasma samples (RP1-34, n = 34), was evaluated using logistic regression and ROC curve analyses. Expression of individual miR-141, miR-200a, miR-200c, miR-429, and miR-1290 was able to correctly classify 100% of the samples, with an AUC of 1.000. miR-200b (96.49% correct classification, AUC: 0.996) also performed well. The AUC for miR-30a-5p was 0.885, with 87.72% correct classification.

Associations of MiRNA Expression With Clinicopathological Data

In representative sample set VS VII, miRNAs expression did not vary significantly with histological subtype, age, grade, stage, residual tumor, or lymph node metastasis.

Impact of MiRNA Expression Level on Survival

In the representative sample set VS VII (n = 22 with available survival data), the follow-up time (and overall survival in weeks) for the patients ranged between 1 and 226 weeks (mean 103 weeks, 95% confidence interval [CI]: 79-126; median 106 weeks, 95% CI: 70-132). Progression-free survival ranged between 1 and 178 weeks (mean 80 weeks, 95% CI: 60-99; median 70 weeks, 95% CI: 61-104). Of the 22 patients, 13 (59%) have died within the follow-up. Of the remaining 9 patients alive, 3 (33.3%) have been reported with the recurrence of the disease.

Kaplan-Meier survival estimates and log-rank models for both progression-free survival and overall survival, respectively, were performed to assess the predictive value of miRNA expression and clinical outcome in low and high expression groups for each miRNA. These groups were defined by median expression using log-transformed expression value (qbase+, calibrated normalized relative quantities [CNRQ] values) for the samples in VS VII group.

No significant association of miRNA expression was found for progression-free survival. On the contrary, miR-200b expression was significantly associated with overall survival (log-rank test, $P = .019$). Low expression level of miR-200b (<1.428 log-transformed CNRQ value) was associated with improved survival (hazard ratio [HR]: 0.25, 95% CI: 0.083-0.737, mean survival \pm standard error [SE]: 44.2 \pm 6.1 months), while high expression level was associated with worsened survival (HR: 4.043, 95% CI: 1.356-12.051, mean survival \pm SE: 24.2 \pm 3.6 months; Figure 1).

Discussion

Extracellular MiRNAs as Novel Biomarkers

MiRNAs are small (~22 nucleotides in length), endogenously expressed molecules of single-stranded noncoding RNA

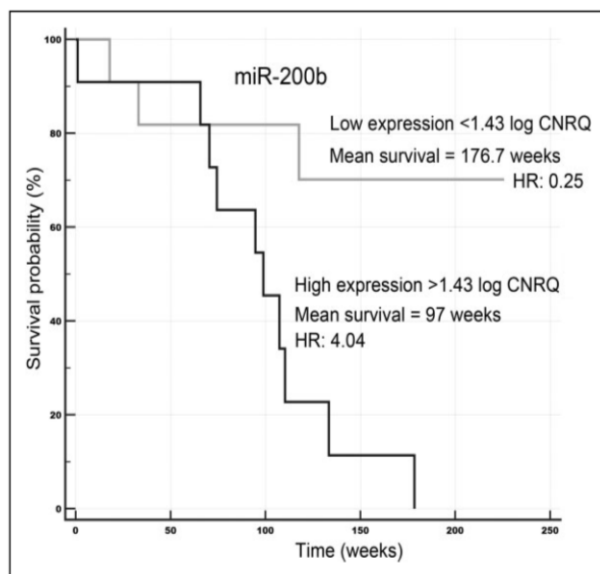


Figure 1. Overall survival in relation to miR-200b expression levels. Univariate Kaplan-Meier survival curves related to low and high concentrations of ascites-derived miR-200b in ovarian cancer VS VII group ($n = 22$), including ascites and lavages of primary ovarian carcinomas (serous, endometrioid, and mucinous subtypes). For details on used samples, see Supplemental Table S1. VS indicates validation set.

undergoing rapid turnover beginning with the transcription of their encoding genes in the nucleus, processing of the transcripts, their transport and localization, and functioning as the key posttranscriptional regulators of gene expression until their final degradation.^{7,18} However, in addition to cellular miRNAs, there is another remarkable fraction of miRNAs, occurring outside the cells. Several years ago, extracellular miRNAs have been detected in an extensive set of 12 body fluids (blood plasma, urine, breast milk, colostrum, saliva, seminal fluid, tears, amniotic fluid, cerebrospinal fluid, pleural fluid, and peritoneal fluid).¹⁹ Since then, extracellular miRNAs (generally known in a simplified way as circulating, c-miRNAs, or under somewhat confusing term cell-free miRNAs) have emerged as novel potential biomarkers for many diseases, including cancer.^{20,21} Extracellular miRNAs may exist attached to various forms of their carriers: encapsulated in extracellular vesicles including shedding vesicles and exosomes, associated with high-density lipoprotein particles or as a fraction bound in complex with AGO proteins.^{22,23} Different pathways of biogenesis, mechanisms of sorting and transport, and biological significance of extracellular miRNAs still remain to be determined in detail.¹⁸

Extracellular Ascites-Derived miRNAs in Ovarian Cancer

Similarly to other research, the vast majority of miRNA investigations of ovarian cancer have been focused on the tumor tissues or cell lines. However, even tumor tissue may be a very heterogeneous entity of various, not only, cancerous cells including tumor-infiltrating lymphocytes among the other.^{24,25} Representativeness of cell lines may also be questionable. But

the most challenging issue is the limited capability of tumor tissues to be used for the early diagnosis of ovarian cancer. Therefore, the samples of liquid biopsies, such as blood plasma/serum or urine, have become the target of investigations in search for novel diagnostic, predictive, and prognostic biomarkers, including their miRNAs.²⁶

Unfortunately, the research focused on ascites has been standing aside from the vast majority of body fluid-based investigations focused on ovarian cancer. It should be noted that ascites may have the advantage over other biofluids due its closer relationship with the tumor progression and metastatic spread within peritoneum and omentum, commonly found in affected patients. It is important because ovarian cancer metastasizes primarily via direct extension or detachment from the primary tumors and by passive carriage of tumor cells by the ascites fluid as cancer cell spheroids and dissemination within the peritoneal cavity.²⁷

Our study is the first comprehensive and large-scale evaluation of extracellular ascites-derived miRNAs in ovarian cancer. There are several other recent studies reporting analyzes of ascitic fluid-derived miRNAs in ovarian cancer and differing in the analyzed material. Vaksman et al¹⁰ have explored the dynamics of miRNA regulation in ovarian cancer cells in tumors and effusions and found distinct expression pattern between these anatomical sites. Some miRNAs were highly expressed only in primary carcinomas ($n = 6$ miRNAs) or only in effusions ($n = 12$), while the third group of miRNAs consisted of miRNAs highly expressed in both groups ($n = 16$). However, many miRNAs showed inconclusive results differing between experiments. For example, miR-200c was overexpressed in effusions in sample set 2, but not in sample set 1.¹⁰ Congruently with¹⁰ and using the same TaqMan miRNA array type A, we found several miRNA overexpressed in the screening experiment (see Table 2): miR-99a among 6 miRNAs expressed only in primary OC cells, miR-200b and miR-200c among 16 miRNAs overexpressed both in effusions and in OC, and finally miR-224, miR-31, miR-342, and miR-99b among 12 miRNAs overexpressed only in effusions.¹⁰ All these miRNAs were found overexpressed in the screening experiment of the present study in comparison of ascitic fluid and control plasma and may be good candidates for further evaluation as ovarian oncomiRs. On the other hand, different results were obtained for miRNAs overexpressed in OC (miR-145 and miR-126) or overexpressed both in OC and effusions (let-7-a, let-b, miR-16, miR-17, miR-191, and miR-26a)¹⁰—we found all these miRNAs underexpressed in the screening phase (Table 3).

More recently, Vaksman et al¹⁴ have focused on exosomal fraction of OC effusions, pooled this fraction ($n = 9$), and compared the miRNA expression with pooled reactive mesothelial cells (RMC, $n = 8$) and pooled effusion-derived tumor cells ($n = 13$). They found high levels of miR-21, miR-23b, and miR-29a associated with poor progression-free survival, and high expression of miR-21 correlated with poor overall survival. The results also indicated that about 75% of the miRNAs in the effusion supernatant may have the origin in

OC cells. Despite the loss of biological variation by pooling the samples and lacking statistical evaluation, the authors used an elimination method and identified “highly expressed” miRNAs (Ct <30) unique for each corresponding sample type and some overlapping miRNAs, 19 of them were specific for OC effusions. Among these miRNAs, miR-452 and miR-95 were overexpressed in the screening phase of our study (see Table 2) using the same TaqMan array miRNA platform, suggesting their function as ovarian oncomiRs. Within the group of 19 miRNAs specific to effusions, miR-21 has not been found specific for effusions though its high expression was associated with poor overall survival.¹⁴ Expression of this miRNA has also been elevated in OC cells and effusions previously.¹⁰

As known oncomiR, miR-21 was the subject of investigation in the study of Cappellesso et al.¹³ The authors demonstrated that miR-21 expression was elevated in OC cells and exosomes from peritoneal effusions associated with serous OCs as compared with nonneoplastic controls and found an associated inverse expression of its potential target tumor suppressor programmed cell death 4 (PDCD4).

Most recently, Nymoer et al¹¹ evaluated expression and possible clinical roles of 9 miRNAs (miR-29a, miR-31, miR-99b, miR-182, miR-210, miR-221, miR-222, miR-224, and miR-342) previously shown to be overexpressed in cell pellets of ovarian cancer effusions.¹⁰ In the study based again on cell pellets of the effusions, Nymoer et al¹¹ identified miR-29a as a candidate biomarker significantly related to longer overall survival in patients with metastatic high-grade serous carcinoma.

As regards the large-scale miRNA profiling of the entire extracellular fraction of the ascitic fluid, there has been only 1 study available so far.¹² In this study, 5 miRNAs (miR-132, miR-26a, let-7b, miR-145, and miR-143) were consistently underexpressed in 3 different sample types (tumor tissues, serum, and ascites). Unfortunately, large-scale miRNA expression profiling was conducted on samples of only 2 patients with ovarian cancer and 1 control patient, and the results were validated assessing only serum samples,¹² bringing down the informative value of the study with respect to ascitic fluid-derived miRNAs. Despite this, the abovementioned miRNAs (except for miR-132) were underexpressed in the screening phase of our study and their tumor suppressor roles in ovarian cancer may be tentatively assumed.

To sum up, the research on ascites-derived miRNAs is still in its infancy. However, the achieved results clearly indicate that all cellular, extracellular, and exosomal miRNA fractions of ascitic fluid may be closely related to ovarian carcinogenesis with potential impact on patient's outcomes.

Expression of the miR-200 Family in Ovarian Cancer

All members of the miR-200 family (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141, and miR-429) were overexpressed in ascitic fluid relative to control plasma in the screening phase, and these findings were confirmed in the validation phase. Higher expression of miR-200b was related to poor overall survival

(24 months) in contrast to low level of miR-200b expression associated with improved overall survival (44 months).

The role of the miR-200 family in ovarian cancer is not clear, suggesting that the spatial and temporal diversity of expression during carcinogenesis is associated with an epithelial to mesenchymal transition (EMT) and vice versa (mesenchymal to epithelial transition, MET) linked to metastasis. Most previous profiling studies have demonstrated the increased expression of miR-200 family members in ovarian cancer tissues or cancer cell lines, implicating an oncogenic character of this miRNA family. Associations between the expression of the family members and an increased expression of epithelial markers, induction of MET, and limited migration and cell invasiveness, however, suggest biphasic expression patterns during ovarian carcinogenesis. Besides targeting ZEB1/ZEB2 resulting to upregulation of E-cadherin expression, miR-200s also target snail to increase E-cadherin expression in ovarian cancer.^{28,29} Choi and Ng³⁰ reviewed the functions of miR-200s in ovarian cancer. They suggest that the common scenario noted in cancer research is that this miRNA family is active in suppressing EMT, leading to E-cadherin overexpression, epithelial cell identity, and cancer metastasis inhibition, appears to be different in ovarian cancer, as ovarian cancer cells are more epithelial in nature compared to their normal counterparts. Generally, miR-200s are highly conserved among vertebrate species and may possess important functions in a diversity of developmental processes, such as proliferation of neurons, podocyte differentiation, taste bud formation, insulin signaling pathway regulation in the control of fat body and body size, and for the hormonal regulation of endometrial stromal decidualization during embryo implantation. In ovarian cancer, however, clinical studies are not conclusive to relate the expression level of miR-200 family with disease stage.³⁰

The spatial and temporal variation in expression of the miR-200 family members in various body fluids is not yet fully known. Kan et al³¹ found that serum miR-200a, miR-200b, and miR-200c were overexpressed in serous ovarian cancer samples relative to controls. Similarly, Gao and Wu³² reported that the levels of serum miR-200c and miR-141 were significantly higher in patients with ovarian cancer than healthy controls but also found that expression from early to advanced stages tended to decrease for miR-200c but increase for miR-141. Higher levels of miR-200c were associated with improved survival, and patients with low levels of miR-141 had significantly higher survival rates. Meng et al³³ though reported that serum miR-429 continuously increased from healthy controls to International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) I-II patients to FIGO III-IV patients and that the levels of miR-429 were significantly correlated with lower overall survival (HR: 1.78).

In the present study, expression varied among the ascites-derived miR-200 family members, along with their possible effects associated with clinical outcomes (as found in miR-200b). This finding may also indicate their differential activity in ovarian carcinogenesis. The magnitude of the increased expression of the miR-200 family in the pathological samples

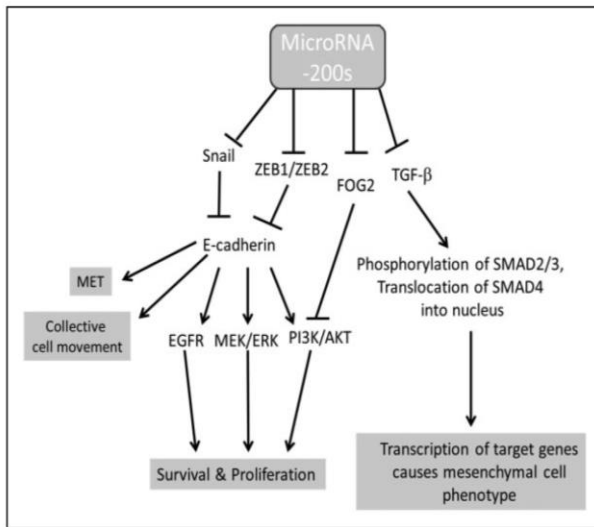


Figure 2. Potential roles of miR-200 family in ovarian cancer. Adopted from Choi and Ng.³⁰ MET indicates mesenchymal–epithelial transition.

of ascitic fluid versus the control plasma samples relative to other miRNAs nevertheless indicated the strong oncogenic character of the entire miR-200 family in ovarian cancer. Potential roles of miR-200s are depicted in Figure 2.

Overexpressed Expression of miR-1290 in Ovarian Cancer

Ovarian cancer ascites-derived miR-1290 was conspicuously overexpressed relative to the control plasma. In contrast, Shapira et al³⁴ did not find altered expression in plasma-derived miR-1290 between ovarian cancer and control samples. Interestingly, they found an association between increased expression of miR-1290 in plasma and higher overall survival. MiR-1290 has been shown to act as an oncomiR in another gynecological cancer, that is, endometrial cancer.³⁵ Wu et al³⁶ have identified miR-1290 upregulated in colon cancer tissues and found that upregulation of miR-1290 postponed cytokinesis and led to the formation of multinucleated cells. KIF13B, a target of miR-1290, was involved in aberrant cytokinesis.³⁶ Similarly, it has been reported that miR-1290 may function as a tumor oncogene in the progression of esophageal squamous cell carcinoma by targeting nuclear factor I/X.³⁷ Interestingly, inhibition of miR-1290 resulted in decreased stemness markers and EMT markers in non-small cell lung cancer (NSCLC), while anti-miR-1290 suppressed proliferation, sphere formation, colony formation, and invasion of NSCLC.³⁸

Our findings also suggest an oncogenic character for miR-1290, mostly in advanced stages of ovarian cancer, which may provide further evidence for discrepancies between the expression levels of miRNAs in pathological plasma and ascitic fluid samples, indicating the complex nature of these body fluids. Ascites-derived miRNAs may also potentially be more advantageous than plasma/serum or tissue-derived miRNAs as novel

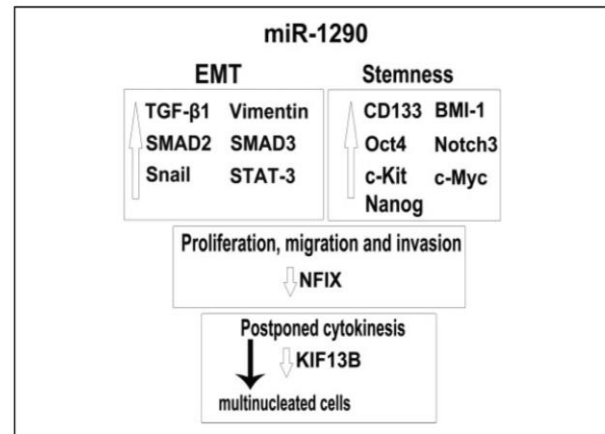


Figure 3. Presumable roles of miR-1290 in ovarian cancer. This schematic diagram of assumed functions of miR-1290 is based on data reported for non-small cell lung cancer,³⁸ esophageal squamous cell carcinoma,³⁷ and colon cancer.³⁶ However, these functions need to be evaluated for ovarian cancer.

biomarkers, because ascites may more closely represent the relationship with cancer progression in the abdominal cavity, overcoming the dilution of cancer-related miRNAs in blood and the vast heterogeneity of tumor tissue samples. Currently, there is limited knowledge on the particular functional roles of miR-1290 in ovarian cancer potentially resembling the roles observed in other cancers (see Figure 3). However, a specific nature of ovarian cancer deserves further research on this issue.

Expression of miR-30a-5p in Ovarian Cancer

The function of miR-30a-5p is not fully understood, with both tumor suppressor and oncogenic roles in ovarian cancer.

Marchini et al³⁹ found a slightly lower expression of miR-30a-5p (0.39-fold) in relapsers than nonrelapsers in ovarian cancer tissues, implicating possible tumor suppressor roles for this miRNA. Experimentally induced ectopic expression of miR-30a-5p may decrease cell proliferation and invasion and increase sensitivity to chemotherapeutic agents.⁴⁰ In contrast, Chen et al⁴¹ reported opposite findings, where the increased expression of miR-30a-5p was associated with decreased paclitaxel sensitivity, supporting the view that miR-30a-5p acts as an oncogene. A low upregulation of miR-30a-5p (4.6-fold) in urine has recently been associated with serous ovarian cancer relative to controls. Surprisingly, expression was also higher in stage I-II than stage III-IV samples.⁴²

As regards to other diagnoses and possible roles of miR-30a-5p, this miRNA was demonstrated to act as tumor suppressor in many studies. For example, miR-30a-5p inhibited proliferation, metastasis, and EMT and upregulated the expression of tight junction protein claudin-5 in upper tract urothelial carcinoma cells.⁴³ Tumor suppressive roles of miR-30a-5p have also been shown in renal cell carcinoma.⁴⁴ Similarly, miR-30a-5p inhibited the proliferation, invasion, and tumor growth of hepatocellular cancer cells by inhibition of forkhead box A1 (FOXA1).⁴⁵ Moreover, miR-30a-5p could inhibit muscle cell differentiation and

regulate the alternative splicing of Trim55 and insulin receptor (INSR) by targeting Muscleblind-Like (MBNL).⁴⁶

Expression of miR-30a-5p in our study was weakly (up to 4.7-fold in VS I) but significantly elevated in ascitic fluid versus controls in the validation phase. An oncogenic character of miR-30a-5p in OCs may be suggested but possibly to much lesser degree than in other validated miRNAs and should be further explored with respect to opposite functions found in other cancers.

Ascites-Derived Extracellular MiRNAs in Future Clinical Practice

As in other miRNA research, the problem of compatibility of results and their general acceptance is a function of their extensive and independent international validation. The methods of sampling (peritoneal/pleural effusions, or lavages), extracellular fraction separation, RNA isolation, and quantification analyses may differ among the investigations, similarly as normalization, use of control samples (RMCs vs plasma), or with respect to ethnogeographical and biological variation and often limited sets of samples. All these factors may potentially alter the results. Moreover, there is no generally accepted standard for the abovementioned issues and methods at this moment while each method may have its own advantages and drawbacks. Therefore, further validation of results will be necessary also with respect to serous peritoneal carcinomas and other less frequent subtypes of OCs.

Complexity of body fluids and their cellular and extracellular components raises other important questions. For example, what parts of the liquid biopsy are the true representatives of the disease? It has become evident that every fraction of particular body fluid may have its own but often overlapping miRNA expression pattern, informative value, and clinical potential. Focus on exosomes may identify differences attributed to secretory activity of the cells (note, however, that exosomal miRNAs account only for a few percent of the c-miRNA pool),^{18,22} while cellular miRNAs representing different cancer cells may show the oncogene- or tumor suppressor roles of miRNAs, but this is affected largely by the most abundant/active cells. Without cell sorting, the differences cannot be attributed to 1 type of the cells. On the other hand, analysis of the broad spectrum of extracellular miRNAs (in cell-free fraction including exosomes) may have the advantage to provide a global picture of the changes in miRNA expression in particular body fluid.

It should be emphasized that the levels of some ascites-derived miRNAs may be extensively altered relative to the control plasma samples. We identified 153 differentially expressed miRNAs, including many overexpressed (potential oncomiRs) and underexpressed miRNAs (potential tumor suppressors). High expressions suggesting oncogenic functions were most notable for all miR-200 family members and miR-1290. The function of the limited overexpression of miR-30a-5p remains elusive. Association between ascites-derived miRNA expression and clinical outcomes was found only in miR-200b, but it may suggest a promising prognostic

potential within the group of extracellular miRNAs found in ascites. It might be expected that novel important parts of miRNA regulatory networks associated with ovarian carcinogenesis may be discovered in ascites. Meanwhile, novel diagnostic, predictive, and prognostic ascites-derived miRNA biomarkers should be evaluated in future studies for ovarian cancer. Such biomarkers may not only come from the entire extracellular fraction in ascitic fluids, but these may be accompanied with the novel miRNA biomarkers found in exosomes or cells in the pathological effusions associated with ovarian cancer. With this knowledge, novel targeted therapies and other clinical applications may also be developed for battling ovarian cancer.

Authors' Note

All patients provided an informed consent. The study was approved by a multicentric ethics committee of the General University Hospital in Prague.

Declaration of Conflicting Interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: Luděk Záveský received institutional funding from the Charles University in Prague (Progres Q28/LF1) and research support from the Avast Foundation (0F2016\2016020048), CEZ Foundation (STE EPP 126_16), and ČEPS a.s. (1410001544). Aleš Hořínek has received research support from the Ministry of Health of the Czech Republic (grant project RVO-VFN 64165). Vít Weinberger and Luboš Minář received research support from the Ministry of Health of the Czech Republic (CZ-DRO FNBr 65269705).

ORCID iD

Luděk Záveský, PhD  <http://orcid.org/0000-0001-9592-7535>

Supplemental Material

Supplementary material for this article is available online.

References

1. Matz M, Coleman MP, Carreira H, Salmeron D, Chirlaque MD, Allemani C. Worldwide comparison of ovarian cancer survival: histological group and stage at diagnosis (CONCORD-2). *Gynecol Oncol*. 2017;144(2):396-404.
2. Wei W, Li N, Sun Y, Li B, Xu L, Wu L. Clinical outcome and prognostic factors of patients with early stage epithelial ovarian cancer. *Oncotarget*. 2017;8(14):23862-23870.
3. Puls LE, Duniho T, Hunter JE, Kryscio R, Blackhurst D, Gallion H. The prognostic implication of ascites in advanced-stage ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 1996;61(1):109-112.
4. Ahmed N, Stenvers KL. Getting to know ovarian cancer ascites: opportunities for targeted therapy-based translational research. *Front Oncol*. 2013;3:256.
5. Shender VO, Pavlyukov MS, Ziganshin RH, et al. Proteome-metabolome profiling of ovarian cancer ascites reveals novel

- components involved in intercellular communication. *Mol Cell Proteomics*. 2014;13(12):3558-3571.
6. van Jaarsveld MT, Helleman J, Berns EM, Wiemer EA. MicroRNAs in ovarian cancer biology and therapy resistance. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010;42(8):1282-1290.
 7. Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol Med*. 2012;4(3):143-159.
 8. Zuberi M, Khan I, Gandhi G, Ray PC, Saxena A. The conglomeration of diagnostic, prognostic and therapeutic potential of serum miR-199a and its association with clinicopathological features in epithelial ovarian cancer. *Tumor Biol*. 2016;37(8):11259-11266.
 9. Rupaimoole R, Slack FJ. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat Rev Drug Discovery*. 2017;16(3):203-221.
 10. Vaksman O, Stavnes HT, Kaern J, Trope CG, Davidson B, Reich R. miRNA profiling along tumour progression in ovarian carcinoma. *J Cell Mol Med*. 2011;15(7):1593-1602.
 11. Nymoer DA, Slipicevic A, Holth A, et al. MiR-29a is a candidate biomarker of better survival in metastatic high-grade serous carcinoma. *Hum Pathol*. 2016;54:74-81.
 12. Chung YW, Bae HS, Song JY, et al. Detection of microRNA as novel biomarkers of epithelial ovarian cancer from the serum of ovarian cancer patient. *Int J Gynecol Cancer*. 2013;23(4):673-679.
 13. Cappellesso R, Tinazzi A, Giurici T, et al. Programmed cell death 4 and microRNA 21 inverse expression is maintained in cells and exosomes from ovarian serous carcinoma effusions. *Cancer Cytopathol*. 2014;122(9):685-693.
 14. Vaksman O, Trope C, Davidson B, Reich R. Exosome-derived miRNAs and ovarian carcinoma progression. *Carcinogenesis*. 2014;35(9):2113-2120.
 15. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*. 2002;3(7):0034.1.
 16. Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: Bestkeeper – Excel-based tool using pairwise correlations. *Biotechnol Lett*. 2004;26(6):509-515.
 17. Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol*. 2007;8(2): R19.
 18. Makarova JA, Shkurnikov MU, Wicklein D, et al. Intracellular and extracellular microRNA: an update on localization and biological role. *Prog Histochem Cytochem*. 2016;51(3-4):33-49.
 19. Weber JA, Baxter DH, Zhang SL, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*. 2010;56(11):1733-1741.
 20. Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci*. 2010;101(10):2087-2092.
 21. Witwer KW. Circulating microRNA biomarker studies: pitfalls and potential solutions. *Clin Chem*. 2015;61(1):56-63.
 22. Turchinovich A, Weiz L, Burwinkel B. Extracellular miRNAs: the mystery of their origin and function. *Trends Biochem Sci*. 2012;37(11):460-465.
 23. Witwer KW, Buzas EI, Bemis LT, et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles*. 2013;2(1):20360.
 24. Blagden SP. Harnessing pandemonium: the clinical implications of tumor heterogeneity in ovarian cancer. *Front Oncol*. 2015;5:149.
 25. Nelson BH. New insights into tumor immunity revealed by the unique genetic and genomic aspects of ovarian cancer. *Curr Opin Immunol*. 2015;33:93-100.
 26. Zavesky L, Jandakova E, Turyna R, et al. New perspectives in diagnosis of gynaecological cancers: emerging role of circulating microRNAs as novel biomarkers. *Neoplasma*. 2015;62(4):509-520.
 27. Lengyel E. Ovarian cancer development and metastasis. *Am J Pathol*. 2010;177:1053-1064.
 28. Jabbari N, Reavis AN, McDonald JF. Sequence variation among members of the miR-200 microRNA family is correlated with variation in the ability to induce hallmarks of mesenchymal-epithelial transition in ovarian cancer cells. *J Ovarian Res*. 2014;7:12.
 29. Xu S, Xu P, Wu W, et al. The biphasic expression pattern of miR-200a and E-cadherin in epithelial ovarian cancer and its correlation with clinicopathological features. *Curr Pharm Des*. 2014;20(11):1888-1895.
 30. Choi PW, Ng SW. The functions of microRNA-200 family in ovarian cancer: beyond epithelial-mesenchymal transition. *Int J Mol Sci*. 2017;18(6):1207.
 31. Kan CWS, Hahn MA, Gard GB, et al. Elevated levels of circulating microRNA-200 family members correlate with serous epithelial ovarian cancer. *BMC Cancer*. 2012;12:627.
 32. Gao YC, Wu J. MicroRNA-200c and microRNA-141 as potential diagnostic and prognostic biomarkers for ovarian cancer. *Tumor Biol*. 2015;36(6):4843-4850.
 33. Meng X, Joosse SA, Muller V, et al. Diagnostic and prognostic potential of serum miR-7, miR-16, miR-25, miR-93, miR-182, miR-376a and miR-429 in ovarian cancer patients. *Br J Cancer*. 2015;113(9):1358-1366.
 34. Shapira I, Oswald M, Lovecchio J, et al. Circulating biomarkers for detection of ovarian cancer and predicting cancer outcomes. *Br J Cancer*. 2014;110(4):976-983.
 35. Torres A, Torres K, Pesci A, et al. Diagnostic and prognostic significance of miRNA signatures in tissues and plasma of endometrioid endometrial carcinoma patients. *Int J Cancer*. 2013;132(7):1633-1645.
 36. Wu J, Ji X, Zhu L, et al. Up-regulation of microRNA-1290 impairs cytokinesis and affects the reprogramming of colon cancer cells. *Cancer Lett*. 2013;329(2):155-163.
 37. Mao Y, Liu J, Zhang D, Li B. MiR-1290 promotes cancer progression by targeting nuclear factor I/X (NFIX) in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). *Biomed Pharmacother*. 2015;76:82-93.
 38. Kim G, An HJ, Lee MJ, et al. Hsa-miR-1246 and hsa-miR-1290 are associated with stemness and invasiveness of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2016;91:15-22.

39. Marchini S, Cavaliere D, Fruscio R, et al. Association between miR-200c and the survival of patients with stage I epithelial ovarian cancer: a retrospective study of two independent tumour tissue collections. *Lancet Oncol.* 2011;12(3):273-285.
40. Sestito R, Cianfrocca R, Rosano L, et al. miR-30a inhibits endothelin A receptor and chemoresistance in ovarian carcinoma. *Oncotarget.* 2016;7(4):4009-4023.
41. Chen N, Chon HS, Xiong Y, et al. Human cancer cell line microRNAs associated with in vitro sensitivity to paclitaxel. *Oncol Rep.* 2014;31(1):376-383.
42. Zhou J, Gong G, Tan H, et al. Urinary microRNA-30a-5p is a potential biomarker for ovarian serous adenocarcinoma. *Oncol Rep.* 2015;33(6):2915-2923.
43. Chung YH, Li SC, Kao YH, et al. MiR-30a-5p inhibits epithelial-to-mesenchymal transition and upregulates expression of tight junction protein Claudin-5 in human upper tract urothelial carcinoma cells. *Int J Mol Sci.* 2017;18(8):1826.
44. Li Y, Li Y, Chen D, et al. MiR-30a-5p in the tumorigenesis of renal cell carcinoma: a tumor suppressive microRNA. *Mol Med Rep.* 2016;13(5):4085-4094.
45. Zhang SL, Liu Q, Zhang Q, Liu L. MicroRNA-30a-5p suppresses proliferation, invasion and tumor growth of hepatocellular cancer cells via targeting FOXA1. *Oncol Lett.* 2017;14(4):5018-5026.
46. Zhang BW, Cai HF, Wei XF, et al. MiR-30-5p regulates muscle differentiation and alternative splicing of muscle-related genes by targeting MBNL. *Int J Mol Sci.* 2016;17(2):E182.

4. Radikální primární operační léčba vybraných gynekologických malignit (karcinom vaječníku a vulvy) a sekundární cytoredukční chirurgie karcinomu vaječníku

Operační léčba představuje základní modalitu v léčbě zhoubných nádorů gynekologických pánevních orgánů, přičemž u karcinomu vaječníku představuje jedinou kurativní terapeutickou metodu. Zejména v časných stádiích nemoci přináší operace nejlepší terapeutické výsledky [48,49]. Rovněž u pokročilejších stádií, které vždy vyžadují kombinaci s dalšími modalitami regionální a/nebo systémové léčby, zpravidla příznivě ovlivňuje prognózu nemocných v podobě zlepšení kvality života, prodloužení doby bez přítomnosti nemoci a prodloužení celkového přežití [50].

Kromě léčebného významu má operační léčba i význam diagnostický a stagingový. I přes dynamický rozvoj moderních zobrazovacích metod zůstává operační výkon nejpřesnějším nástrojem stanovení rozsahu nemoci. Absolutně to platí zejména v časných stádiích nemoci, kde je zásadní profit kompletního (radikálního) stagingového výkonu u nádorů považovaných podle makroskopického nálezu za časná stadia nemoci (FIGO I-II) založen na odhalení subklinického metastatického postižení. To umožňuje přesné určení klinického stádia, které je nezbytné pro indikaci následné suficientní adjuvantní léčby [51].

Přestože všechny základní onkogynekologické operační výkony byly popsány již před několika desítkami let, prodělává chirurgická léčba velice dynamický vývoj. Zásadním trendem je individualizace přístupu, tj. stanovení optimálního rozsahu a radikality operace u každé pacientky na základě zhodnocení souboru prognostických faktorů. To umožňuje modifikace indikací jednotlivých výkonů a upřesnění jejich rozsahu [52,53]. Nezastupitelné místo v rozvoji onkochirurgie v gynekologii má zavádění nových technologií, které technicky usnadňují vlastní operační výkon a redukuje výskyt komplikací [54,55]. Nezvratitelným trendem je centralizace péče o pacientky s gynekologickým zhoubným nádorem na úrovni onkogynekologických center

poskytujících specializovanou péči v rámci fakultních a krajských nemocnic. Tato centralizace umožňuje nejen zrychlenou a preciznější diagnostiku a možnosti využití moderní systémové cílené léčby, ale je rovněž nezbytně asociována s formováním týmů onkogynekologů-operatérů se speciální erudicí v tomto segmentu operační léčby. S tím souvisí nejen častější provedení kompletního stagingu u časných stádií, ale současně i vyšší radikalita a frekventnější dosažení optimální cytoredukce u pokročilých stádií, což je spojeno s celkově lepší prognózou pacientek operovaných v onkogynekologických centrech [56-58].

Kapitola týkající se radikální operační léčby vybraných gynekologických malignit je tématicky rozdělena do tří částí. V části 4.1. se autor věnuje přínosu extendované operační léčby primárně zachycených pokročilých stádií karcinomu vaječníku na podkladě podrobné analýzy souboru pacientek operovaných v Onkogynekologickém centru FN Brno. Téma benefity sekundární cytoredukční chirurgie pro pacientky s recidivou epiteliálních nádorů vaječníku je analyzováno opět na vlastním souboru pacientek v části 4.2. této kapitoly. Další část (4.3.) týkající se radikální operační léčby karcinomu zevních rodidel analyzuje na vlastním souboru pacientek prognostické faktory podílející se na recidivě tohoto zhoubného nádoru po primární kompletní stagingové operaci s důrazem na parametry bezprostředně ovlivnitelné onkogynekologem-operatérem.

4.1. Operační léčba pokročilých stádií karcinomu vaječníku

Karcinom vaječníku je nejčastější příčina úmrtí na gynekologické malignity. Jeho incidence se v posledních letech pohybuje kolem 19-ti případů/100 tisíc žen, což v absolutních parametrech představuje 1020-1030 nových onemocnění v průběhu kalendářního roku. Alarmující je však letalita tohoto nádoru, neboť ročně zemře v České republice 720-730 žen na podkladě progresse tohoto nádorového onemocnění [2]. Hlavní příčinou špatné prognózy je neoddiskutovatelně pozdní diagnostika nemoci. V pozdních stádiích (FIGO III-IV) je diagnostikováno kolem 70-75% všech nových onemocnění a pětileté přežití pacientek v pokročilých stádiích se pohybuje v rozmezí 25-30% [2]. Přestože je léčbě zhoubného nádoru vaječníku věnována náležitá pozornost, zlepšení výsledků přežití v posledních 20-ti letech i přes pokroky v cílené léčbě není adekvátní.

Z pohledu operátora-onkogynekologa je však potěšující, že podstatným dílem se na určitém dosaženém zlepšení podílí rovněž rozvoj adekvátně radikální operativy soustředěné na úrovni onkogynekologických center. Pro operační přístup k pokročilým stádiím nemoci je charakteristické, že do 70. let minulého století byl chirurgický výkon limitován pouze na diagnostickou biopsii nebo provedení adnexektomie. Poté se začaly objevovat práce popisující velmi výrazné rozdíly v prognóze pacientek pokročilých stádií karcinomu vaječníku v závislosti na radikalitě provedeného výkonu. Pozornost začala být věnována rozsahu nádorového rezidua. Jedna z prvních prací věnovaných tomuto tématu z M. D. Anderson Tumor Institute prezentovala v roce 1975 na souboru téměř 400 pacientek dosažení pětiletého přežití u 35% pacientek s reziduálním nádorem menším než 1 cm ve srovnání s pětiletým přežitím týkajícím se pouze 2% pacientek při nádorovém reziduu větším než 1 cm [59]. Význam rozsahu výkonu byl a je postupně potvrzován dalšími publikacemi, přičemž zásadní pozornost začala být věnována dosažení tzv. optimální cytoredukce, která v dnešním pojetí představuje absenci makroskopicky patrného nádorového rezidua na konci operačního výkonu [60-64].

Adekvátní radikalita zaměřená na dosažení optimální cytoredukce je nezbytně spojena jak se speciální erudicí operujícího onkogynekologa, tak i s nutností mezioborové spolupráce s dalšími operačními obory, zejména se specialisty v břišní chirurgii a urologii [65]. Naprosto zásadní je při rozhodování o extenzivním výkonu provedení precizní předoperační diagnostiky s využitím nejmodernějších zobrazovacích metod, včetně PET/MR nebo PET/CT a spolupráce mezi radiodiagnostikem a onkogynekologem [66-68]. V případě pochybností o operabilitě nálezu je vhodné u pokročilých nálezů zařadit do operačního algoritmu diagnostickou laparoskopii, která pomocí speciálních skórovacích systémů pomáhá peroperačně vygenerovat definitivní náhled na možnost optimální cytoredukce pokročilého nádoru [69-71]. Podle toho se rozlišují dva základní typy operačních přístupů. Prvním je cytoredukční operace jako primární výkon (primary debulking surgery, PDS), kdy je shoda předoperačních vyšetření a ev. diagnostické laparoskopie na dosažení optimální cytoredukce. V případě, že není předpoklad dosažení makroskopicky nulového rezidua při primární operaci, je preferována pouze biopsie mininvazivním přístupem a intervalová operace (interval debulking surgery, IDS) zpravidla po 3 cyklech adekvátně účinné chemoterapie, která umožní následnou optimální cytoredukci [72-74].

Operační erudice onkogynekogického operátora vyžaduje dokonalou orientaci v oblasti celé peritoneální dutiny, včetně retroperitonea, neboť v případě předpokladu dosažení optimální cytoredukce jsou kromě stagingového výkonu (hysterektomie s bilaterální adnexektomií, totální omentektomií, appendektomií a exstirpací zvětšených lymfatických uzlin z oblasti pánevní a paraortální) plně indikované další resekční a excizní výkony podle rozsahu a lokalizace postižení dutiny břišní. Jedná se o pánevní nebo totální peritonektomii včetně odstranění peritonea bránice (tzv. diafragmatický stripping) nebo lokalizovanou excizi bráničního svalu v případě hlubší infiltrace, součástí výkonu může být rovněž splenektomie. Spolupráce s břišním chirurgem umožňuje resekci kličkek tenkého nebo tlustého střeva, cholecystektomii, resekci jater nebo

slinivky břišní, kooperace s urologem resekci močového měchýře, ev. močovodu [65,75-77].

Smysluplnost indikovaných extenzivních výkonů je potvrzována publikačními výstupy, které deklarují prodloužení intervalu bez onemocnění (disease free interval, DFI) a prodloužení celkového přežití (overall survival, OS) [78,79].

Racionalita tohoto trendu je doložena rovněž výstupy níže přiložené prvoautorské publikace, která analyzuje několik desítek případů pokročilých nádorů vaječníku, které byly řešeny mezioborovými extenzivními operacemi. Pro pracoviště s vysokým počtem optimálních cytoredukci je přitom typický suficientní podíl střevních resekcí u těchto výkonů, který by měl oscilovat mezi 20-30%. Hlavní důraz publikace je kladen na analýzu benefitu resekcčního výkonu na levé polovině tlustého střeva (rektosigmatu), neboť tato bývá poměrně velmi často postižena u pokročilých stádií nemoci vzhledem k anatomické blízkosti děložních adnex a přiléhající části tlustého střeva. Terminologicky se jedná o tzv. zadní modifikovanou supralevátorovou exenteraci, která představuje resekcční výkon v pánvi en-bloc, tj. odstranění dělohy, děložních adnex, infiltrované části rektosigmatu a pánevního peritonea s následným obnovením kontinuity střeva konstrukcí anastomozy (viz **příloha 4.1.1.**)

4.1.1. Minar L, Felsing M, Rovny I, Zlamal F, Bienertova-Vasku J, Jandakova E. Modified posterior pelvic exenteration for advanced ovarian malignancies: a single-institution study of 35 cases. (2017). *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica*, 96 (9), pp. 1136-1143.

Modified posterior pelvic exenteration for advanced ovarian malignancies: a single-institution study of 35 cases

LUBOS MINAR^{1,2} , MICHAL FELSINGER¹, IVO ROVNY³, FILIP ZLAMAL^{4,5}, JULIE BIENERTOVA-VASKU^{4,5} & EVA JANDAKOVA⁶

¹Department of Obstetrics and Gynecology, University Hospital Brno, Brno, ²Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, ³Department of Surgery, University Hospital Brno, Brno, ⁴Research Center for Toxic Compounds in the Environment, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, ⁵Department of Pathological Physiology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, and ⁶Department of Pathology, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic

Key words

Advanced ovarian cancer, modified posterior pelvic exenteration, residual disease, disease-free survival, surgical complications

Correspondence

Lubos Minar, Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Masaryk University and University Hospital Brno, Obilni trh 11, 602 00 Brno, Czech Republic.
E-mail: lubosminar@seznam.cz

Conflict of interest

The authors have stated explicitly that there are no conflicts of interest in connection with this article.

Please cite this article as: Minar L, Felsinger M, Rovny I, Zlamal F, Bienertova-Vasku J, Jandakova E. Modified posterior pelvic exenteration for advanced ovarian malignancies: a single-institution study of 35 cases. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2017; 96: 1136–1143.

Received: 17 January 2017

Accepted: 31 May 2017

DOI: 10.1111/aogs.13177

Abstract

Introduction. This study aimed to investigate the possible benefits of a complete cytoreduction in patients with advanced ovarian cancer and concomitant rectal invasion. Furthermore, we evaluated the morbidity associated with radical surgery. **Material and methods.** A retrospective analysis examined 35 women who underwent radical surgery in the form of modified posterior pelvic exenteration. Descriptive statistics, Kaplan–Meier survival curves and log-rank test were used for statistical estimations. Surgical complications were analyzed using the Clavien–Dindo classification. **Results.** The analysis of survival in relation to residual disease assessed according to Sugarbaker confirmed an optimistic prognosis in patients with optimal debulking with a mean disease-free survival period of 33.6 months in R0 patients, 19.6 months in R1 patients, and 14.3 months in R2 patients. A statistically significant difference in disease-free survival ($p = 0.023$) was observed between the R0 (without residual disease) and R1+2 (with residual disease) groups. Surgical complications occurred in 83% of patients, with early postoperative complications being most frequent (65.7%). While grade III–IV complications occurred in 37.7% of all patients, no cases of surgery-associated mortality occurred. **Conclusions.** Modified posterior pelvic exenteration is a highly effective method for achieving optimal debulking in cases of advanced ovarian cancer with the direct invasion of the rectum. Modified posterior pelvic exenteration does not delay the beginning of complementary chemotherapy. However, it is necessary to take into account surgery-related morbidity. As modified posterior pelvic exenteration represents an extremely invasive technique, the surgical plan and perioperative care should be personalized to address the individual medical and surgical conditions of each patient.

Abbreviations: CT, computer tomography; DFS, disease-free survival; IDS, interval debulking surgery; MPPE, modified posterior pelvic exenteration; MRI, magnetic resonance imaging; NACT, neoadjuvant chemotherapy; PDS, primary debulking surgery; PET, positron emission tomography; R, residual disease.

Introduction

Ovarian cancer is the most common cause of death among women with gynecological malignancies, with approximately 70% being diagnosed in the advanced stages of the disease (1). No more than approximately 30% of patients diagnosed with stages III–IV achieve five-year survival (2). Prognosis in advanced stages of the disease may be improved by means of adequate radical surgery; centralizing such treatment in tertiary referral centers plays a crucial role in the management of such patients. Although primary debulking surgery (PDS) followed by adjuvant chemotherapy based on platinum is the standard surgical procedure in such cases (3), the bioptic verification of a tumor may also be achieved using a mini-invasive technique in cases with non-resectable tumors. Interval debulking surgery (IDS) is then usually employed following adequately effective neoadjuvant chemotherapy (NACT) (4,5).

Radical surgery aims to achieve zero macroscopic residual tumor, which constitutes the most important prognostic factor (6). The prognostic importance of zero residuum thus justifies extensive cytoreductive surgery, which may be associated with serious complications (7). The most common radical surgery employed in the treatment of locally advanced ovarian tumors is modified posterior pelvic exenteration (MPPE), a supralelevator-type resection with low colorectal anastomosis, usually located 5–7 cm above the anocutaneous line. The supralelevator approach is possible as the infraperitoneal rectum is often preserved from invasion by ovarian pelvic mass (8).

The main objective of this study was to investigate the benefits of MPPE for the prognosis of patients with advanced ovarian cancer and concomitant rectal invasion in relation to residual disease (R). Furthermore, we also aimed to evaluate the morbidity associated with this surgical procedure.

Material and methods

This retrospective study included 35 patients with advanced malignant ovarian tumors and concomitant rectal invasion who underwent radical surgery in the form of MPPE over a four-year period (2011–2014). A total of 23% of all advanced malignant ovarian tumors were dealt using this surgical procedure during the study period. All operations were carried out with the objective of achieving zero macroscopic residuum. The achieved results represent our initial learning curve.

A great deal of attention was paid to the preoperative selection of patients suitable for radical surgery. Prior to surgery, the patients underwent a complex examination using imaging methods to estimate the extent of the

disease, with special emphasis placed on pelvic ultrasonography. Apart from the diagnosis of uni- or bilateral ovarian tumors, metastatic involvement of pelvic serous membranes and potential pelvic lymphadenopathy, the ultrasonographic examination also evaluated the involvement of the rectal wall by direct tumor growth or by implantation metastases. In addition to ultrasonography, computer tomography (CT) was frequently used to evaluate dissemination above the pelvic level. The examination was designed to evaluate possible contraindications for radical surgery such as the invasion of the mesenteric root, celiac region, hepatic pedicle, gastric serous membrane, the presence of peritoneal miliaria, multiple inoperable tumors on the bowel or liver metastases. Metastatic involvement of the lungs, pleural cavity and hilous as well as mediastinal lymphadenopathy was excluded prior to radical surgery. Positron emission tomography (PET)/CT provided a significant amount of help with respect to acquiring an exact pattern of dissemination during preoperative noninvasive patient selection for PDS or biopsy with NACT and IDS. In cases of persisting doubts regarding the viability of radical surgery, surgery was initiated via diagnostic laparoscopy in order objectively to assess findings using the Fagotti score. PDS was performed if the Fagotti score was ≤ 8 , otherwise only a biopsy was taken and the patient was referred for NACT (9).

Standard surgical procedure in all patients involved type B radical hysterectomy, bilateral salpingo-oophorectomy, pelvic peritonectomy, total omentectomy, appendectomy and intestinal surgical procedure, employed with respect to the extent of bowel disease. Based on the extent of tumor dissemination, other aggressive surgical procedures were performed to achieve optimal debulking. Lymphadenectomy was performed on a systematic basis (pelvic and lombo-aortic) or for the removal of bulky lymph nodes in cases of good tolerance of surgery by the patient after the zero residuum was achieved or if malignant lymphadenopathy was suspected on imaging.

Information on age, body mass index, menopausal status and parity was obtained from patient records. Surgical procedure (PDS or IDS) timing was recorded and tumor histotype and disease stage were determined according to the International Federation of Gynecology and Obstetrics

Key Message

Modified posterior pelvic exenteration is a highly satisfactory method for achieving optimal debulking with an acceptable rate of serious complications in cases of advanced ovarian cancer with direct invasion of the rectum.

(FIGO) staging system based on surgical findings. Information related to the duration of the operation, blood loss, need for blood transfusion and intraoperative complications (grade I–IVB) based on the Clavien–Dindo classification was collected (10). The presence of residual disease, perceived as a critical parameter, was analyzed using the Completeness of Cytoreduction Score according to Sugarbaker, with R0 indicating the presence of zero macroscopic residuum, R1 a residuum of less than 0.25 cm, and R2 a residuum of 0.25–2.5 cm (11). In addition, early postoperative complications (≤ 30 days), late postoperative complications (> 30 days), disease-free survival (DFS), overall survival and mortality index due to disease progression were also analyzed. All included patients fulfilled the criterion of regular follow up (range: 25–55 months).

Statistical analyses

Data analysis was performed using R3.1.2. Qualitative and quantitative variables were described as percentages and mean \pm SD or median (range), respectively. The statistical analysis of DFS was conducted using survival analysis with the Kaplan–Meier estimate of survival function; living patients without relapse were censored at the last follow up. Mean values and survival rates of groups R0–R2 are provided with 95% confidence intervals (CI) for all patients; they were compared using a log-rank test. Cox regression modeling was used to quantify the hazard ratio between the groups. Due to the limited follow up of the enrolled patients (seven deaths, 28 censors), no overall survival analysis is included.

Ethical approval

The Ethical Committee of the University Hospital Brno, Czech Republic approved the study on 16 January 2017 (reference number: 160117).

Results

A total of 35 patients underwent radical surgery (MPPE). The baseline clinical characteristics of the cohort are included in Table 1. The youngest patient (with locally advanced yolk sac tumor) was 24 years old. Two patients suffered from non-epithelial malignant tumors (granulosa cells tumor and yolk sac tumor); high-grade carcinomas prevailed among patients with epithelial malignancies (29 of 33 patients). The serous histotype was prevalent among patients with epithelial tumors.

Table 2 analyzes the timing of radical surgery in relation to chemotherapy and achieved R. The dominant surgery type was PDS, which was performed in 94% of all

Table 1. Patient characteristics.

Characteristic	
Age (years), mean (range)	61 (24–82)
BMI, mean (range)	29 (24–34)
Pre-/postmenopausal status	7/28
Nullipara/non-nullipara	11/24
Histotype	
Epithelial high-grade carcinoma	29
Epithelial low-grade carcinoma	4
Non-epithelial malignancy	2
FIGO stage	
IIIC	29
IV	6

BMI, body mass index; FIGO, International Federation of Gynecology and Obstetrics.

Table 2. Residual disease according to Sugarbaker index.

R	No. of patients	
	PDS	IDS
0	24	2
1	5	0
2	4	0

IDS, interval debulking surgery; PDS, primary debulking surgery; R, residual disease.

cases, followed by six cycles of platinum-based adjuvant chemotherapy. In two cases, IDS was performed after four cycles of NACT; two more cycles of chemotherapy were added because R0 residuum was achieved. While optimal debulking was reached in 74% of patients, R was observed in a total of nine cases (26%) at the end of the operation (R1 in five patients, R2 in four patients).

In addition to standard surgical procedures, the basic extent of surgery also included intestinal resection. Rectosigmoid resection was performed in 29 patients (83%), with end-to-end anastomosis with a circular stapler inserted into the anus employed in the case of 26 patients. Three patients underwent permanent colostomy due to low resection. Moreover, five patients with rectosigmoid resection were subjected to simultaneous multiple intestinal resections. Of the remaining six patients, five underwent left hemicolectomy with stapler anastomosis and one patient was subjected to total colectomy with ileostomy due to a diffuse involvement of the large bowel. Systemic pelvic and lombo-aortic lymphadenectomy was performed in 16 patients (45.7%) with an average number of 64 lymph nodes obtained (range: 32–100). Metastatic involvement was revealed in seven patients (44%) in this group. In five cases metastatic bulky lymph nodes, including groin lymph nodes (range: 1–25), were

Table 3. Types of intestinal and concomitant surgical procedures.

Type of surgical procedure	No. of patients
Rectosigmoid resection	29
Left hemicolectomy	5
Total colectomy	1
Lymphadenectomy	21
Total peritonectomy (including diaphragm)	10
Resection of diaphragm	2
Splenectomy	4
Cholecystectomy	3
Gastric resection	2
Ureteral resection	1

removed. Based on the extent of tumor involvement, standard staging and intestinal surgical procedures were completed with additional aggressive surgical treatment (Table 3).

The average duration of each surgery was 283 min (range: 170–480) with an average blood loss of 970 mL (range: 400–3500). Table 4 provides information on surgical complications. Intraoperative complications occurred in 10 patients (31.4%); eight patients (22.8%) had a hemorrhage (≥ 1500 mL) and required blood transfusions during surgery (grade II complication). Grade III complications requiring prompt additional surgery appeared in two patients (5.7%): a lesion involving the diaphragm was treated with suture and a complete interruption of the ureter was solved by the insertion of a stent and subsequent anastomosis.

Table 4. Intraoperative and postoperative complications.

Type of complication	No. of patients
Intraoperative complications	
Hemorrhage (>1500 mL)	8
Iatrogenic diaphragmatic lesion	1
Iatrogenic ureteral lesion	1
Early postoperative complications	
Pleural effusion	1
Anemia (Hb < 80 g/L)	8
Prolonged pyrexia ($>38^{\circ}\text{C}$)	7
Subacute bowel obstruction	7
Thigh paresthesia	1
Anastomotic leakage	4
Wound dehiscence	5
Pulmonary thrombembolism	1
Late postoperative complications	
<i>Clostridium difficile</i> infection	1
Incisional hernia	1
Symptomatic lymphocele	6
Bowel obstruction	1

Hb, hemoglobin.

No early postoperative complications occurred in 12 patients (34.3%). Two patients experienced three simultaneous early postoperative complications at the same time (anemia with anastomotic leakage and wound dehiscence, and anemia with prolonged pyrexia and wound dehiscence, respectively). A total of 34 early postoperative complications were recorded in the cohort. The dominant early complication was worsening anemia with hemoglobin < 8 g/dL (grade II), which occurred in eight patients (22.9%) who therefore required blood transfusions during hospitalization. Prolonged pyrexia ($>38^{\circ}\text{C}$) requiring antibiotic treatment affected seven patients (20%) and the same number of patients suffered from subacute bowel obstruction (both grade II). Furthermore, one case of moderate pleural effusion was solved by noninvasive mechanical ventilation and physiotherapy (grade I) and one episode of thigh paresthesia was treated with corticosteroids (grade II). While serious early postoperative complications (grade III–IV) requiring secondary surgery occurred in seven patients (20.0%); wound dehiscence, affecting five patients, was recorded as the most frequent. Anastomotic leakage, accompanied by wound dehiscence in two cases, occurred in four patients. This was solved by permanent colostomy in two patients and by temporary ileostomy, reversed after adjuvant chemotherapy, in a further two cases. Finally, early postoperative complications included one case of pulmonary thromboembolism (grade IVA). With respect to early postoperative complications, less severe early postoperative complications (grade I–II) were more frequent, but 10 (28.6%) cases of early postoperative complications were classified as grade III–IV.

Late postoperative complications occurred in nine patients (25.7%). One case of *Clostridium difficile* infection (grade II) was adequately treated with antibiotics. Two patients developed grade IIIB complications (incisional hernia, bowel obstruction requiring re-laparotomy and adhesiolysis). The most common late postoperative complication was symptomatic lymphocele (grade IIIA), which was drained under sonographic or CT guidance. No mortalities were associated with surgical complications.

Systemic chemotherapy was administered to 32 patients (91.4%). Two patients refused adjuvant chemotherapy. In one case, chemotherapy was not initiated due to poor general condition. The mean delay between radical surgery and the start of chemotherapy was 35.8 days (range: 21–78) (Figure 1).

All patients included in the analysis had a proper follow up. During the follow-up period (range: 25–55 months), mean DFS stood at 30.2 ± 3.4 months (95% CI 23.5–36.8) (Figure 2). Seven deaths (i.e. a mortality rate of 20%) were recorded. Recurrence in patients who

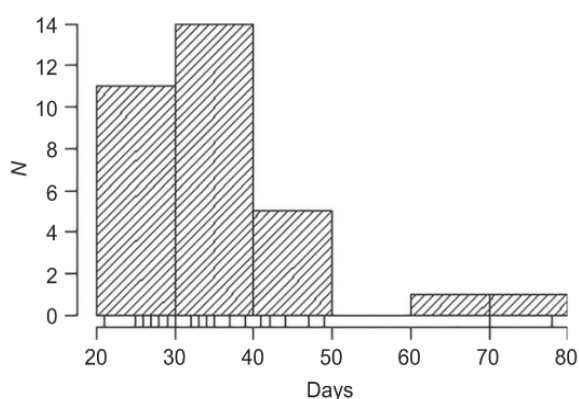


Figure 1. Initiation of complementary chemotherapy after modified posterior pelvic exenteration in days.

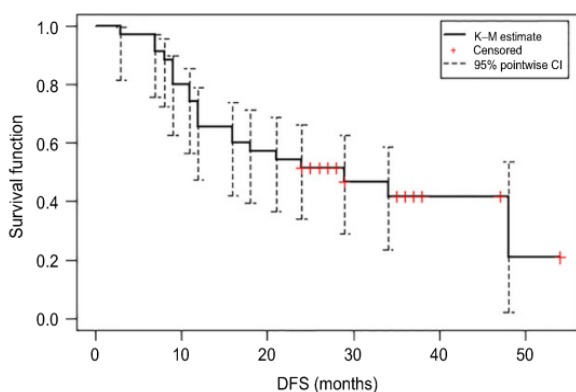


Figure 2. Disease-free survival (DFS) regardless of residual disease in months. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com].

subsequently died was localized in the pelvis in two cases with one case of concomitant involvement of the liver. The remaining cases featured a solitary involvement of the liver, lung and brain, with two cases of duplicate liver and lung involvement. Thirteen patients were alive with recurrence. In one case, recurrence was localized in the pelvis, visceral peritoneal surfaces of the upper abdomen were involved in six cases, and both the liver and spleen in two cases. Aortic lymph nodes were involved in two cases and both the liver and periportal lymph nodes were involved in a further two. Fifteen patients were alive without recurrence.

The analysis of survival parameters in relation to R confirmed a more favorable prognosis in patients with optimal debulking. During the follow-up period, we found a mean DFS of 33.6 ± 3.9 months (95% CI; 25.8–41.3) in R0 patients, 19.6 ± 3.6 months (95% CI 12.5–26.7) in R1 patients and 14.3 ± 4.0 months (95% CI 6.3–22.2) in R2 patients. When testing the difference between survival curves using the log-rank test, a

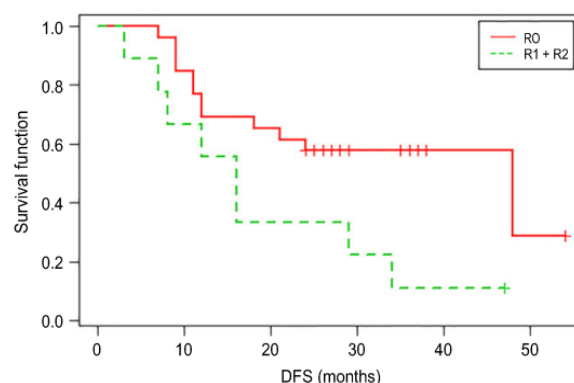


Figure 3. Disease-free survival (DFS) according to residual disease (R) in months (R0 vs. R1 + R2). [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com].

statistically significant difference was observed in DFS ($p = 0.023$) between the R0 (without residual disease) and R1 + 2 (with residual disease) groups (Figure 3). When quantifying the difference in recurrence risk using the Cox regression model, we observed a 2.75-fold greater risk of relapse in patients with residuum (R1 + 2) than in R0 patients (95% CI 1.01–6.87; $p = 0.030$). Due to the limited follow up of included patients (seven deaths, 28 censors), an overall survival analysis is not included.

Discussion

The main purpose of the surgical treatment of advanced ovarian cancer is to achieve optimal cytoreduction, which constitutes a key prognostic factor. Survival parameters are significantly worse in patients who undergo suboptimal debulking than in those subjected to optimal debulking (12,13). Precise preoperative staging designed to establish the limits of these extremely invasive surgical procedures plays an important role in determining the indication for radical surgery with concomitant intestinal resection. Either PET/CT or PET/magnetic resonance imaging (MRI) should be part of standard noninvasive preoperative selection. Multiple studies show that PET/CT can detect lymph nodes and distant metastases in ovarian cancer with high accuracy and may therefore affect treatment management. Although PET/CT staging is superior for identifying lymph nodes and distant metastases, its role is limited for tumor staging. On the other hand, PET/MRI is a promising method which may be beneficial for tumor staging, especially due to the higher soft tissue contrast and the absence of ionizing radiation exposure (14,15). Most studies of patients with advanced ovarian cancer and concomitant rectal invasion treated by radical surgery with MPPE refer to a median overall survival of 27–50 months and a median DFS of

18–50 months in R0 cases (13,16,17). The conclusions of our study with respect to DFS are in line with the above-mentioned studies. The efficiency of MPPE is further supported by the localization of recurrence in dead and relapsing patients, as an absolute majority of recurrent tumors recorded in our study occurred outside the pelvic region. Of 20 patients in our study, only three developed a recurrence in the pelvis and in two of these patients R0 was not achieved at the end of surgery.

The radical nature of the surgery is associated with an increased risk of complications, determined not only by the actual extent of the surgery but also by the overall vulnerability of the patients. This vulnerability is in turn determined by the stage of the disease and is associated with ascites and malnutrition. For the success and acceptance of a given approach, specific surgical patient selection criteria must be fulfilled (18). When selecting patients for radical surgery, physiological age and the absence of severe co-morbidities appear to be more important than chronological age (19). A second key selection criterion is represented by the quality of preoperative imaging methods and/or initial diagnostic laparoscopy using the scoring systems for identification contraindications for extensive surgery (20). To further decrease the risk of complications, the surgical procedures should always be carried out in a tertiary referral center by an experienced oncogynecologist in cooperation with a general surgeon (21,22).

Intraoperative and early postoperative complications most frequently encountered in our study included hemorrhage >1500 mL and subsequent anemia; these were gradually reduced as the entire interdisciplinary team progressed along the learning curve. In our experience, the riskiest phase from the perspective of hemorrhage is the retroperitoneal dissection in the sacral region with fragile varicose plexuses. The long operating time and extensive blood loss increase the risk of wound infection, which may adversely affect anastomosis site healing. The correct indication for setting up anastomosis and its localization in relation to the anocutaneous line are extremely important for the prevention of anastomotic leakage. An unacceptable level of risk is observed when the colorectal anastomosis is set up at or under 5 cm from the anal verge. In these cases, a definitive colostomy should be recommended (23).

According to some studies, malnutrition associated with a lower serum albumin level (<30 g/L) constitutes a statistically significant factor for anastomotic leakage (24). However, no such statistically significant association was established in our study. Finally, it must be stated that anastomotic leakage presented the most severe early postoperative complication influencing hospital stay duration and delaying the initiation of adjuvant chemotherapy.

Although the number of encountered complications appears to be somewhat higher than in other studies (16,17), these studies only considered severe complications, whereas our study also takes into account less severe complications (grade I–II), which accounted for over 70% of the total. Wound infections are relatively common in exenteration procedures, as disseminated cancer is strongly associated with surgical site infections (25). Moreover, associated risk includes other early complications such as subacute bowel obstruction and wound dehiscence as well as an increased risk of late complications in terms of incisional hernia and bowel obstruction related to adhesions. As the prolonged antibiotic therapy of inflammatory complications is associated with the risk of development of *Clostridium colitis*, antibiotic therapy should be accompanied by routine medication with probiotics (26).

In our cohort, late postoperative complications affected 25% of all patients, with incisional hernia, bowel obstruction and *C. difficile* infection occurring in individual cases. The most common late complication was symptomatic lymphocele, which accounted for over 66% of late complications. The occurrence of lymphocele in our cohort was always associated with systemic pelvic and lumbo-aortic lymphadenectomy, which is in line with current literature (18,27). The different approaches to the prophylaxis of lymphoceles (careful hemostasis and lymphostasis using coagulation and clips, application of hemostatic preparations, opened peritoneum after lymphadenectomy) have so far exhibited inconclusive outcomes (27–29). Although the observational approach is applicable in cases of asymptomatic lymphocele, the mini-invasive approach is preferred when intervention is necessary (drainage under sonographic or CT guidance) (30).

MPPE does not influence the initiation of adjuvant chemotherapy to any great extent, although in individual cases of serious early complications (mainly anastomotic leakage) requiring re-laparotomy, a prolonged hospital stay as well as delayed start of additional treatment may be necessary. However, successful radical surgery still remains a crucial prognostic factor. Such observations correspond well with the conclusion of a recent study, which reported that the early initiation of chemotherapy might result in slightly improved survival in patients with complete cytoreduction, whereas patients with R after surgery did not benefit from earlier chemotherapy (31). Another study revealed no significant difference in clinical outcomes between high-grade serous ovarian cancer patient groups with early and late start of chemotherapy within six weeks after primary surgery (32). This confirms the crucial role of optimal cytoreduction in the treatment of advanced stages of ovarian cancer.

In conclusion, MPPE is a highly effective method with respect to achieving optimal debulking in cases with advanced ovarian cancer with direct invasion of the rectum. However, it is necessary to consider surgery-related morbidity. MPPE represents an extremely invasive technique and surgical plans as well as perioperative care should thus be personalized to address the individual medical and surgical conditions of each patient.

Funding

This work was supported by the Ministry of Health of the Czech Republic – conceptual development of research organization (FNBr, 65269705).

References

- Howlander N, Noone AM, Krapcho M. (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975–2012, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2012/, based on November 2014 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2015 (accessed October 30, 2016).
- Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr> (accessed October 30, 2016).
- Chi DS, Franklin CC, Levine DA, Akselrod F, Sabbatini P, Jarnagin WR, et al. Improved optimal cytoreduction rates for stages IIIC and IV epithelial ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer: a change in surgical approach. *Gynecol Oncol*. 2004;94:650–4.
- Vergote I, Tropé CG, Amant F, Kristensen GB, Ehlen T, Johnson N, et al. Neoadjuvant chemotherapy or primary surgery in stage IIIC or IV ovarian cancer. *N Engl J Med*. 2010;363:943–53.
- Vergote I, Amant F, Kristensen G, Ehlen T, Reed NS, Casado A. Primary surgery or neoadjuvant chemotherapy followed by interval debulking surgery in advanced ovarian cancer. *Eur J Cancer*. 2011;47(Suppl 3):S88–92.
- Chi DS, Eisenhauer EL, Zivanovic O, Sonoda Z, Abu-Rustum NR, Levine DA, et al. Improved progression-free and overall survival in advanced ovarian cancer as a result of a change in surgical paradigm. *Gynecol Oncol*. 2009;114:26–31.
- Emin L, Meeus P, Beurrier F, Ferraioli D, Carrabin N, Ray-Coquard I, et al. Postoperative morbidities after modified posterior pelvic exenteration for ovarian cancer. *Gynecol Obstet Fertil*. 2015;43:342–7.
- Chang SJ, Bristow RE. Surgical technique of en bloc pelvic resection for advanced ovarian cancer. *J Gynecol Oncol*. 2015;26:155.
- Fagotti A, Ferrandina G, Fanfani F, Ercoli A, Lorusso D, Rossi M, et al. A laparoscopy-based score to predict surgical outcome in patients with advanced ovarian carcinoma: a pilot study. *Ann Surg Oncol*. 2006;13:1156–61.
- Clavien PA, Barkun J, de Oliveira ML, Vauthey JN, Dindo D, Schulick RD, et al. The Clavien-Dindo classification of surgical complications: five-year experience. *Ann Surg*. 2009;250:187–96.
- Lampe B, Kroll N, Piso P, Forner DM, Mallmann P. Prognostic significance of Sugarbaker's Peritoneal Cancer Index for the operability of ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Cancer*. 2015;25:135–44.
- Schwartz PE. Cytoreductive surgery in the management of ovarian cancer. *Oncology (Williston Park)*. 2008;22:1025–33.
- Elstrand MB, Sandstad B, Oksefjell H, Davidson B, Tropé CG. Prognostic significance of residual tumor in patients with epithelial ovarian carcinoma stage IV in a 20 year perspective. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2012;91:308–17.
- Khiewvan B, Torigian DA, Emamzadehfard S, Paydary K, Salavati A, Houshmand S, et al. An update on the role of PET/CT and PET/MRI in ovarian cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2017;44:1079–91.
- Queiroz MA, Kubik-Huch RA, Hauser N, Freiwald-Chilla B, von Schulthess G, Froehlich JM, et al. PET/MRI and PET/CT in advanced gynaecological tumours: initial experience and comparison. *Eur Radiol*. 2015;25:2222–30.
- Houvenaeghel G, Gutowski M, Buttarelli M, Cuisenier J, Narducci F, Dalle C, et al. Modified posterior pelvic exenteration for ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2009;19:968–73.
- Tixier H, Fraise J, Chauffert B, Mayer F, Causeret S, Loustalot C, et al. Evaluation of posterior pelvic exenteration in the management of advanced-stage ovarian cancer. *Arch Gynecol Obstet*. 2010;281:505–10.
- Chéreau E, Ballester M, Rouzier R, Coutant C, Daraï E. Advanced ovarian cancer: criteria of resectability. *Bull Cancer*. 2009;96:1189–97.
- Geisler JP, Linnemeier GC, Thomas AJ, Manahan KJ. Nutritional assessment using prealbumin as an objective criterion to determine whom should not undergo primary radical cytoreductive surgery for ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2007;106:128–31.
- Vizzielli G, Costantini B, Tortorella L, Pitruzzella I, Gallotta V, Fanfani F, et al. A laparoscopic risk-adjusted model to predict major complications after primary debulking surgery in ovarian cancer: a single-institution assessment. *Gynecol Oncol*. 2016;142:19–24.
- Fago-Olsen CL, Hogdall C, Kehlet H, Christensen IJ, Ottesen B. Centralized treatment of advanced stages of ovarian cancer improves survival: a nationwide Danish survey. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2011;90:273–9.
- Khoury-Collado F, Chi DS. Recent surgical management of ovarian cancer. *J Obstet Gynaecol Res*. 2011;37:379–82.
- Jurado M, Alcazar JL, Baixauli J, Hernandez-Lizoain JL. Low colorectal anastomosis after pelvic exenteration for

- gynecologic malignancies: risk factors analysis for leakage. *Int J Gynecol Cancer*. 2011;21:397–402.
24. Richardson DL, Mariani A, Cliby WA. Risk factors for anastomotic leak after recto-sigmoid resection for ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2006;103:667–72.
 25. Moghadamyeghaneh Z, Hwang GS, Hanna MH, Carmichael JC, Mills S, Pigazzi A, et al. Surgical site infection impact of pelvic exenteration procedure. *J Surg Oncol*. 2015;112:533–7.
 26. Lau CS, Chamberlain RS. Probiotics are effective at preventing *Clostridium difficile*-associated diarrhea: a systematic review and meta-analysis. *Int J Gen Med*. 2016;22:27–37.
 27. Gauthier T, Uzan C, Lefevre D, Kane A, Canlorbe G, Deschamps F, et al. Lymphocele and ovarian cancer: risk factors and impact on survival. *Oncologist*. 2012;17:1198–203.
 28. Minig L, Patrono MG, Cárdenas-Rebollo JM, Martín Marfil P, Rodríguez-Tabares V, Chuang L. Use of TachoSil[®] to prevent symptomatic lymphocele after an aggressive tumor debulking with lymphadenectomy for advanced stage ovarian cancer. A Pilot Study. *Gynecol Obstet Invest*. 2016;81:497–503.
 29. Park NY, Seong WJ, Chong GO, Hong DG, Cho YL, Park IS, et al. The effect of nonperitonization and laparoscopic lymphadenectomy for minimizing the incidence of lymphocyst formation after radical hysterectomy for cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2010;20:443–8.
 30. Stukan M, Leśniewski-Kmak K, Wróblewska M, Dudziak M. Management of symptomatic ascites and post-operative lymphocysts with an easy-to-use, patient-controlled, vascular catheter. *Gynecol Oncol*. 2015;136:466–71.
 31. Mahner S, Eulenburg C, Staehle A, Wegscheider K, Reuss A, Pujade-Lauraine E, et al. Prognostic impact of the time interval between surgery and chemotherapy in advanced ovarian cancer: analysis of prospective randomised phase III trials. *Eur J Cancer*. 2013;49:142–9.
 32. Feng Z, Wen H, Bi R, Yang W, Wu X. Prognostic impact of the time interval from primary surgery to intravenous chemotherapy in high grade serous ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2016;141:466–70.

4.2. Sekundární cytoredukční chirurgie karcinomu vaječníku

Pokroky v operační léčbě a objevení nových možností cílené léčby v posledních dvou desetiletích zlepšují parametry přežití u karcinomu vaječníku, přesto však zůstává tento zhoubný nádor nejčastější příčinou úmrtí na gynekologické zhoubné nádory. I přes iniciální úspěšnou odpověď na standardní léčebné schéma, které u pokročilých stádií představuje v optimálním případě radikální operace s makroskopicky nulovým reziduem s následnou adjuvantní chemoterapií na bázi platinového preparátu, recidivuje až 80% léčených žen a pětileté přežití se týká 30% pacientek primárně pokročilých stádií [80]. Možnost signifikantní pomoci pacientkám platina-refrakterním (s progresí nemoci již v průběhu adjuvantní léčby) a platina-rezistentním (progredujícím v intervalu do 6 měsíců od ukončení adjuvantní terapie) je omezená, jejich léčba bývá založena na systémové chemoterapii bez užití platinového preparátu, ev. v kombinaci s cílenou léčbou. Sekundární cytoredukční operace v těchto případech zpravidla indikovaná není, neboť její profit je nedostatečný vzhledem k očekávané délce života a parametrům operační morbidity, ev. mortality. Léčebné schéma pacientek s onemocněním platina-senzitivním (s progresí nemoci po více jak 6 měsících od skončení adjuvantní terapie) není jednoznačně definováno. Za standard se považuje systémová léčba chemoterapií založená opět na platinovém preparátu, ev. opět v kombinaci s cílenou léčbou [81].

V souvislosti s rozvojem moderních zobrazovacích metod a individualizací léčebné strategie jednotlivých pacientek je však intenzivně diskutována a v praxi ověřována úloha sekundární operační cytoredukce právě v managementu platina-senzitivní recidivy ovariálních nádorů [82-83]. Při zvažování operace v těchto případech musí být respektovány některé základní skutečnosti, které se staly podkladem pomocných skórovacích systémů rozhodujících o akceptovatelnosti operace. Pro klinickou aplikaci těchto systémů je zásadní předoperační diagnostika, která musí respektovat „nepodkročitelné předoperační diagnostické minimum“ prezentované vyšetřením hrudníku, břicha a pánve počítačovou tomografií. Novější přístupy

směřují k využití moderních zobrazovacích metod (PET/CT, PET/MR), i když jejich přídatný benefit ještě není spolehlivě definován [84-86]. Možnost využití diagnostické laparoskopie na začátku operačního výkonu k ověření správnosti indikace operační cytoredukce může představovat určitou přidanou hodnotu, avšak výtěžnost tohoto postupu může být limitována adhezivním procesem po primární operaci [87,88]. Kromě předoperační a peroperační diagnostiky, které nám poskytují základní informace týkající se počtu rekurentních lézí a jejich lokalizace, se v rozhodovacích schématech uplatňují další faktory, např. věk pacientek a doba bez projevů nemoci po skončení léčby (platinum free interval, PFI) [89-91].

Cílem předoperační a peroperační diagnostiky je potvrzení oprávněnosti indikace operačního vstupu a selekce skupiny pacientek, u nichž je předpoklad dosažení tzv. optimální cytoredukce. Makroskopicky nulové reziduum je v současnosti reflektováno jako základní prognostický faktor ovlivňující parametry přežití [92-94]. Stejně adekvátní důraz je v souvislosti se sekundární cytoredukcí kladen na zachování kvality života léčených pacientek. Centralizace péče o tyto pacientky v onkogynekologických centrech je nezbytným předpokladem pro úspěch sekundární cytoredukce, který je v konečném výsledku charakterizován zachováním rovnováhy mezi prodloužením přežití pacientek s rekurencí a minimální operační morbiditou [95].

Tuto hypotézu potvrdil autor (jako korespondující autor) výstupy níže přiložené publikace, která porovnává příznivý efekt sekundární cytoredukční chirurgie v kombinaci s chemoterapií v komparaci s léčbou pouze chemoterapií na několika desítkách pacientek léčených v Onkogynekologickém centru FN Brno (viz **příloha 4.2.1.**) .

4.2.1. Felsing M, Minar L, Weinberger V, Rovny I, Zlamal F, Bienertova-Vasku J. Secondary cytoreductive surgery - viable treatment option in the management of platinum-sensitive recurrent ovarian cancer. (2018). *European Journal of Obstetrics, Gynecology & Reproductive Biology*, 228, pp. 154-160.



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejogrb

Full length article

Secondary cytoreductive surgery - viable treatment option in the management of platinum-sensitive recurrent ovarian cancer

Michal Felsinger^a, Lubos Minar^{a,*}, Vit Weinberger^a, Ivo Rovny^b, Filip Zlamal^d, Julie Bienertova-Vasku^{c,d}

^a Department of Gynecology and Obstetrics, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno and University Hospital Brno, Czech Republic

^b Department of General Surgery, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno and University Hospital Brno, Czech Republic

^c Department of Pathological Physiology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

^d Research Centre for Toxic Compounds in the Environment, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic



ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 March 2018

Accepted 14 June 2018

Available online xxx

Keywords:

Platinum-sensitive recurrent ovarian cancer

Secondary cytoreductive surgery

Chemotherapy

Disease-free survival

Overall survival

ABSTRACT

Objective: This study aimed to evaluate the impact of the secondary cytoreductive surgery on survival parameters in women with platinum-sensitive recurrent ovarian cancer who undergone secondary cytoreduction following chemotherapy compared to women who received chemotherapy alone.

Study Design: In a retrospective study, data were reviewed from women who were diagnosed and treated with ovarian cancer and its primary platinum-sensitive recurrence at the University Hospital Brno in the Czech Republic between November 2009 and March 2016. Out of the total number of 62 patients with recurrence, 30 women underwent cytoreductive surgery plus chemotherapy and 32 were treated with chemotherapy alone. The good performance status expressed by ECOG score 0–1, the single site of recurrence regardless of platinum-free interval or multiple sites of recurrence but no carcinomatosis and platinum-free interval >12 months, and no or small-volume ascites (<500 ml) were considered inclusion criteria for cytoreductive surgery. Women not meeting these criteria were treated by chemotherapy alone. Descriptive statistics, Kaplan-Meier survival curves and Log-Rank test were used for statistical estimations.

Results: The analysis confirmed more favorable prognosis in patient group treated with a combination secondary cytoreduction and chemotherapy. Mean disease-free survival (DFS) was 49.8 months (95% CI; 33.2–66.3) and mean overall survival (OS) stood at 54.0 months (95% CI; 39.4–68.6) in this patient cohort, while in patient group treated with chemotherapy alone it was found that mean DFS was 16.6 months (95% CI; 7.4–25.8) and mean OS stood at 26.2 months (95% CI; 16.6–35.8). When testing the difference between survival curves, statistically significant differences were observed in both DFS ($p = 0.010$) and OS ($p = 0.007$) rates between two treatment groups. Age ≤ 60 years at the time of recurrence and zero macroscopic residual disease after secondary cytoreduction were identified as favorable prognostic factors for both DFS and OS in a multivariate analysis.

Conclusion: Secondary cytoreductive surgery is acceptable as a viable treatment option for highly selected women with ovarian cancer recurrence. Complete resection is considered ultimate goal of secondary cytoreduction on condition that the balance between maximal survival gain and minimal operative morbidity will be kept.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

Introduction

Ovarian cancer is the most common cause of death among women with gynecological malignancies, with approximately 70%

being diagnosed in the advanced stages of the disease [1]. Despite the advancements in treatment and the initial successful response of most patients, 75–80% of women will recur and no more than approximately 30% of patients diagnosed with stages III–IV achieve five-year survival [2].

The standard treatment of women with recurrent ovarian cancer remains poorly defined. At present, combination platinum-based chemotherapy with or without target-based agents is deemed the main approach in therapy for platinum-sensitive recurrent ovarian cancer (ROC) [3]. However, surgical treatment

* Corresponding author at: Department of Gynecology and Obstetrics, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno and University Hospital Brno, Obilni trh 11, 602 00 Brno, Czech Republic.

E-mail address: lubosminar@seznam.cz (L. Minar).

may also have the irreplaceable role in the management of recurrent ovarian cancer [4]. The adequate selection of women with ROC for secondary cytoreductive surgery (SCS) is crucial due to the primary goal of SCS aiming at achieving optimal cytoreduction [5–7]. The prognostic importance of zero macroscopic residuum thus justifies extensive cytoreductive surgery, which may be associated with serious complications [8].

Primary objective of the present study was to evaluate the impact of the SCS on disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) in women with ROC undergoing secondary cytoreduction following chemotherapy (SCS + CT) compared to patients receiving chemotherapy (CT) alone. Furthermore, we investigated the impact of other prognostic factors on the survival parameters in relation to the first-line therapy and the recurrence of the disease in both groups of women.

Materials and methods

In a retrospective study, data were reviewed from women who were diagnosed and treated for ovarian cancer and its primary platinum-sensitive recurrence at the Department of Gynecology and Obstetrics at the University Hospital Brno in the Czech Republic between November 1, 2009 and March 1, 2016. The women underwent radical surgical treatment as primary debulking surgery (PDS) or interval debulking surgery (IDS) in combination with chemotherapy based on platinum at the time of primary diagnosis. The complete response after primary treatment validated by imaging method findings and tumor marker serum levels was achieved in all included cases. Out of the total number of 62 patients with ROC, 30 underwent secondary cytoreduction plus chemotherapy and 32 were treated with chemotherapy alone.

Both groups showed an approximately equivalent proportion of the parameters of the analyzed prognostic factors at the time of first-line therapy - FIGO stages, timing of radical surgery (PDS or IDS), performed lymphadenectomy, histologic type of tumor, tumor grade and residual disease (R) after PDS or IDS. Completeness of cytoreduction was analyzed using the Completeness of Cytoreduction score according to Sugarbaker, with R0 indicating the presence of zero macroscopic residuum, R1 a residuum of less than 0.25 cm, and R2 residuum of 0.25–2.5 cm [9].

Diagnosis of disease recurrence was based on an unambiguous finding of the imaging methods supplemented by a clinical examination and an evaluation of tumor marker serum level. A great deal of attention was paid to the selection of patients suitable for SCS. The patients underwent a complex examination using imaging methods (incl. PET/CT) to estimate the exact extent of the disease. The good performance status (Eastern Cooperative Oncology Group - ECOG=0–1), the single site of recurrence regardless of platinum-free interval (PFI) or multiple sites of recurrence but no carcinomatosis and PFI > 12 months, and no or small-volume ascites (<500 ml) were considered inclusion criteria for SCS. Women with ROC not meeting these criteria were treated by chemotherapy alone. Data regarding different characteristics at the time of recurrence (PFI, CA125 serum level, number of recurrent sites, sites of recurrence) and information regarding completeness of secondary cytoreductive surgery in women of SCS + CT group were extracted from medical records. The collected data were used for statistical analysis of survival parameters depending on the different prognostic factors. Disease free-survival and overall survival were calculated from the time of termination of chemotherapy for the first recurrence to the appearance of a second relapse and to death or last follow-up, respectively.

Data analyses were performed using SAS version 9.4 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Categorical variables were reported as number (percentage) and continuous variables were expressed as

median (mean). Pearson χ^2 test was used to evaluate inter-group differences and $p < 0.05$ was considered significant. Survival curves were constructed using the Kaplan-Meier method and the log-rank test.

The Ethical Committee of the University Hospital Brno, Czech Republic approved the study (reference number 231,117). All participants gave written informed consent at the time of first-line therapy for the use of their anonymized data in future studies.

Results

Basic clinical characteristics and prognostic factors of the cohorts of women at the time of first-line therapy are included in Table 1. PDS was performed approximately in 70% of both women groups. R0 after PDS reached 66.7% (in SCS + CT group) and 63.6% (in CT group), respectively. R0 after IDS was achieved in all women of both SCS + CT and CT groups. Basic characteristics and prognostic factors at the time of recurrence and status at last follow-up are showed in Table 2. We recorded longer PFI and lower CA125 serum levels at the time of relaps in the group of women selected for cytoreduction surgery. While in SCS + CT group were recorded almost 75% of isolated recurrences, women treated with CT only were affected by multiple recurrences in 93%. Pelvic recurrences (56.7%) prevail in SCS + CT group, one women was affected by brain metastasis. Multiple abdominal-pelvic recurrence (46.9%) followed by multiple abdominal recurrence (37.5%) occurred most often in CT group. Secondary cytoreductive surgery was associated with the achievement of zero macroscopic residual disease in 80% of all SCS + CT cases.

Performed surgical procedures of SCS are detailed in Table 3. The basic extent of surgery also included intestinal resection. This was performed in 18 women (60.0%), with a stapler anastomosis

Table 1
Patients characteristics at the time of first-line therapy.

Characteristic	SCS + CT	CT
Patients, N	30	32
Age, median (range), years	61.5 (34.0–74.0)	58.0 (34.0–86.0)
FIGO stage, N (%)		
I	5 (16.7)	4 (12.5)
II	6 (20.0)	3 (9.3)
III	19 (63.3)	23 (71.9)
IV	0 (0.0)	2 (6.3)
Operation, N (%)		
PDS	21 (70.0)	22 (68.7)
Completeness of cytoreduction	14	14
R0	3	4
R1	4	4
R2	9 (30.0)	10 (31.3)
Operation, N (%)	9	10
IDS	0	0
Completeness of cytoreduction	0	0
R0		
R1		
R2		
Lymphadenectomy, N (%)		
Yes	21 (70.0)	22 (68.7)
No	9 (30.0)	10 (31.3)
Histologic type, N (%)		
Serous	24 (80.0)	22 (68.7)
Mucinous	1 (3.3)	2 (6.3)
Endometrioid	2 (6.7)	6 (18.7)
Brenner	1 (3.3)	0
Mixed	2 (6.7)	2 (6.3)
Tumor grade, N (%)		
Low grade	5 (16.7)	4 (12.5)
High grade	25 (83.3)	28 (87.5)

FIGO, International Federation of Gynecology and Obstetrics; PDS, primary debulking surgery; IDS, interval debulking surgery; R, residual disease; SCS, secondary cytoreductive surgery; CT, chemotherapy.

Table 2
Patients characteristics at the time of recurrence.

Characteristic	SCS + CT	CT
Patients, N	30	32
Age, median (range), years	64.0 (36.0–76.0)	60.0 (36.0–88.0)
PFI, mean (95% CI), months	76.7 (51.2;102.2)	30.3 (23.4;37.3)
CA125, median (range), U/ml	30.5 (7.0–154.0)	159.5 (6.0–6500.0)
Number of recurrent sites, N (%)		
Solitary	22 (73.3)	2 (6.3)
Multiple	8 (26.7)	30 (93.7)
Sites of recurrence, N (%)		
Pelvic	17 (56.7)	2 (6.3)
Abdominal	5 (16.7)	12 (37.5)
Both	7 (23.3)	15 (46.9)
Distant	1 (3.3)	3 (9.3)
Completeness of secondary cytoreduction, N (%)		
R0	24 (80.0)	–
R1	4 (13.3)	–
R2	2 (6.7)	–
Status at last follow-up, N (%)		
No evidence of disease	11 (36.7)	2 (6.3)
Alive with disease	5 (16.7)	7 (21.8)
Dead of disease	14 (46.6)	23 (71.9)

PFI, platinum-free interval; CA125, cancer antigen 125; R, residual disease; SCS, secondary cytoreductive surgery; CT, chemotherapy.

in the case of 16 women. Two patients underwent permanent colostomy due to low rectosigmoid resection. One woman with isolated brain metastasis was subjected to successful neurosurgical intervention. In addition, information related to the intraoperative and postoperative complications (Grade I–IV) based on the Clavien-Dindo classification were collected [10]. Intraoperative complications occurred in three women. Specifically, one woman had hemorrhage (>1500 ml) and required blood transfusions during surgery (Grade II complication). Grade III complications requiring prompt additional surgery appeared in two women with large adhesions after primary surgery: lesions of small bowel and bladder were treated with immediate suture. A total of nine early postoperative complications were recorded in the cohort. Dominant early complication was worsening anemia with hemoglobin < 8 g/dl (Grade II), which occurred in four women who thus required blood transfusions during hospitalization. Prolonged pyrexia (>38 °C) requiring antibiotic treatment affected two patients and the same number of patients suffered from subacute bowel obstruction (both Grade II). Furthermore, one case of moderate pleural effusion was solved by noninvasive mechanical ventilation and physiotherapy (Grade I). However, no case of late postoperative complication as well as no case of mortality was observed.

Table 3
Surgical procedures of secondary cytoreductive surgery.

Surgical procedure ^a	N (%)
Excision of pelvic masses	20 (66.6)
Excision of abdominal masses	3 (10.0)
Large bowel resection	14 (46.6)
Small bowel resection	2 (6.7)
Colostomy	2 (6.7)
Peritonectomy	15 (50.0)
Colpectomy	1 (3.3)
Inguinal lymph node dissection	3 (10.0)
Retropertitoneal lymph node dissection	3 (10.0)
Abdominal anterior wall excision	1 (3.3)
Bladder partial resection	1 (3.3)
Cholecystectomy	1 (3.3)
Resection of liver	2 (6.7)
Resection of brain metastases	1 (3.3)

^a More than one procedure could be performed in the same patient.

All women included in the analysis were followed after the termination of treatment of recurrence until March 2018 or death. In the SCS + CT group, 11 (36.7%) women were alive without disease and 14 (46.6%) died, whereas in group of women treated by CT only, two (6.3%) were alive without disease and 23 (71.9%) died. In the SCS + CT group, five (16.7%) women and seven (21.8%) women in group treated by CT only were alive with disseminated recurrence (Table 2). The analysis of survival parameters confirmed more favorable prognosis in SCS + CT group. Mean DFS was 49.8 months (95% CI; 33.2–66.3) and mean OS stood at 54.0 months (95% CI; 39.4–68.6) in the SCS + CT group, respectively, whereas in CT group we found mean DFS 16.6 months (95% CI; 7.4–25.8) and mean OS 26.2 months (95% CI; 16.6–35.8), respectively. When testing the difference between survival curves using the log-rank test, statistically significant differences were observed in both DFS ($p = 0.010$) and OS ($p = 0.007$) rates between these two treatment groups (Figs. 1 and 2).

The impact of different prognostic factors on DFS and OS in the cohorts of women treated with SCS + CT and CT only was evaluated in the next part of the statistical analysis. In CT group, age > 60 years and CA125 > 35 U/ml at the time of recurrence and PFI < 12 months were poor prognostic factors for DFS in a multivariate analysis (Table 4). In an univariate analysis in CT group was PFI < 12 months poor prognostic factor for OS. In a multivariate analysis, we identified three poor prognostic factors (age > 60 years and CA125 > 35 U/ml at the time of recurrence, PFI < 12 months) for OS (Table 5). In SCS + CT group, interval debulking surgery was poor prognostic factor for DFS in the univariate analysis, whereas the absence of macroscopic zero residual disease after SCS and age > 60 years at the time of recurrence were detected as poor prognostic factors for DFS in a multivariate analysis (Table 6). In the group with SCS we identified zero macroscopic residual disease after SCS and age < 60 years at the time of recurrence as favorable prognostic factors for OS in a multivariate analysis (Table 7).

Comment

In the presented retrospective study we analyzed 62 women with platinum-sensitive recurrent

ovarian cancer. While respecting inclusion criteria for secondary cytoreductive surgery, we have demonstrated a significant improvement in both DFS and OS in SCS + CT group compared to CT group. Furthermore, in SCS + CT group, age < 60 years at the time of recurrence and zero macroscopic residual disease after SCS were identified as favorable prognostic factors for both DFS and OS in a multivariate analysis. In CT group, three prognostic factors (age > 60 years and CA125 > 35 U/ml at the time of recurrence, PFI < 12 months) were assessed as poor for both DFS and OS in a multivariate analysis.

Complete resection at SCS is an essential prognostic factor in women with platinum-sensitive ROC. There are the reports regarding predictive factors of complete cytoreduction in this cohort of women, some of them were externally validated. Chi et al. reported a complete resection rate of 41% at SCS in a retrospective study of 153 women, who undergone SCS. Based on their analysis, SCS was recommended for women with a single-site of recurrence, regardless of disease-free interval (DFI); women with multiple sites of recurrence but no carcinomatosis and DFI > 12 months; and women with carcinomatosis but DFI > 30 months [11]. Based on the AGO-OVAR DESKTOP Trial, the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie (AGO) score was introduced as another model for selection of patients with platinum-sensitive ROC for SCS [12]. Many studies have validated the positive predictive value of this model with high rate of complete resection, ranging 76.1%–89.2% [13–16], while also reporting high false-negative rates, ranging 65.4%–68.1% [15,16]. Tian et al. suggested model, which

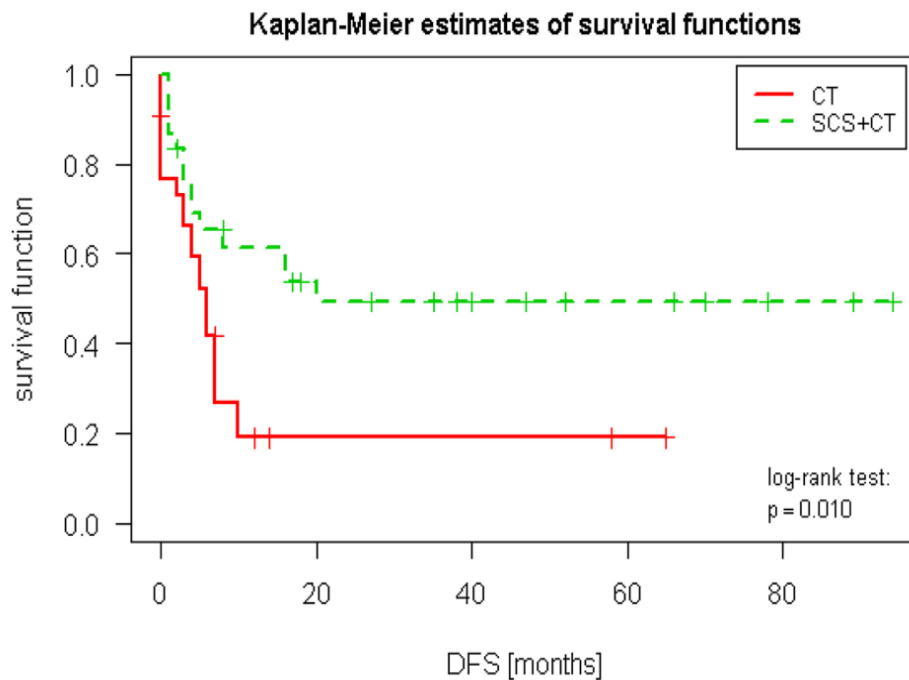


Fig. 1. Comparison of disease-free survival between SCS+CT and CT groups.

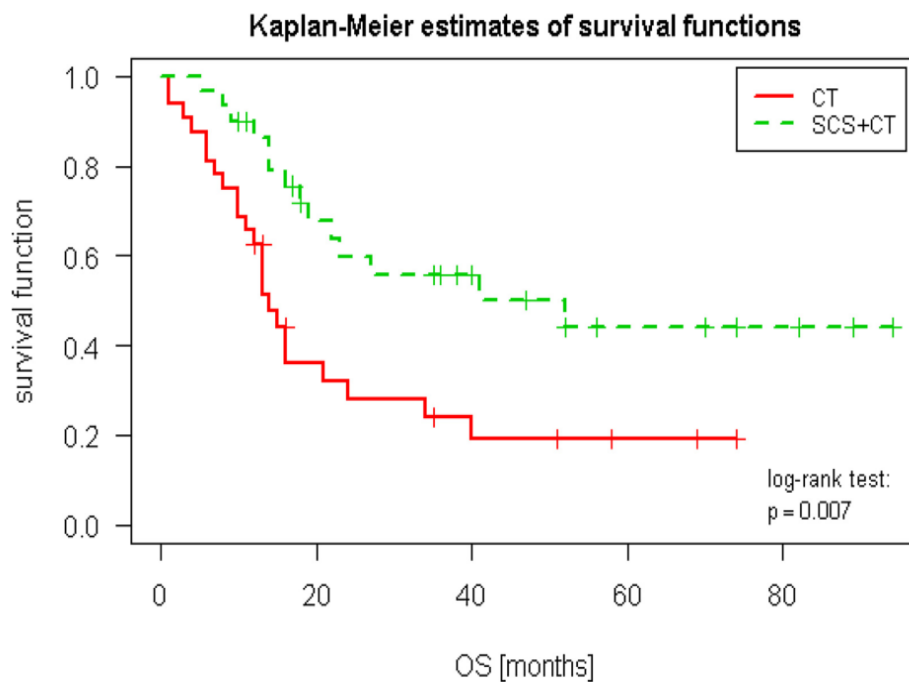


Fig. 2. Comparison of overall survival between SCS+CT and CT groups.

includes six variables (FIGO stage, residual disease after primary cytoreduction, ECOG performance status, DFI, CA125 serum level and the presence of ascites at recurrence) entered into the risk model. The proportion of macroscopically complete SCS was 53.4% in the low-risk group compared with 20.1% in the high-risk group. On contrary, this model showed also reports of high false-negative rate [17]. Newer models (SeC-Score, the Minaguchi criteria) have not been externally validated yet. Moreover, the Sec-Score requires HE4 serum level, which is not universally available in this population [18,19].

For population of our study, AGO criteria (ECOG = 0, no residual tumor after primary surgery, and no or small volume ascites <500 ml) were too strict, and their application would exclude 53% of cases from SCS+CT group. Therefore we created a set of modified criteria adjusted to our population of patients with platinum-sensitive ROC. Successful SCS associated with achievement of zero macroscopic residual tumor was performed in 80.0% (24/30) of patients whose median survival after surgery was 52.0 months compared to 14.0 months for women who received chemotherapy alone ($p = 0.007$). However, the decision of whether

Table 4
Univariate and multivariate analysis of DFS (CT patient cohort).

	Univariate analysis HR (95% CI)	p	Multivariate analysis HR (95% CI)	p
Status of first-line therapy				
FIGO stage	2.48 (0.83-7.44)	0.105	2.06 (0.42-10.09)	0.373
I + II vs III + IV				
Operation	2.22 (0.95-5.18)	0.065	2.13 (0.69-6.62)	0.190
PDS vs NACT + IDS				
Lymphadenectomy	1.15 (0.48-2.72)	0.756	1.31 (0.44-3.95)	0.626
No vs yes				
Histology	0.81 (0.33-1.97)	0.640	1.98 (0.67-5.80)	0.215
Serous high grade vs others				
Residual disease	1.17 (0.46-2.99)	0.739	1.08 (0.30-3.93)	0.907
R0 vs R1+R2				
Status of recurrence				
Age at recurrence	1.21 (0.53-2.77)	0.653	4.18 (1.20-14.54)	0.024^a
< 60 vs > 60				
PFI (months)	0.36 (0.12-1.06)	0.063	0.19 (0.04-0.85)	0.031^a
< 12 vs > 12				
CA125 (U/ml)	3.07 (0.91-10.40)	0.071	4.70 (1.08-20.41)	0.039^a
< 35 vs > 35				

FIGO, International Federation of Gynecology and Obstetrics; PDS, primary debulking surgery; NACT, neoadjuvant chemotherapy; IDS, interval debulking surgery; PFI, platinum-free interval; CA125, cancer antigen 125; HR, hazard ratio; CI, confidential interval.

^a Statistically significant.

Table 5
Univariate and multivariate analysis of OS (CT patient cohort).

	Univariate analysis HR (95% CI)	p	Multivariate analysis HR (95% CI)	p
Status of first-line therapy				
FIGO stage	2.05 (0.68-6.24)	0.204	1.24 (0.26-5.98)	0.788
I + II vs III + IV				
Operation	2.05 (0.86-4.93)	0.107	2.60 (0.73-9.21)	0.140
PDS vs NACT + IDS				
Lymphadenectomy	1.05 (0.44-2.50)	0.906	1.06 (0.30-3.73)	0.931
No vs yes				
Histology	0.78 (0.32-1.91)	0.585	1.49 (0.50-4.43)	0.475
Serous high grade vs others				
Residual disease	0.95 (0.37-2.42)	0.906	0.92 (0.26-3.19)	0.891
R0 vs R1+R2				
Status of recurrence				
Age at recurrence	1.15 (0.50-2.63)	0.747	6.71 (1.78-25.35)	0.005^a
< 60 vs > 60				
PFI (months)	0.32 (0.11-0.96)	0.042^a	0.11 (0.02-0.52)	0.005^a
< 12 vs > 12				
CA125 (U/ml)	2.99 (0.88-10.21)	0.080	5.65 (1.23-25.93)	0.026^a
< 35 vs > 35				

FIGO, International Federation of Gynecology and Obstetrics; PDS, primary debulking surgery; NACT, neoadjuvant chemotherapy; IDS, interval debulking surgery; PFI, platinum-free interval; CA125, cancer antigen 125; HR, hazard ratio; CI, confidential interval.

^a Statistically significant.

to perform SCS in platinum-sensitive ROC or to implement chemotherapy alone depends not only on the length of patient's survival but also on the quality of their life. It is important, potential survival gain with SCS should not be accompanied by a significant deterioration of the quality of life [20].

Second noteworthy issue is the impact of the earliest detection of asymptomatic relapse. This approach was associated with high likelihood of optimal SCS and extended OS in platinum-sensitive ROC operative candidates with isolated and localized disease [21,22]. There is a report that each week of delay after the first CA125 elevation correlates with a 3% increased chance of suboptimal debulking at SCS [23]. This fact supports the importance of regular surveillance with the evaluation of biochemical marker serum levels and using modern imaging methods (incl. PET/CT or PET/MRI) in exact detection of recurrence [24–27]. Nevertheless, this issue has to be further properly prospectively explored.

In conclusion, there remains an urgent unmet need for effective therapy of women with platinum-sensitive ROC after primary therapy. The results of our study contribute to the growing body of evidence of the benefit of SCS in this cohort. Secondary cytoreduction is accepted as a viable treatment option for selected patients providing that basic criteria are met. Precise preoperative staging designed to establish the limits of secondary surgical procedures plays an important role in determining the indication for surgical treatment. Either PET/CT or PET/MRI should be a part of standard noninvasive preoperative selection. At present, the strongest prognostic factor for women with ROC, who undergone SCS, represents the achievement of zero macroscopic residual disease. The complete resection is also the ultimate goal of SCS. This condition should be associated with the preservation of the quality of life. Therefore, it is necessary to keep the balance between maximal survival gain and minimal operative morbidity. The centralization of this complex surgery in tertiary referral

Table 6
Univariate and multivariate analysis of DFS (SCS + CT patient cohort).

	Univariate analysis HR (95% CI)	p	Multivariate analysis HR (95% CI)	p
Status of first-line therapy				
FIGO stage	1.07 (0.36–3.19)	0.906	1.80 (0.30–10.95)	0.523
I + II vs III + IV				
Operation	3.52 (1.19–10.37)	0.023^a	4.86 (0.55–43.14)	0.156
PDS vs NACT + IDS				
Lymphadenectomy	3.33 (0.74–14.93)	0.117	7.45 (0.54–102.77)	0.134
No vs yes				
Histology	0.57 (0.13–2.54)	0.460	4.98 (0.62–39.95)	0.131
Serous high grade vs others				
Residual disease	0.23 (0.03–1.75)	0.155	0.42 (0.02–10.09)	0.590
R0 vs R1+R2				
Status of recurrence				
Age at recurrence	2.81 (0.78–10.11)	0.113	12.10 (1.60–91.64)	0.016^a
< 60 vs > 60				
PFI (months)	0.64 (0.21–1.92)	0.425	2.95 (0.22–38.98)	0.410
< 12 vs > 12				
CA125 (U/ml)	0.85 (0.30–2.44)	0.768	0.62 (0.15–2.50)	0.500
< 35 vs > 35				
Residual disease (SCS)	2.42 (0.74–7.97)	0.146	16.18 (1.98–132.22)	0.009^a
R0 vs R1+R2				

FIGO, International Federation of Gynecology and Obstetrics; PDS, primary debulking surgery; NACT, neoadjuvant chemotherapy; IDS, interval debulking surgery; PFI, platinum-free interval; CA125, cancer antigen 125; HR, hazard ratio; CI, confidential interval.

^a Statistically significant.

Table 7
Univariate and multivariate analysis of OS (SCS + CT patient cohort).

	Univariate analysis HR (95% CI)	p	Multivariate analysis HR (95% CI)	p
Status of first-line therapy				
FIGO stage	1.04 (0.35–3.11)	0.944	2.92 (0.50–17.20)	0.237
I + II vs III + IV				
Operation	2.37 (0.83–6.79)	0.108	1.70 (0.13–21.94)	0.684
PDS vs NACT + IDS				
Lymphadenectomy	3.69 (0.82–16.58)	0.089	35.86 (1.30–986.07)	0.034^a
No vs yes				
Histology	0.56 (0.12–2.53)	0.453	8.32 (0.71–97.85)	0.092
Serous high grade vs others				
Residual disease	0.22 (0.03–1.69)	0.146	0.79 (0.03–22.81)	0.893
R0 vs R1+R2				
Status of recurrence				
Age at recurrence	3.10 (0.86–11.22)	0.084	41.47 (2.65–648.19)	0.008^a
< 60 vs > 60				
PFI (months)	0.77 (0.26–2.32)	0.647	3.89 (0.21–71.36)	0.361
< 12 vs > 12				
CA125 (U/ml)	0.99 (0.35–2.83)	0.987	1.14 (0.28–4.66)	0.856
< 35 vs > 35				
Residual disease (SCS)	2.03 (0.63–6.53)	0.233	45.11 (2.49–815.78)	0.010^a
R0 vs R1+R2				

FIGO, International Federation of Gynecology and Obstetrics; PDS, primary debulking surgery; NACT, neoadjuvant chemotherapy; IDS, interval debulking surgery; PFI, platinum-free interval; CA125, cancer antigen 125; HR, hazard ratio; CI, confidential interval.

^a Statistically significant.

centers with highly specialized teams plays a crucial role in the successful surgical management of women with platinum-sensitive ROC.

Conflict of interest statement

None.

Acknowledgements

The work was supported by the Ministry of Health, the Czech Republic - conceptual development of research organisation (FNBr, 65269705).

References

- [1] Howlader N., Noone AM, Krapcho M, editors. SEER cancer statistics review, 1975–2012. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2015. . based on November 2014 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2015 (accessed March 15, 2018) http://seer.cancer.gov/csr/1975_2012/.
- [2] Ferlay J, Soerjomataram I, Globocan Ervik M. 2012 v1.0, cancer incidence and mortality worldwide: IARC cancerBase No. 11 [internet]. Available from: Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. . (accessed March 15, 2018) <http://globocan.iarc.fr>.
- [3] Aghajanian C, Goff B, Nycum LR, Wang YV, Husain A, Blank SV. Final overall survival and safety analysis of OCEANS, a phase 3 trial of chemotherapy with or without bevacizumab in patients with platinum-sensitive recurrent ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2015;139:10–6.

- [4] Al Rawahi T, Lopes AD, Bristow RE, et al. Surgical cytoreduction for recurrent epithelial ovarian cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;28:CD008765.
- [5] Harter P, Heitz F, du Bois A. Surgery for relapsed ovarian cancer: when should it be offered? *Curr Oncol Rep*. 2012;14:539–43.
- [6] Sehouli J, Richter R, Braicu EI, et al. Role of secondary cytoreductive surgery in ovarian cancer relapse: who will benefit? A systematic analysis of 40 consecutive patients. *J Surg Oncol*. 2010;102:656–62.
- [7] Suh DH, Kim HS, Chang SJ, Bristow RE. Surgical management of recurrent ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2016;142:357–67.
- [8] Woelber L, Jung S, Eulenburger C, et al. Perioperative morbidity and outcome of secondary cytoreduction for recurrent epithelial ovarian cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2010;36:583–8.
- [9] Lampe B, Kroll N, Pisco P, Forner DM, Mallmann P. Prognostic significance of sugarbaker's peritoneal cancer index for the operability of ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Cancer*. 2015;25:135–44.
- [10] Clavien PA, Barkun J, de Oliveira ML, et al. The Clavien-Dindo classification of surgical complications: five-year experience. *Ann Surg*. 2009;250:187–96.
- [11] Chi DS, McCaughy K, Diaz JP, et al. Guidelines and selection criteria for secondary cytoreductive surgery in patients with recurrent, platinum-sensitive epithelial ovarian carcinoma. *Cancer* 2006;106:1933–9.
- [12] Harter P, du Bois A, Hahmann M, et al. Arbeitsgemeinschaft gynaekologische onkologie ovarian committee; AGO ovarian cancer study group. Surgery in recurrent ovarian cancer: the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie (AGO) DESKTOP OVAR trial. *Ann Surg Oncol*. 2006;13:1702–10.
- [13] Harter P, Sehouli J, Reuss A, et al. Prospective validation study of a predictive score for operability of recurrent ovarian cancer: the multicenter intergroup study DESKTOP II. A project of the AGO kommission OVAR, AGO study group, NOGGO, AGO-Austria, and MITO. *Int J Gynecol Cancer*. 2011;21:289–95.
- [14] Harter P, Beutel B, Alesina PF, et al. Prognostic and predictive value of the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie (AGO) score in surgery for recurrent ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2014;132:537–41.
- [15] Laas E, Luyckx M, De Cuyper M, et al. Secondary complete cytoreduction in recurrent ovarian cancer: benefit of optimal patient selection using scoring system. *Int J Gynecol Cancer*. 2014;24:238–46.
- [16] van de Laar R, Massuger LF, Van Gorp T, Int'Hout J, Zusterzeel PL, Kruitwagen RF. External validation of two prediction models of complete secondary cytoreductive surgery in patients with recurrent epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2015;137:210–5.
- [17] Tian WJ, Chi DS, Sehouli J, et al. A risk model for secondary cytoreductive surgery in recurrent ovarian cancer: an evidence-based proposal for patient selection. *Ann Surg Oncol*. 2012;19:597–604.
- [18] Angioli R, Capriglione S, Aloisi A, et al. A predictive score for secondary cytoreductive surgery in recurrent ovarian cancer (SeC-score): a single-centre, controlled study for preoperative patient selection. *Ann Surg Oncol*. 2015;22:4217–23.
- [19] Minaguchi T, Satoh T, Matsumoto K, et al. Proposal for selection criteria of secondary cytoreductive surgery in recurrent epithelial ovarian, tubal, and peritoneal cancers. *Int J Clin Oncol*. 2016;21:573–9.
- [20] Plotti F, Scaletta G, Aloisi A, et al. Quality of life in platinum-sensitive recurrent ovarian cancer: chemotherapy versus surgery plus chemotherapy. *Ann Surg Oncol*. 2015;22:2387–94.
- [21] Wang F, Ye Y, Xu X, Zhou X, Wang J, Chen X. CA-125-indicated asymptomatic relapse confers survival benefit to ovarian cancer patients who underwent secondary cytoreduction surgery. *J Ovarian Res* 2013;11:14–20.
- [22] Tanner EJ, Chi DS, Eisenhauer EL, Diaz-Montes TP, Santillan A, Bristow RE. Surveillance for the detection of recurrent ovarian cancer: survival impact or lead-time bias? *Gynecol Oncol* 2010;117:336–40.
- [23] Fleming ND, Cass I, Walsh CS, Karlan BY, Li AJ. CA125 surveillance increases optimal resectability at secondary cytoreductive surgery for recurrent epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2011;121:249–52.
- [24] Lenhard SM, Burges A, Johnson TRC, et al. Predictive value of PET-CT imaging versus AGO-scoring in patients planned for cytoreductive surgery in recurrent ovarian cancer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2008;140:263–8.
- [25] Pignata S, Cannella L, Leopardo D, Bruni GS, Facchini G, Pisano C. Follow-up with CA125 after primary therapy of advanced ovarian cancer: in favor of continuing to prescribe CA125 during follow-up. *Ann Oncol* 2011;22:40–4.
- [26] Beiderwellen K, Grueneisen J, Ruhlmann V, et al. [(18)F]FDG PET/MRI vs. PET/CT for whole-body staging in patients with recurrent malignancies of the female pelvis: initial results. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2015;42:56–65.
- [27] Suppiah S, Chang WL, Hassan HA, et al. Systematic review on the accuracy of positron emission tomography/computed tomography and positron emission tomography/magnetic resonance imaging in the management of ovarian cancer: Is functional information really needed? *World J Nucl Med*. 2017;16:176–85.

4.3. Chirurgický staging a jeho význam pro redukci rizika lokální rekurence primárního karcinomu zevních rodidel

Karcinom zevních rodidel sice představuje méně často se vyskytující gynekologický nádor, na druhé straně však předpokládaný trend dalšího vývoje incidence tohoto nádoru signalizuje vzestupnou tendenci ve vyspělých částech světa, tedy i v rámci České republiky [2]. Jedná se o zhoubný nádor typicky vyššího věku s poměrně snadnou a včasnou diagnostikou za předpokladu participace i vyšších věkových kategorií ženské populace na pravidelných preventivních prohlídkách. Tento přístup umožňuje záchyt nádorového onemocnění v nejčasnějších stádiích nemoci se současnou redukcí vlastního rozsahu operačního výkonu jak lokálně, tak ve svodné lymfatické oblasti.

Ve svodné lymfatické oblasti je možné aplikovat koncept biopsie sentinelové uzliny s pozitivními dopady na morbiditu léčených žen [96-98]. Samostatnou pozornost si zaslouží problematika rozsahu lokálního výkonu na zevních rodidlech, která prošla určitým historickým vývojem. Na počátku operační léčby, která je hlavní terapeutickou modalitou průřezově všemi stádii nemoci (dominantně samozřejmě časnými), byly mutilující výkony typu en bloc radikální vulvektomie s bilaterální tříselnou lymfadenektomií a často i pánevní lymfadenektomií. Jednalo se o výkony značně radikální, které byly spojené nejen s vysokou morbiditou (až 80%), ale rovněž i s určitou mortalitou [99]. Důležitou modifikací bylo využití samostatných incizí pro provedení lymfadenektomie v obou tříslech, což přispělo ke snížení morbidity [100]. Trend posledních dvaceti let je spojen s další významnou změnou v rozsahu lokálního výkonu na vulvě, a sice s přechodem od totální vulvektomie k hemivulvektomii a širokým excizím v případě unilaterálních nálezů za předpokladu současné absence dystrofických změn v dalších partiích zevních rodidel. Smyslem bylo redukovat značnou morbiditu a dosáhnout lepších anatomických výsledků spojených rovněž s významně pozitivním psychosexuálním dopadem [101,102].

Současný trend rozsahu lokální operační léčby karcinomu zevních rodidel je založen na individualizaci přístupu, tj. stanovení optimálního rozsahu a radikality operace u každé pacientky na základě zhodnocení souboru prognostických faktorů. Hlavní parametry ovlivňující lokální rozsah operačního výkonu u unifokálních tumorů představují velikost nádoru, jeho lokalizace na zevních rodidlech (prognosticky nepříznivá je lokalizace mediální) a vzdálenost nádoru od ostatních orgánů, tj. zevního ústí močové trubice, pochvy a konečníku [103-105].

Hlavním cílem je dosažení kompletní exstirpace nádoru s dostatečným lemem nádorem nepostížené tkáně. Autor se ve své klinické praxi a při následném statistickém vyhodnocení získaných výsledků zaměřil právě na analýzu rozsahu volného resekcčního okraje, který je hlavním prognostickým faktorem lokální recidivy nádoru ovlivnitelným onkogynekologickým operáteřem. Klíčový důraz je přitom kladen na co možná nejdokonalejší znalost lokálního rozsahu nádoru před operačním výkonem, což umožní aplikaci adekvátně radikálního operačního přístupu. Ten je zásadním předpokladem pro redukci overtreatmentu bez zhoršení prognózy při současném zachování dostatečné kvality života léčených žen [53]. Onkologická bezpečnost by měla být respektována i v méně často se vyskytujících případech lokálně pokročilých nádorů se šířením na okolní orgány a v případě tolerance radikálního výkonu pacientkou by samotná velikost nádoru neměla být důvodem neprovedení operace. Tento typ výkonu již samozřejmě vyžaduje funkční interdisciplinární spolupráci dalších operačních oborů pro zajištění onkologicky bezpečné resekcce okolních orgánů a rekonstrukci rozsáhlých tkáňových defektů [106,107]. Publikace věnující se této problematice na podkladě analýzy několika desítek pacientek léčených v Onkogynekologickém centru FN Brno je uvedena v **příloze 4.3.1.**

4.3.1. Minar L, Felsing M, Cihalova M, Zlamal F, Bienertova-Vasku J. Vulvar cancer recurrence – an analysis of prognostic factors in tumor-free pathological margins patients group. (2018). *Ginekologia Polska*, 89(8), pp. 351-358.

Vulvar cancer recurrence — an analysis of prognostic factors in tumour-free pathological margins patients group

Lubos Minar¹, Michal Felsinger¹, Marta Cihalova², Filip Zlamal⁴, Julie Bienertova-Vasku^{3, 4}

¹Department of Gynecology and Obstetrics, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno and University Hospital Brno, Czech Republic

²Department of Pathology, University Hospital Brno, Czech Republic

³Department of Pathological Physiology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

⁴Research Centre for Toxic Compounds in the Environment, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic

ABSTRACT

Objectives: To evaluate risk factors associated with the local recurrence of invasive squamous cell vulvar cancer in patient group with tumor-free pathological margins.

Material and methods: This is a retrospective analysis of 47 patients who underwent surgical treatment at University Hospital Brno, the Czech Republic between 2007 and 2014. 24 patients were classified as IB stage and three as II stage. A further 20 patients representing stage III showed the metastatic involvement of regional lymph nodes. Seven prognostic factors were analyzed in relation to local tumour recurrence: tumour size, margin distance, depth of invasion, lymphovascular space involvement (LVSI), midline involvement, metastatic lymph nodes and FIGO stage.

Results: All prognostic factors were found to be statistically significant with respect to the risk of local recurrence. The highest risk of local recurrence was observed for the depth of invasion > 5 mm (HR, 12.42 [95% CI; 3.44–44.84]) and for the presence of LVSI (HR, 10.83 [95% CI; 3.87–30.28]). The study also established a clear difference in the risk of local recurrence between patient groups with resection margin < 8 vs. ≥ 8 mm (HR, 4.91 [95% CI; 1.73–13.93; p = 0.003]).

Conclusions: Tumour-free pathological margin of ≥ 8 mm is a major prognostic factor of local recurrence which can be influenced by the surgeon. A perfect knowledge of the extent of the disease prior to surgery supports adequately radical surgical trends. The emphasis is given on adequate radicality as well as on the reduction of overtreatment without worsening prognosis by simultaneously preserving the quality of life.

Key words: squamous cell vulvar cancer, surgical treatment, tumour-free pathological margins, local recurrence

Ginekologia Polska 2018; 89, 8: 351–358

INTRODUCTION

Vulvar squamous cell carcinoma (VSCC) is a less frequently occurring tumour among predominantly older women. It accounts for 3–5% of all gynaecological malignancies, but its incidence has been steadily increasing over the past twenty years. Median age at vulvar cancer diagnosis is 68 years and the median age at death is 79 years [1]. Surgical treatment is a preferred treatment approach not only in the early stages but also in most locally advanced cases and recurrences [2, 3]. Surgical treatment strategies for the vulva and adjacent

lymph nodes has changed considerably over the past two decades. Novel surgical approaches are primarily focused on the early stages of disease with a preference for broad local excision combined with sentinel node biopsy. Locally advanced findings are, from this perspective, more challenging and treatment results less satisfactory. The surgical strategy in these cases generally includes vulvectomy with systematic bilateral inguinofemoral lymphadenectomy [3, 4]. In the case of extensive defects which cannot be solved by a simple suture, reconstruction surgery performed by a re-

Corresponding author:

Lubos Minar, MD, PhD

Department of Gynecology and Obstetrics, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno and University Hospital Brno

Obilni trh 11, 602 00 Brno, Czech Republic

tel.: +420737156847, e-mail: lubosminar@seznam.cz

constructive surgeon may be imperative [5, 6]. An alternative to this approach is the use of the concept of neoadjuvant chemotherapy with or without concomitant radiotherapy in patients with severe internal comorbidities [7, 8].

Approximately one-third of patients experience a recurrence of the disease, predominantly in the first two years following the end of primary therapy [9, 10]. A majority of recurrences represent isolated local vulvar recurrences which may be curatively resolved by radical wide local excision [11, 12]. However, the regional recurrence of the disease in the groin is difficult to treat and is largely associated with poor prognosis [13, 14]. The management of retroperitoneal and remote disease recurrence is based on symptom control, as radiotherapy and chemotherapy exhibit limited success rates [15].

Objectives

The aim of this retrospective study is to analyze risk factors associated with local recurrence in a group of VSCC patients classified as stages IB–IIIC according to the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO), provided there are tumour-free pathological margins at first-line surgical therapy.

MATERIAL AND METHODS

This retrospective study includes 47 patients with invasive VSCC classified as FIGO stages IB–IIIC who underwent primary surgery with tumour-free pathological margins between January 2007 and December 2014 at the Department of Gynecology and Obstetrics of the University Hospital Brno (Brno, Czech Republic). Patients with microinvasive carcinoma (FIGO stage IA) with the negative resection margins have an excellent prognosis, therefore we did not include them in the study. Based on biopsy results and local clinical findings, suitable imaging methods were employed before surgery in order to determine the expected stage of the disease and to exclude distant metastases. An ultrasound examination was generally used to evaluate possible malignant inguinofemoral lymphadenopathy while computer tomography was predominantly used to exclude pelvic lymphadenopathy and tumour dissemination above the pelvis. Scintigraphy was performed to exclude bone metastases and a PET/CT scan was employed when planning a large-scale excision with reconstruction. Only patients who were expected to complete primary staging surgery, i.e. patients without fixed inguinofemoral lymphadenopathy and with no suspicion of distant metastases, were included in the evaluation.

In all patients, the surgical procedure consisted of excision surgery on the vulva in combination with a surgical verification of regional lymph node status. Vulvar surgery was defined as a radical excision or vulvectomy, depending on the size of the tumour and the coexistence of dystrophic

and premalignant changes. Regional inguinofemoral lymphadenectomy was performed as unilateral or bilateral. In lateral tumours, only ipsilateral lymphadenectomy was performed. A unilateral tumour was defined as a lesion which does not cross the midline, with the medial margin of the tumour more than 10 mm from the midline structures. The utilized lymphadenectomy technique included systematic performance or sentinel node biopsy (SNB). SNB was performed in tumours smaller than 4 cm in case of negative clinical and ultrasound findings in the inguinofemoral lymphatic region; in case sentinel node was found to be positive, bilateral systemic lymphadenectomy was performed. Adjuvant radiotherapy for the vulva region was reported by patients with a resection margin of < 8 mm, a depth of invasion > 5 mm, a presence of lymphovascular space involvement (LVSI) and with locally advanced tumours infiltrating of surrounding organs. Adjuvant radiotherapy of the lumbar region (inguinofemoral and pelvic) was indicated in case more than one regional node was involved or extracapsular spread was presented (irrespective of the number of affected nodes).

Information on age was reported by each patient while histotype and tumour grade were determined on the basis of the performed operation. Additionally collected information included tumour size, margin distance, depth of invasion, LVSI, midline involvement and metastatic inguinofemoral lymph nodes. The staging of the disease according to FIGO was determined, and risk factors for recurrence, disease-free survival (DFS), overall survival (OS) and mortality index due to disease progression were analyzed. All enrolled patients met the regular follow-up (range, 4–105 months) criterion.

Statistical analysis

Categorical variables were reported as absolute numbers and percentages and continuous variables as means \pm SD or median (range) respectively. Associations between prognostic factors and recurrence were tested using the Spearman correlation coefficient and the chi-squared test. The Cox proportional hazard ratio was assessed to estimate risk factors for recurrences. Differences in the distributions of patient characteristics were analyzed using the t-test and the Mann-Whitney test. DFS and OS were analyzed using the Kaplan-Meier test. Differences associated with $p < 0.05$ were considered significant. All analyses were performed using SAS version 9.4 (SAS Institute, Cary, NC, USA) and graphics were constructed using R version 3.2.1 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

RESULTS

The analysis included a total of 47 patients with invasive VSCC. The youngest patient was 44, the oldest was 85 years old. All tumours included in the analysis were unifocal. When

evaluating the local tumour range on the vulva, the most common was T1b, encountered in 38 patients (80.8%), followed by T2 in the remaining 9 patients (19.2%) where local infiltration spread from the vulva to the adjacent organs (the distal third of the urethra and vagina). A large tumour of at least 40 mm in the largest dimension occurred in 42.5% of all patients. The appropriate margins ≥ 8 mm, recommended by most existing studies, were achieved in 22 patients (46.8%), close margins (< 8 mm) were observed in 25 patients (53.2%), ranging from 0.15 to 7.0 mm. The depth of invasion > 5 mm occurred in 22 patients (46.8%) with a predominance of larger tumours and a mean of 51 mm (range, 12–120 mm). LVSI was present in 25.5% of patients and was always associated with the presence of malignant inguino-femoral lymphadenopathy with an average of 4.0 metastatic nodes (range: 1–10 metastatic nodes). The tumours were predominantly involved in the midline area (76.6%), while the most frequently occurring grade was moderately differentiated. A progression to regional lymph nodes was

established in 20 patients (42.5%), with six patients presented with bilateral involvement. These 20 patients were classified as stage III according to FIGO (five patients each as stages IIIA and IIIB, 10 as stage IIIC). Stage IB, observed in 24 patients, was most common (Table 1).

Table 2 provides an overview of the performed surgical procedures. A total of 15 patients (31.9%) were subjected to primary surgery with no need for adjuvant therapy, with a predominance of radical excision, performed in the case of 9 patients (60.0%) in this subgroup. This subgroup featured an almost identical proportion of ipsilateral and bilateral lymphadenectomy. A total of 32 patients (68.1%) underwent combined vulvar and regional node surgery followed by adjuvant radiotherapy. This subgroup most frequently included patients subjected to a combination of vulvectomy with lymphadenectomy (25 patients), the lymphadenectomy was performed as unilateral in only one case. In eight patients, supplementary reconstruction surgery of the vulva with bilateral use of the skin lobes was necessary for overlap of the defect. All 32 patients underwent adjuvant radiotherapy in the area of the vulva; nodal radiotherapy was performed in 20 patients.

During the follow-up period, 21 recurrences (44.7%) were observed, with the disease recurring in 76.2% of patients during the first two years after primary therapy. Table 3 provides an overview of the anatomical localization of recurrences, depending on analyzed prognostic factors. In 13 patients, the recurrence was observed in the vulvar region; the median recurrence period was 16 months (range, 6–82 months). Of the patients with local recurrence, 53.8% were primarily enrolled at advanced stage III with the metastatic involvement of regional lymph nodes. Three cases of regional relapse in the groin were preceded by systematic inguino-femoral lymphadenectomy, and only one patient of them had a negative surgical staging of the lymph nodes during primary

Table 1. Patient and tumor characteristics

Patient and tumor characteristics	N	%
Age (years)		
Median (range)	70.0 (44.0–85.0)	
Tumor size (mm)		
Median (range)	35.0 (6.0–120.0)	
< 40 mm	27	57.4
≥ 40 mm	20	42.6
Margin distance (mm)		
Median (range)	7.0 (0.15–20.0)	
< 8 mm	25	53.2
≥ 8 mm	22	46.8
Depth of invasion (mm)		
Median (range)	5.0 (0.5–12.0)	
≤ 5 mm	25	53.2
> 5 mm	22	46.8
LVSI^a		
Yes	12	25.5
No	35	74.5
Involvement of midline		
Involved	36	76.6
Not involved	11	23.4
Grade		
Grade 1	7	14.9
Grade 2	31	66.0
Grade 3	9	19.1
Metastatic lymph nodes		
No metastases	27	57.4
Ipsilateral	14	29.8
Bilateral	6	12.8
FIGO^b stage		
I	24	51.1
II	3	6.3
III	20	42.6

^aLVSI — Lymphovascular Space Invasion; ^bFIGO — International Federation of Gynecology and Obstetrics

Table 2. Treatment characteristics

Treatment	No. patients	%
Surgical treatment only	15	31.9
Radical excision with lymphadectomy		
ipsilateral	7	14.9
bilateral	2	4.3
Vulvectomy with lymphadenectomy		
ipsilateral	1	2.1
bilateral	5	10.6
Surgical treatment with radiotherapy	32	68.1
Radical excision with lymphadenectomy		
ipsilateral	0	0.0
bilateral	7	14.9
Vulvectomy with lymphadenectomy		
ipsilateral	1	2.1
bilateral	24	51.1

Table 3. Risk factors for vulvar cancer recurrence			
Risk factor	Vulvar recurrence/ No. patients (%)	Groin recurrence/ No. patients (%)	Distant recurrence/ No. patients (%)
Tumor size			
< 40 mm	7 /27 (25.9)	1/27 (3.7)	1/27 (3.7)
≥ 40 mm	6/20 (30.0)	2/20 (10.0)	4/20 (20.0)
Margin distance			
< 8 mm	9/25 (36.0)	2/25 (8.0)	5/25 (20.0)
≥ 8 mm	4/22 (18.2)	1/22 (4.5)	0/22 (0.0)
Depth of invasion			
≤ 5 mm	4/25 (16.0)	0/25 (0.0)	0/25 (0.0)
> 5 mm	9/22 (40.9)	3/22 (13.6)	5/22 (22.7)
LVSI^a			
Yes	5/12 (41.7)	2/12 (16.7)	4/12 (33.3)
No	8/35 (22.9)	1/35 (2.9)	1/35 (2.9)
Involvement of midline			
Involved	13/36 (36.1)	2/36 (5.6)	5/36 (13.9)
Not involved	0/11 (0.0)	1/11 (7.7)	0/11 (0.0)
Metastatic lymph nodes			
No metastases	6/27 (22.2)	1/27 (3.7)	0/27 (0.0)
Metastases	7/20 (35.0)	2/20 (10.0)	5/20 (25.0)
FIGO^b stage			
I + II	6/27 (22.2)	1/27 (3.7)	0/27 (0.0)
III	7/20 (35.0)	2/20 (10.0)	5/20 (25.0)

^aLVSI — Lymphovascular Space Invasion; ^bFIGO — International Federation of Gynecology and Obstetrics

surgery. The median rate of regional recurrence period was 12 months (range, 10–15 months). In five patients with primary metastatic regional lymph nodes, distant metastases appeared, always as the pelvic lymphadenopathy, which was combined with pulmonary involvement in two cases and with bone metastases and brain involvement in one case respectively. The median occurrence of distant recurrences was 6 months (range, 3–10 months). We recorded the deaths of 19 patients, two of whom died without recurrence of other causes; the mortality index for the analyzed group was 40.4%. Four patients with surgically treated local recurrence are still alive and 24 patients live without recurrence.

During the follow-up period (range, 4–118 months), we observed a mean DFS of 66.7 + 6.5 months (95% CI; 54.0–79.5) (Fig. 1) and a mean OS of 69.7 + 6.2 months (95% CI; 57.6–81.8) (Fig. 2).

The univariate analysis of local vulvar recurrence established a statistical significance in all prognostic factors analyzed at $p < 0.05$. By quantifying the risk of recurrence risk using the Cox regression model, we found the highest risk of local relapse in patients exhibiting invasion depth > 5 mm compared to invasion depth ≤ 5 mm, HR 12.42 (95% CI, 3.44–44.84), and in the patients with LVSI compared to those without LVSI, HR 10.83 (95% CI; 3.87–30.28) (Table 4).

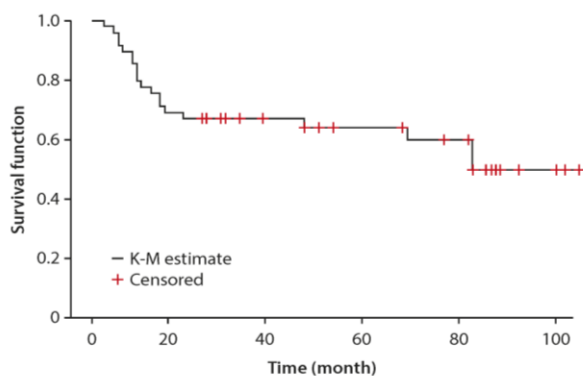


Figure 1. Kaplan-Meier estimate of survival function (DFS)

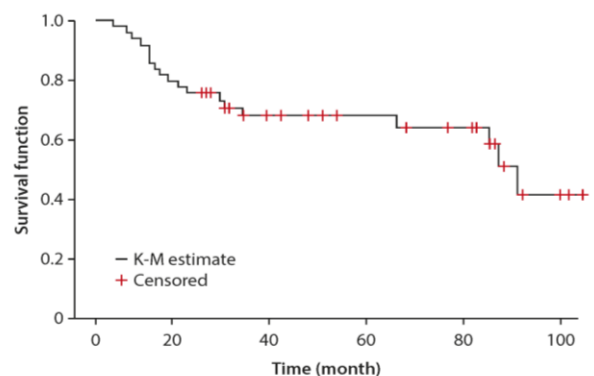


Figure 2. Kaplan-Meier estimate of survival function (OS)

Risk factor	HR ^c (95% CI)	p
Tumor size (≥ 40 mm vs. < 40 mm)	2.80 (1.12–6.99)	0.027
Margin distance (< 8 mm vs. ≥ 8 mm)	4.91 (1.73–13.93)	0.003
Depth of invasion (> 5 mm vs. ≤ 5 mm)	12.42 (3.44–44.84)	< 0.001
LVSI^a (yes vs. no)	10.83 (3.87–30.28)	< 0.001
Involvement of midline (involved vs. not involved)	7.63 (1.02–57.12)	0.048
Metastatic lymph nodes (metastases vs. no metastases)	9.64 (3.03–30.69)	< 0.001
FIGO^b stage (III vs. I + II)	9.64 (3.03–30.69)	< 0.001

^aLVSI — Lymphovascular Space Invasion; ^bFIGO — International Federation of Gynecology and Obstetrics; ^cHR — Cox proportional hazard ratio

In the next part of the analysis, we focused on the comparison of the risk of recurrence stratified by the time interval of recurrence. Borderline statistical significance for early recurrence in the first two years compared to late recurrence was found to be associated with depth of invasion (> 5 mm), metastatic lymph nodes and advanced FIGO stages (Table 5). When the associations between continuous variables (age, tumour size, margin distance, depth of invasion) were tested, statistical significance was not established between age and depth of the invasion, the borderline significant association was identified between the age and size of the tumour, other correlations were statistically significant (Table 6). Statistically significant associations between LVSI and metastatic lymph nodes, LVSI and FIGO stage, metastatic lymph nodes and FIGO stage respectively were observed when testing the associations between categorical variables (Table 7). When testing differences between distributions of continuous variables across categories, no statistically significant association between only age and midline involvement; and

Table 5. Risk factors of local recurrence — impact of the time interval to recurrence

Risk factor	Recurrence ≤ 2 years No./8 patients (%)	Recurrence > 2 years No./5 patients (%)	p ^c
Tumor size (≥ 40 mm)	4/8 (50.0)	2/5 (40.0)	0.724
Margin distance (< 8 mm)	7/8 (87.5)	2/5 (40.0)	0.070
Depth of invasion (> 5 mm)	6/8 (75.0)	1/5 (20.0)	0.047
LVSI ^a	4/8 (50.0)	1/5 (20.0)	0.268
Involvement of midline	8/8 (100.0)	5/5 (100.0)	0.991
Metastatic lymph nodes	6/8 (75.0)	1/5 (20.0)	0.047
FIGO ^b stage III	6/8 (75.0)	1/5 (20.0)	0.047

^aLVSI — Lymphovascular Space Invasion; ^bFIGO — International Federation of Gynecology and Obstetrics; ^cmaximum likelihood estimation method

Table 6. Associations between continuous variables

Variables	Age	Tumor size	Margin distance
Tumor size	p ^a = 0.051	—	—
Margin distance	p ^a = 0.040	p ^a = 0.006	—
Depth of invasion	p ^a = 0.096	p ^a = 0.001	p ^a = 0.006

^aSpearman correlation coefficient

Table 7. Associations between categorical variables

Variables	LVSI ^b	Involvement of midline	Metastatic lymph nodes
Involvement of midline	p ^c = 0.807	—	—
Metastatic lymph nodes	p ^c < 0.001	p ^c = 0.129	—
FIGO ^a stage	p ^c < 0.001	p ^c = 0.129	p ^c < 0.001

^aFIGO — International Federation of Gynecology and Obstetrics; ^bLVSI — Lymphovascular Space Invasion; ^cchi-squared test

Table 8. Differences in the distribution of continuous variables across categories

Variables	LVSI ^c	Involvement of midline	FIGO ^d stage
Age	p ^a = 0.012	p ^a = 0.788	p ^a = 0.020
Tumor size	p ^a = 0.004	p ^a = 0.006	p ^a < 0.001
Margin distance	p ^b = 0.052	p ^b = 0.028	p ^b = 0.001
Depth of invasion	p ^b < 0.001	p ^b = 0.072	p ^a < 0.001

^at-test; ^bMann-Whitney test; ^cFIGO — International Federation of Gynecology and Obstetrics; ^dLVSI — Lymphovascular Space Invasion

depth of the invasion and midline involvement respectively was not observed. The borderline significant association was determined between margin distance and LVSI (Table 8). Due to the limited number of regional and remote recurrences, no analysis of their prognostic factors was conducted.

DISCUSSION

Primary surgery is a preferred therapeutic approach for VSCC in case no distant metastases are present. The prognosis of primarily operated patients is strictly dependent on the metastatic involvement of regional lymph nodes, which is strongly associated with the risk of relapse and aggravated survival. This was demonstrated in our group of patients, where recurrence (regardless of its localization) occurred in 70% of patients with primary metastatic lymphadenopathy. Half of the recurrences in these patients occurred in the inguinal area or pelvic lymph nodes, which is consistent with the literature [16–18]. Most prevalently, the patients with primary extracapsular nodal involvement presented with most frequent recurrence (90%) despite adjuvant radiotherapy. In spite of this, surgical treatment followed by radiotherapy is more efficient and preferable to radiotherapy alone [3]. In case of suspected metastatic involvement of the groin nodes, a biopsy should be performed. The optimal management of these cases — inguinofemoral lymphadenectomy or groin node debulking — has not been defined yet [3, 19]. The exclusion of the presence of disease in the pelvis using PET/CT or PET/MRI is important to determine a rational treatment strategy [20, 21]. In case a patient's condition is suitable, pelvic debulking may be considered as an option despite the fact that pelvic disease is already considered a distant metastatic involvement [3].

In case of regional lymph nodes are found to be negative, a set of clinical and histopathological parameters which may affect disease recurrence must be considered. Due to the limited number of regional and remote recurrences in our study, we statistically analyze possible prognostic factors only for the risk of local recurrence. All seven analyzed prognostic factors were revealed to be statistically significant in this analysis; midline involvement achieved borderline statistical significance, likely due to more radical surgical treatment in patients with this risk factor. The highest risk of local recurrence occurred in coincidence with the presence of a deep invasion of > 5 mm and LVSI (12× or 10× higher respectively). Other intergroup analyses revealed the statistically significant associations of some continuous (tumour size, margin distance, depth of invasion) and categorical variables (LVSI, metastatic lymph nodes).

Although the total number of recurrences (local, regional, remote) reporting in our study is relatively high (44.7%), disease recurrence occurred in a quarter of the patients after more than two years from the end of the primary treatment. The proportion of local recurrences among the total number of recurrences is 62%; this correlates with recent sources which report rates in excess of 50% [10, 16, 22]. The proportion of local relapses recurring after more than two years of follow-up was almost 40% in our study.

This is a substantial challenge, eliciting a discussion of the VSCC local recurrence definition, in the frame of which two factors should be considered. First, it is recurrence interval, second, the distance between localization of primary tumour and recurrence. As most recurrence cases take place during the first two years, some authors have suggested that late recurrences may, in fact, constitute *de novo* tumours [23, 24]. Our analysis found borderline statistical significance for an early risk of local recurrence (up to two years) in three prognostic factors (depth of invasion > 5 mm, metastatic lymph nodes, FIGO III stage). To facilitate the discussion and differentiate a real local recurrence from *de novo* tumour, the detailed documentation, including an image or clinical plot, appears as crucial [3, 23, 24].

FIGO I-II stages represent in our study almost 58% of all cases, which corresponds to the current distribution of the early stages of the disease in the population of Czech women [25].

Furthermore, 20 patients with stage III were included in the analysis. The inclusion of advanced-stage patients helps to validate the relationship between prognostic factors and risk of local recurrence. Thus, these results are not only limited to those with early-stage cancers but can be generalized to the more advanced tumours in that is also important to obtain adequate margins in advanced cancers for palliative surgical care to provide symptomatic relief and prevent local recurrence.

68% of our patients received adjuvant radiotherapy to the vulva, therefore the group can seem inconsistent from this perspective. However, radiotherapy for the vulva region was recommended for patients with a clear indication (a resection margin of < 8 mm, a depth of invasion > 5 mm, a presence of LVSI, locally advanced tumours infiltrating of surrounding organs). Moreover, the incidence of local, regional or distant relapses was not effectively influenced by adjuvant radiotherapy after primary surgery in our study. This can be documented by the fact that out of 13 local vulvar recurrences, only one case did not receive adjuvant treatment. In another eight relapses (three in the groin and five in pelvic lymph nodes) adjuvant radiotherapy was performed in these anatomical sites in seven patients. Further investigations and new studies dealing with the effect of adjuvant and neoadjuvant radiotherapy are the next logical steps in the assessment of this modality of treatment.

To achieve tumour-free margins is the major prognostic factor influenced by the surgeon. Our analysis reveals the statistical significance of adequate surgical margins (≥ 8 mm) in the reduction of risk of recurrence. In the case of close resection margins, no statistically significant difference in the increased risk of early local recurrence (up to two years) was observed compared to relapse after more than two

years. A recent expert opinion states that the free-resection margin should be at least 1 cm [3]. Concurrently, however, it is stressed that it is acceptable to consider less wide margins in case the tumour lies close to midline structures and preserving their function is desired [3]. The results of studies comparing the association of the width of free-resection margins and the rate of local recurrence are inconclusive and this topic remains the most controversial point in the surgical treatment of vulvar carcinoma [26–30]. Therefore, it is necessary to focus on new histopathological, genetic and epigenetic factors. Actual sources state the increased risk of recurrence based on increased tumour aggression in association with the presence of perineural invasion or epithelial-mesenchymal transition [31, 32]. Increased risk of local recurrence is also characterized by HPV tumour negativity in conjunction with differentiated VIN, lichen sclerosus and genetic alterations such as TP53 mutations [33, 34].

CONCLUSIONS

Based on the results of our study, the major prognostic factor of local VSCC recurrence influenced by the surgeon is represented by tumour-free pathological margins ≥ 8 mm. The achievement of such margins is an important prerequisite for reducing the risk of local recurrence while respecting the current trend of less radical locoregional surgery. A perfect knowledge of the extent of the disease prior to surgery as well as the definition of new molecular prognostic parameters should be to support adequately radical trends in the current surgical treatment of vulvar cancer. The emphasis is given on adequate radicality as well as on reduction of overtreatment without worsening prognosis by simultaneously preserving the quality of life.

Acknowledgements

The work was supported by the Ministry of Health, the Czech Republic — conceptual development of a research organisation (FNBr, 65269705).

Conflict of interest statement

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- Howlader N, Noone AM, Krapcho M, et al. (eds) (2015) SEER Cancer Statistics Review, 1975–2012, National Cancer Institute. Bethesda, MD, based on November 2014 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2015. http://seer.cancer.gov/csr/1975_2012/ (30.12.2016).
- Woelber L, Kock L, Giesecking F, et al. Clinical management of primary vulvar cancer. *Eur J Cancer*. 2011; 47(15): 2315–2321, doi: [10.1016/j.ejca.2011.06.007](https://doi.org/10.1016/j.ejca.2011.06.007), indexed in Pubmed: 21733674.
- Oonk MHM, Planchamp F, Baldwin P, et al. European Society of Gynaecological Oncology Guidelines for the Management of Patients With Vulvar Cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2017; 27(4): 832–837, doi: [10.1097/IGC.0000000000000975](https://doi.org/10.1097/IGC.0000000000000975), indexed in Pubmed: 28441255.
- Sznurkowski JJ. Vulvar cancer: initial management and systematic review of literature on currently applied treatment approaches. *Eur J Cancer* (Engl). 2016; 25(4): 638–646, doi: [10.1111/ecc.12455](https://doi.org/10.1111/ecc.12455), indexed in Pubmed: 26880231.
- Aviki EM, Esselen KM, Barcia SM, et al. Does plastic surgical consultation improve the outcome of patients undergoing radical vulvectomy for squamous cell carcinoma of the vulva? *Gynecol Oncol*. 2015; 137(1): 60–65, doi: [10.1016/j.ygyno.2015.02.001](https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2015.02.001), indexed in Pubmed: 25667974.
- Gentileschi S, Servillo M, Garganese G, et al. Surgical therapy of vulvar cancer: how to choose the correct reconstruction? *J Gynecol Oncol*. 2016; 27(6): e60, doi: [10.3802/jgo.2016.27.e60](https://doi.org/10.3802/jgo.2016.27.e60), indexed in Pubmed: 27550406.
- Reade CJ, Eiriksson LR, Mackay H. Systemic therapy in squamous cell carcinoma of the vulva: current status and future directions. *Gynecol Oncol*. 2014; 132(3): 780–789, doi: [10.1016/j.ygyno.2013.11.025](https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2013.11.025), indexed in Pubmed: 24296343.
- Graham K, Burton K. „Unresectable” vulval cancers: is neoadjuvant chemotherapy the way forward? *Curr Oncol Rep*. 2013; 15(6): 573–580, doi: [10.1007/s11912-013-0349-x](https://doi.org/10.1007/s11912-013-0349-x), indexed in Pubmed: 24127185.
- Ramanah R, Lesieur B, Ballester M, et al. Trends in of late-stage squamous cell vulvar carcinomas: analysis of the surveillance, epidemiology, and end results (SEER) database. *Int J Gynecol Cancer*. 2012; 22(5): 854–859, doi: [10.1097/IGC.0b013e318249bce6](https://doi.org/10.1097/IGC.0b013e318249bce6), indexed in Pubmed: 22426405.
- Gadducci A, Ferrero A, Tana R, et al. Clinico-pathological and biological prognostic variables in squamous cell carcinoma of the vulva. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2012; 83(1): 71–83, doi: [10.1016/j.critrevonc.2011.09.003](https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2011.09.003), indexed in Pubmed: 22015047.
- Iacoponi S, Zapardiel I, Diestro MD, et al. Prognostic factors associated with local recurrence in squamous cell carcinoma of the vulva. *J Gynecol Oncol*. 2013; 24(3): 242–248, doi: [10.3802/jgo.2013.24.3.242](https://doi.org/10.3802/jgo.2013.24.3.242), indexed in Pubmed: 23875074.
- Yap J, O'Neill D, Nagenthiran S, et al. Current insights into the aetiology, pathobiology, and management of local disease recurrence in squamous cell carcinoma of the vulva. *BJOG*. 2017; 124(6): 946–954, doi: [10.1111/1471-0528.14560](https://doi.org/10.1111/1471-0528.14560), indexed in Pubmed: 28081287.
- Cormio G, Loizzi V, Carriero C, et al. Groin recurrence in carcinoma of the vulva: management and outcome. *Eur J Cancer Care (Engl)*. 2010; 19(3): 302–307, doi: [10.1111/j.1365-2354.2008.01011.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2354.2008.01011.x), indexed in Pubmed: 19832900.
- Klapdor R, Hertel H, Soergel P, et al. Groin Recurrences in Node Negative Vulvar Cancer Patients After Sole Sentinel Lymph Node Dissection. *Int J Gynecol Cancer*. 2017; 27(1): 166–170, doi: [10.1097/IGC.0000000000000860](https://doi.org/10.1097/IGC.0000000000000860), indexed in Pubmed: 27870709.
- Mahner S, Prieske K, Grimm D, et al. Systemic treatment of vulvar cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2015; 15(6): 629–637, doi: [10.1586/14737140.2015.1037837](https://doi.org/10.1586/14737140.2015.1037837), indexed in Pubmed: 25997120.
- Woelber L, Mahner S, Voelker K, et al. Clinicopathological prognostic factors and patterns of recurrence in vulvar cancer. *Anticancer Res*. 2009; 29(2): 545–552, indexed in Pubmed: 19331201.
- Deka P, Barmon D, Shribastava S, et al. Prognosis of vulval cancer with lymph node status and size of primary lesion: A survival study. *J Midlife Health*. 2014; 5(1): 10–13, doi: [10.4103/0976-7800.127784](https://doi.org/10.4103/0976-7800.127784), indexed in Pubmed: 24672200.
- Bogani G, Cromi A, Serati M, et al. Predictors and Patterns of Local, Regional, and Distant Failure in Squamous Cell Carcinoma of the Vulva. *Am J Clin Oncol*. 2017; 40(3): 235–240, doi: [10.1097/COC.0000000000001138](https://doi.org/10.1097/COC.0000000000001138), indexed in Pubmed: 25503429.
- Nooij LS, Ongkiehong PJ, van Zwet EW, et al. Groin surgery and risk of recurrence in lymph node positive patients with vulvar squamous cell carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2015; 139(3): 458–464, doi: [10.1016/j.ygyno.2015.09.081](https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2015.09.081), indexed in Pubmed: 26432039.
- Robertson NL, Hricak H, Sonoda Y, et al. The impact of FDG-PET/CT in the management of patients with vulvar and vaginal cancer. *Gynecol Oncol*. 2016; 140(3): 420–424, doi: [10.1016/j.ygyno.2016.01.011](https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2016.01.011), indexed in Pubmed: 26790773.
- Lin G, Chen CY, Liu FY, et al. Computed tomography, magnetic resonance imaging and FDG positron emission tomography in the management of vulvar malignancies. *Eur Radiol*. 2015; 25(5): 1267–1278, doi: [10.1007/s00330-014-3530-1](https://doi.org/10.1007/s00330-014-3530-1), indexed in Pubmed: 25477274.
- Nooij LS, Brand FAM, Gaarenstroom KN, et al. Risk factors and treatment for recurrent vulvar squamous cell carcinoma. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016; 106: 1–13, doi: [10.1016/j.critrevonc.2016.07.007](https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2016.07.007), indexed in Pubmed: 27637349.
- Coulter J, Gleeson N. Local and regional recurrence of vulval cancer: management dilemmas. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2003; 17(4): 663–681, indexed in Pubmed: 12965138.
- Rouzier R, Haddad B, Plantier F, et al. Local relapse in patients treated for squamous cell vulvar carcinoma: incidence and prognostic value. *Obstet Gynecol*. 2002; 100(6): 1159–1167, indexed in Pubmed: 12468158.

25. Dusek L, Muzik J, Kubasek M, et al. (eds) (2005) Epidemiology of malignant tumors in the Czech Republic, 1977-2015, Masaryk University, Brno. <http://www.svod.cz/report.php/> (20.06.2018).
26. Woelber L, Griebel LF, Eulenburg C, et al. Role of tumour-free margin distance for loco-regional control in vulvar cancer-a subset analysis of the Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie CaRE-1 multicenter study. *Eur J Cancer*. 2016; 69: 180–188, doi: [10.1016/j.ejca.2016.09.038](https://doi.org/10.1016/j.ejca.2016.09.038), indexed in Pubmed: [27837710](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27837710/).
27. Nooij LS, van der Slot MA, Dekkers OM, et al. Tumour-free margins in vulvar squamous cell carcinoma: Does distance really matter? *Eur J Cancer*. 2016; 65: 139–149, doi: [10.1016/j.ejca.2016.07.006](https://doi.org/10.1016/j.ejca.2016.07.006), indexed in Pubmed: [27497345](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27497345/).
28. Woelber L, Choschzick M, Eulenburg C, et al. Prognostic value of pathological resection margin distance in squamous cell cancer of the vulva. *Ann Surg Oncol*. 2011; 18(13): 3811–3818, doi: [10.1245/s10434-011-1778-0](https://doi.org/10.1245/s10434-011-1778-0), indexed in Pubmed: [21594705](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21594705/).
29. Viswanathan AN, Pinto AP, Schultz D, et al. Relationship of margin status and radiation dose to recurrence in post-operative vulvar carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2013; 130(3): 545–549, doi: [10.1016/j.ygyno.2013.05.036](https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2013.05.036), indexed in Pubmed: [23747330](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23747330/).
30. Baiocchi G, Mantoan H, de Brot L, et al. How important is the pathological margin distance in vulvar cancer? *Eur J Surg Oncol*. 2015; 41(12): 1653–1658, doi: [10.1016/j.ejso.2015.09.024](https://doi.org/10.1016/j.ejso.2015.09.024), indexed in Pubmed: [26507171](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26507171/).
31. Holthoff ER, Jeffus SK, Gehlot A, et al. Perineural Invasion Is an Independent Pathologic Indicator of Recurrence in Vulvar Squamous Cell Carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2015; 39(8): 1070–1074, doi: [10.1097/PAS.0000000000000422](https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000422), indexed in Pubmed: [25786085](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25786085/).
32. Holthoff ER, Spencer H, Kelly T, et al. Pathologic features of aggressive vulvar carcinoma are associated with epithelial-mesenchymal transition. *Hum Pathol*. 2016; 56: 22–30, doi: [10.1016/j.humpath.2016.05.020](https://doi.org/10.1016/j.humpath.2016.05.020), indexed in Pubmed: [27327194](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27327194/).
33. Nooij LS, Ter Haar NT, Ruano D, et al. Genomic Characterization of Vulvar (Pre)cancers Identifies Distinct Molecular Subtypes with Prognostic Significance. *Clin Cancer Res*. 2017; 23(22): 6781–6789, doi: [10.1158/1078-0432.CCR-17-1302](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-1302), indexed in Pubmed: [28899974](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28899974/).
34. Trietsch MD, Nooij LS, Gaarenstroom KN, et al. Genetic and epigenetic changes in vulvar squamous cell carcinoma and its precursor lesions: a review of the current literature. *Gynecol Oncol*. 2015; 136(1): 143–157, doi: [10.1016/j.ygyno.2014.11.002](https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2014.11.002), indexed in Pubmed: [25448458](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25448458/).

5. Specifika a komplikace radikální operační léčby malignit gynekologických pánevních orgánů

Pro gynekologickou onkologii platí jako pro medicínu všeobecně, že se neustále dynamicky rozšiřuje základna nových znalostí. Onkogynekolog musí mít rozsáhlý fond znalostí, který zahrnuje mnoho aspektů této subspecializace (detailní znalost anatomie gynekologických orgánů i celé peritoneální dutiny, znalost patofyziologie chorobných procesů, povědomí o mechanismech účinku a toxicitě systémové léčby, o užití krevních derivátů, atd.). Současně se, zejména v posledních dvou desetiletích, dramaticky zvyšují technologické možnosti a s tím související rozsah operační léčby.

Kompetence v operačním managementu gynekologických zhoubných nádorů představuje naprosto esenciální dovednost, kterou musí onkogynekolog disponovat. Je základním požadavkem na management těchto pacientek a žádný jiný specialista tuto povinnost nesplňuje. Naplnění této povinnosti je definováno zvládnutím resekcčních výkonů v oblasti pánve i horního břicha, participací na nezbytných rekonstrukčních výkonech a rozpoznáním komplikací a jejich řešením samostatně nebo v rámci nezbytné interdisciplinární spolupráce. V souvislosti s rozvojem nových operačních technologií je žádoucí rovněž co největší univerzálnost týkající se operačních přístupů. Tato v sobě zahrnuje schopnost disponovat současnými procedurálními dovednostmi jak v historicky etablované otevřené operativě, tak v dynamicky se rozvíjejícím minimálně invazivním přístupu, jehož možnosti využití se neustále rozšiřují i v souvislosti s dokonalejší peroperační a pooperační anesteziologickou a intenzivní péčí.

To jsou obecná pravidla, která je možno aplikovat na problematiku onkochirurgie ve všeobecném rámci. Kromě toho je však radikální operační léčba gynekologických pánevních malignit spojena i s určitými specifiky. Tím nejzásadnějším se z pohledu klinické praxe jeví samotná lokalizace zhoubné nemoci, která postihuje reprodukční ženské orgány. Když pomineme pouze izolovaný psychický aspekt tohoto pohledu, je nutno brát v úvahu výskyt

malignity v reprodukčním životním období, což může významným způsobem ovlivnit možnosti následného těhotenství. Této problematice je věnována část 5.1. této kapitoly. Provedení kompletního stagingového výkonu je u gynekologických malignit spojeno s poměrně rozsáhlou preparací v prostoru retroperitonea pánve a dolního břicha. Vodicím bodem pro onkogynekologa jsou přitom především magistralní tepenné a žilní kmeny v daných anatomických lokalitách. Znalost jejich průběhu a povědomí o přítomnosti základních variet a atypií cévní anatomie je nezbytnou podmínkou pro zdárný průběh této poměrně technicky vysoce náročné části operačního výkonu. Této problematice je věnována část 5.2. této kapitoly doplněná publikačním výstupem odrážejícím vlastní klinické zkušenosti autora. Poslední část 5.3. je věnována problematice operačních komplikací radikálních onkogynekologických výkonů s důrazem na adekvátní diagnostiku těchto komplikací a na nezbytnost často úzké mezioborové spolupráce s příbuznými operačními obory při řešení těchto komplikací.

5.1. Fertilitu zachovávající terapie gynekologických malignit

Výskyt zhoubných nádorů gynekologických pánevních orgánů se z hlediska věkové struktury začíná výrazněji zvyšovat po 40. roce života s maximem v perimenopauzálním a postmenopauzálním období, a proto se zachování fertility při léčbě gynekologických zhoubných nádorů může zdát pouze okrajovým problémem. Avšak gynekologické malignity jsou diagnostikovány ve všech věkových kategoriích, včetně novorozenců, dětského věku, adolescence a samozřejmě i fertilního období [2]. Právě ve fertilním období se zvláště u některých diagnóz jedná o početně ne až tak zcela nevýznamnou kohortu pacientek. S vlastní onkologickou léčbou u pacientek s nesplněnými reprodukčními plány pak interferuje problematika zachování další fertility, která je podmíněná stádiem nemoci a histopatologickými charakteristikami malignity. Může se samozřejmě jednat i o situace, kdy stádium nemoci neumožní aplikaci léčebného postupu spojeného se zachováním orgánů nezbytných pro reprodukci. V těchto případech jsou již partnerské páry odkázány pouze na možnost adopce. Na druhou stranu včasná diagnóza zhoubného nádoru reprodukčních orgánů může být spojena s úspěšnou onkologickou léčbou a s možností zachovat šanci na zplazení a porod biologicky vlastního potomka. Podstatné je zachování orgánů nezbytných pro reprodukci, tedy alespoň jednoho vaječníku nebo jeho části jako zdroje ženských zárodečných buněk a současně zachování části dělohy (tj. děložního těla s částí děložního hrdla) jako prostředí, v němž probíhá vývoj produktu koncepce.

Z hlediska početního zastoupení, pokud budeme označovat jako fertilní skupinu právě ženy do 40. roku života, je jednoznačně nejfrekventnějším gynekologickým pánevním zhoubným nádorem karcinom děložního hrdla. Dle posledních statistických údajů z roku 2016 bylo ve věkové kategorii žen do 40 let diagnostikováno celkem 154 zhoubných nádorů děložního hrdla, což představuje podíl téměř 19% na celkovém počtu diagnostikovaných cervikálních karcinomů [2]. Je nutno brát v úvahu i další gynekologické malignity, i když s podstatně nižším

procentuálním podílem na celkovém výskytu malignit příslušného gynekologického orgánu. V případě karcinomu zevních rodidel a endometria je výskyt spíše raritní s podílem 2,7%, resp. 1,3% na celkovém počtu těchto gynekologických nádorů, v případě karcinomu vaječníku je tento podíl 3,6% [2]. Z absolutního počtu zachycených nádorů jednotlivých orgánů je pak nutno selektovat pacientky s přáním zachování fertility, které splňují kritéria pro aplikaci fertilitu zachovávajícího postupu.

Fertilitu zachovávající postup musí respektovat několik základních hledisek. Z hlediska onkologického je zásadní precizní předoperační diagnostika, která rozhodne o splnění kritérií a vhodnosti pacientky pro fertilitu zachovávající operační výkon [108]. Adekvátní diagnostika a sufficientně stagingový radikální operační výkon vyžaduje soustředění péče o tyto pacientky do specializovaných onkogynekologických center [109-114]. Žádoucím výsledkem je zachování onkologické bezpečnosti, kdy riziko recidivy (onkologický výsledek) bude srovnatelné se standardním postupem uplatněným u pacientek bez přání zachování fertility. Současně musí být tyto techniky a přístupy dostatečně konzervativní, aby zachovaly v přijatelném procentu fertilitu (reprodukční výsledky) a zároveň umožnily co největšímu počtu žen donosit zdravé dítě s co nejmenším rizikem prematurity (perinatologické výsledky) [115-118]. Tuto problematiku odrážejí dva publikační výstupy autora. První analyzuje radikální fertilitu zachovávající operační výkony a následné onkologické, reprodukční a perinatologické výsledky souboru pacientek léčených v Onkogynekologickém centru FN Brno (viz **příloha 5.1.1.**). Druhý je prezentován souhrnnou prací věnovanou sice raritní, ale velice citlivé problematice ovariálních epiteliálních malignit v adolescentní populační skupině (viz **příloha 5.1.2.**).

5.1.1. Felsing M, Minář L, Weinberger V, Hudeček R. Radikální fertilitu zachovávající operační výkony u gynekologických malignit - pětiletý soubor. (2015). Česká Gynekologie, 80(5), pp. 339-344.

Radikální fertilitu zachovávající operační výkony u gynekologických malignit – pětiletý soubor

Radical fertility preserving surgery of gynaecological malignancies – five-year-old file

Felsing M., Minář L., Weinberger V., Hudeček R.

Gynekologicko-porodnická klinika LF MU a FN, Brno, přednosta prof. MUDr. P. Ventruba, DrSc., MBA

ABSTRACT

Objective: Analysis of radical fertility preserving surgery, oncogynaecological treatment including their pregnancy effort.

Design: Prospective study.

Setting: Department of Obstetrics and Gynaecology, Masaryk University and Faculty Hospital Brno.

Methods: The group of 13 patients in age fifteen to thirty-six, who underwent radical fertility preserving surgery of oncogynaecological tumors (cervix, ovarium), 9 patients with ovarian cancer and 4 patients with carcinoma of cervix.

Results: Histology showed seven times ovarian epithelial carcinoma, twice nonepithelial ovarian carcinoma, twice spinocellular cervical carcinoma, one adenosquamous and one lymphoepithelioma like carcinoma. We reported lymphocele as the most often postoperative complication by five patients with ovarian carcinoma, lymphoedema of lower limbs in one case and one of them complicated by bilateral hydronephrosis. After surgery procedures of cervical carcinoma, there was a stenosis of cervical canal with postoperative correction. In one case there was provided vaginal revision of cervix followed by embolisation of uterine arteries because of heavy bleeding

in early postoperative period. After two years follow up, there are 12 patients in remission. There were four patients with fertility plan, two with ovarian carcinoma, two with cervical carcinoma. The first group describes two pregnancies – one miscarriage and one spontaneous labour in the date of delivery. There were 4 pregnancies in two patients with cervical carcinoma. One patient has an intrapartum cesarean section because of scarring of the cervix after the operation. Next patients has two labours in due date, three labours in 34–37th week of pregnancy and one miscarriage in 23 week of pregnancy. One patient has ovarian cancer during pregnancy, so the radical fertility preserving surgery was done after delivery.

Conclusion: Methods and procedures of surgery with fertility preserving goals in our oncogynaecological centre are in concordance with actual knowledge of medicine and respect oncological safety of patients with malignancies, who currently wish for fertility preserving treatment. Presented group of patients is relatively small, but results of oncological treatment and fertility plan demonstrate rightfulness of this treatment.

KEYWORDS

radical fertility preserving surgery, simple vaginal trachelectomy, adnexectomy, lymphadenectomy

SOUHRN

Cíl studie: Analýza radikálních fertilitu zachovávajících operačních výkonů, rozbor následné onkogynekologické léčby včetně reprodukčních výsledků.

Typ studie: Prospektivní studie.

Název a sídlo pracoviště: Onkogynekologické centrum, Gynekologicko-porodnická klinika Lékařské fakulty Masarykovy Univerzity a Fakultní nemocnice Brno.

Metodika: Zhodnocení souboru 13 pacientek ve věku 15–36 let, které podstoupily radikální fertilitu zachovávající výkon pro zhoubný nádor gynekologických pánevních

orgánů (cervix, ovarium), 9 pacientek s karcinomem ovaria, 4 s karcinomem děložního hrdla.

Výsledky: U karcinomu ovaria se histologicky jednalo sedmkrát o epiteliální karcinom, ve dvou případech byl nalezen neepiteliální karcinom. U karcinomu cervixu byl dvakrát histologický nálezní invazivního spinocelulárního karcinomu, jednou adenoskvamózního a jednou lymfoepitelioma like karcinomu. Nejčastější pooperační komplikací u karcinomu ovaria byl pětkrát nálezní lymfocysty, v jednom případě komplikován oboustrannou hydronefrózou, ve dvou případech s lymfedémem dolních končetin. Po výkonech na hrdle se dvakrát objevila stenóza cervikálního kanálu. V jednom případě

byla provedena embolizace uterinních arterií pro silné pooperační krvácení. Po minimálně dvouletém follow up se nachází 12 pacientek v remisi. O graviditu se po operaci snažily čtyři pacientky, dvě s karcinomem ovaria, dvě s karcinomem děložního hrdla. V první skupině pacientek bylo dosaženo dvou těhotenství, jednoho abortu v I. trimestru, jednoho spontánního porodu záhlavím v termínu porodu. U dvou pacientek po operaci na hrdle bylo dosaženo čtyř těhotenství. Jedna pacientka rodila císařským řezem v termínu porodu pro nepostupující porod při jizvení děložního hrdla v souvislosti s trachelektomií. U druhé pacientky byla u všech porodů provedena časná cerclage pro inkompetenci děložního hrdla. Tato pacientka dvakrát spontánně porodila v 34.–37. týdnu gravidity a jednou spontánně potratila v 23. týdnu gravidity. Jedna pacientka byla diagnosti-

kována gravidní, radikální řešení se zachováním fertility bylo provedeno po porodu.

Závěr: Metody a postupy našeho onkogynekologického centra v problematice fertilitu zachovávající radikální operační léčby jsou v souladu s aktuálními doporučeními, které respektují onkologickou bezpečnost u pacientek s maligním onemocněním a současným přáním zachování fertility. Prezentovaný soubor je sice malý, nicméně výsledky prokazují jak z hlediska onkologické léčby, tak z pohledu následné snahy o graviditu oprávněnost tohoto léčebného postupu.

KLÍČOVÁ SLOVA

radikální fertilitu zachovávající operační výkony, simplexní vaginální trachelektomie, adnexektomie, lymfadenektomie

Čes. Gynek., 2015, 80, č. 5, s. 339–344

ÚVOD

Incidence karcinomu hrdla dělohy je 17,2/100 tisíc žen, karcinomu ovaria 19,3/100 tisíc žen. V absolutních číslech se jedná o 918 nových případů karcinomu hrdla děložního a 1032 případů karcinomu vaječníku ročně ve všech věkových kategoriích. Zdrojem dat je Národní onkologický registr (NOR) České republiky z roku 2012.

Gynekologické malignity se vyskytují v reprodukčním období ženy s různou frekvencí. Onkologická bezpečnost operačního výkonu se mnohdy dostává do rozporu s přáním pacientky zachovat fertilitu. Existuje však velké množství případů, kdy je při včasné diagnóze možné pomocí adekvátní léčby uchovat ženám současně šanci na zplodení a porod biologicky vlastního potomka. Problematika léčby zachovávající plodnost se stala vysoce aktuální, neboť ženy v Evropské unii rodí své první dítě v průměru v 30. roku života. S biologicky „vyšším“ věkem ovšem současně narůstá i počet gynekologických zhoubných nádorů [6]. Rovněž je markantní nárůst sterilních párů v populaci, které jsou odkázány ve snaze o úspěšnou graviditu na využití technik umělého oplodnění [17]. Na druhou stranu jsou právě tyto techniky (stimulace vaječnicků hormonálními preparáty) prokázaným rizikovým faktorem pro ovariální nádory, minimálně hraničních biologických vlastností (tzv. borderline tumory), diskutuje se však i o významném riziku pro nádory invazivní [4, 13]. Zhoubný nádor děložního hrdla je ze skupiny zhoubných nádorů s přímým vztahem k plodnosti ženy nejčastější. Raritně je diagnostikován u žen do 25 let, poměrně strmý nárůst výskytu je však možné zaznamenat u žen ve věku vyšším než 30 let. Hlavním rizikovým faktorem vzniku je virová infekce lidským papilomavirem (HPV – human

papiloma virus). Klinické projevy jsou při časných stadiích velmi často chabé. Definitivní diagnóza je stanovena na základě bioptického vyšetření.

Karcinom děložního hrdla je jediným z gynekologických zhoubných nádorů s existujícím programem primární prevence v podobě již do praxe uvedené vakcinace [20]. Karcinom ovaria je druhým ze skupiny zhoubných nádorů s přímým vztahem k plodnosti ženy. Vyskytuje se nejčastěji u postmenopauzálních žen, ale asi v 10–15 % postihuje ženy ve fertilmním věku [13]. V jednotkových případech se může ve věkové kategorii 20–39 let vyskytnout i zhoubný nádor vejcovodu, jehož rizikové faktory, diagnostika a léčba jsou identické s ovariálním karcinomem [14]. Z hlediska rizikových faktorů je stále uznávána hypotéza nepřetržitých ovulací, současně je však přijat a rozvíjen koncept primárního orruga ve vejcovodu u značné části pokročilých ovariálních karcinomů [3]. Mimo to asi 5–10 % karcinomů ovaria je geneticky podmíněných. Mezi hlavní syndromy patří tzv. hereditární syndrom karcinomu prsu a vaječníku, spojený s mutací v genech BRCA 1, 2 a tzv. syndrom Lynch II, dominantně se týkající rizika karcinomu tlustého střeva a endometria [5, 25]. Společným rysem protektivních faktorů je snížení počtu ovulačních cyklů, tedy těhotenství a kojením, farmakologicky pak hormonální antikoncepcí.

Pro léčbu zachovávající plodnost je zcela zásadní záchyt onemocnění v časném stadiu. Časná diagnostika ovariálního karcinomu je vzhledem k asymptomatickému průběhu počátku onemocnění velice obtížná a do dnešní doby nemáme k dispozici vhodnou screeningovou metodu. Základem diagnostiky je kombinace transvaginálního a abdominálního ultrazvukového vyšetření [9, 23]. Doplnkovým vyšetřením je stanovení tumor mar-

kerů, zejména CA 125 a nově HE4, respektive ROMA indexu (Risk of Ovarian Malignancy Algorithm). Pokud na základě těchto vyšetření získáme výraznější podezření na borderline tumor nebo přímo zhoubný nádor, je nutné provedení stagingových vyšetření. Zásadní je zhodnocení kontralaterálního ovaria [13].

SOUBOR A METODIKA

Jedná se o soubor 13 pacientek, které v reprodukčním období onemocněly zhoubným nádorem gynekologických orgánů. Do souboru nebyly zahrnuty pacientky s borderline tumorem ovaria a karcinomem hrdla léčeným jen prostou konizací. V 10 případech se jednalo o ženy bezdětné, v jednom případě to byla žena s jedním dítětem, ve dvou se dvěma dětmi, ale současně přáním dalšího těhotenství. Jejich věkové rozmezí bylo 15–36 let (medián 32, SD 5,94). U všech pacientek se jednalo o první záchyt onkologického onemocnění. Z hlediska přítomnosti gynekologických zhoubných nádorů měly negativní rodinnou anamnézu. U pacientek byl proveden radikální fertilitu zachovávající operační výkon při splnění indikačních kritérií.

Pacientky byly rozděleny do dvou skupin. Devět pacientek s karcinomem ovaria podstoupilo unilaterální adnexektomií, ve dvou případech byla následně provedena i druhostranná adnexektomie s kryoprezervací ovariální tkáně. Ve všech případech byl proveden kompletní stagingový výkon. Čtyři pacientky s karcinomem hrdla děložního podstoupily simplexní trachelektomií s pánevní lymfadenektomií a peroperačním vyšetřením sentinelové uzliny. U obou skupin pacientek jsme sledovali zastoupení postoperačních komplikací (lymfocysta, lymfedém, hydronefróza, stenóza cervixu, krvácení, ascites), výsledky onkologické léčby (remise, recidiva, úmrtí) a reprodukční výsledky (snahu o graviditu, dosažená těhotenství, potrat v I. a II. trimestru, předčasný porod a porod v termínu).

Vzhledem ke splnění kritérií pro plodnost zachovávající přístup byly pacientky po výkonu převedeny do dispenzární péče, která probíhala minimálně dva roky od ukončené léčby podle standardních doporučení, tj. první 2 roky v intervalu 3 měsíců, 3.–5. rok po skončení léčby v intervalu 6 měsíců. Po pěti letech od ukončení léčby byl prodloužen interval kontrol na jednou za rok. Každá kontrola zahrnovala objektivní gynekologické a ultrazvukové vyšetření. U pacientek s karcinomem ovaria byly stanoveny hladiny tumor markerů při každé návštěvě. U pacientek s karcinomem cervixu se prováděl odběr nádorových markerů v ročním intervalu. Další vyšetření (zobrazovací metody – RTG plic, CT břicha a pánve atd.) byla pro-

váděna v případě klinických potíží pacientek, při patologických hodnotách tumor markerů nebo při podezřelém ultrazvukovém nálezu. Pacientky byly seznámeny s doporučenými intervaly, po jejichž uplynutí je možné se pokusit o těhotenství, včetně možnosti využití technik asistované reprodukce. Pacientkám, které bezprostředně neměly zájem o těhotenství, byla doporučena blokáda ovulace hormonální antikoncepcí.

VÝSLEDKY

U karcinomu ovaria se histologicky jednalo sedmkrát o epiteliální karcinom – z toho šestkrát mucinózní, jednou serózní papilární karcinom, ve dvou případech byl nález neepiteliálního maligního tumoru – jednou nezralý teratom, jednou se vyskytl agresivní Yolk-sac tumor (tab. 1). U karcinomu cervixu byl dvakrát histologický nález invazivního spinocelulárního karcinomu, jednou adenoskvamózního a jednou lymphoepitelioma like karcinomu (tab. 2). Nejčastější postoperační komplikací u karcinomu ovaria byl pětkrát nález lymfocysty, v jednom případě komplikován oboustrannou hydronefrózou, ve dvou případech s lymfedémem dolních končetin a podbřišku, jednou se vyskytla trombóza horní končetiny [8, 20].

Tab. 1 Histologické typy u karcinomu ovaria

Ca ovaria – histologické typy		Počet pacientek
Epitelový	Mucinózní	6
	Serózní papilární	1
Neepitelové	Nezralý teratom	1
	Yolk-sac tumor	1

Tab. 2 Histologické typy u karcinomu děložního hrdla

Ca cervicis uteri – histologické typy		Počet pacientek
spinocelulární		2
adenoskvamózní		1
lymphoepitelioma like		1

Tab. 3 Pooperační komplikace

Diagnóza	Pooperační komplikace	Počet
C56	Lymfocysta	5
	Lymfedém DKK	1
	Hydronefróza	1
	Lymfedém podbřišku	1
	Trombóza PHK	1
C53	Stenóza cervixu	1
	Krvácení	1
	Ascites	1

Tab. 4 Těhotenské výsledky patientek po radikálním fertilitu zachovávajícím výkonu

Diagnóza	Počet pacientek se snahou o graviditu	Dosažená těhotenství	Potrat v I. trimestru	Potrat v II. trimestru	Porod předčasný	Porod v termínu
Ca ovarii	2	2	1	0	1*	1
Ca cervicis uteri	2	4	0	1	2	1
Celkem	4	6	1	1	3	2

* Porod pacientky, u které byl diagnostikován ca ovaria v 18 t.g.

Po výkonech na děložním hrdle se dvakrát objevila stenóza cervikálního kanálu s následnou operační korekcí (dilatací), jednou ascites. V jednom případě byla provedena embolizace uterinních arterií pro silné pooperační krvácení (tab. 3).

Při splnění podmínky minimálně dvouletého follow-up od primárního radikálního operačního výkonu se nachází 12 patientek v remisi. Po absolvování dvou negativních dispenzárních kontrol od výkonu se snažily o graviditu čtyři pacientky, dvě s karcinomem ovaria, dvě s karcinomem děložního hrdla. V první skupině patientek bylo dosaženo dvou těhotenství, jednoho abortu v I. trimestru, jednoho spontánního porodu záhlavím v termínu porodu. U dvou patientek po operaci na hrdle bylo dosaženo čtyř těhotenství. Jedna pacientka rodila císařským řezem v termínu porodu pro nepostupující porod při jizvení děložního hrdla v souvislosti s provedenou trachelektomií. U druhé pacientky byla u všech porodů provedena časná cerclage pro inkompetenci děložního hrdla. Tato pacientka dvakrát spontánně porodila v 34.–37. týdnu gravidity a jednou spontánně potratila v 23. týdnu gravidity (tab. 4).

DISKUSE

Problematika léčby zachovávající plodnost je vysoce aktuální záležitostí. Podle posledních údajů z roku 2012 (www.svod.cz) se vyskytlo ve věkové kategorii 15–39 let 202 nových případů zhoubného nádoru hrdla dělohy a 45 případů karcinomu ovaria. Plánování rodičovství je u této skupiny patientek nedílnou součástí terapeutického postupu. U karcinomu cervixu musí být pro realizaci léčby zachovávající plodnost splněny základní podmínky. První z nich je dána velikostí nádoru do 20 mm v jeho největším rozměru, druhou podmínkou je nepřítomnost neuroendokrinního histologického typu nádoru a další [19].

Před vlastním operačním výkonem je nutné provedení stagingových vyšetření, v jejichž čele stojí expertní ultrazvukové vyšetření (ev. MRI podle zvyklostí pracoviště), abychom posoudili exaktně volumetrii tumoru a vyloučili metastatické po-

stižení regionálních lymfatických uzlin a přítomnost vzdálených metastáz [9, 10, 22]. Další podmínkou pro fertilitu zachovný operační výkon je minimální délka intaktního hrdla po operaci 5–10 mm při intaktních resekčních okra-

jích. Rozlišujeme dva základní operační přístupy. Konizace je dostatečný výkon, pokud je invazivní růst nádoru vertikálně maximálně 3 mm, horizontálně maximálně 7 mm, je vyloučena lymfangioinvasze (stadium IA1) a nejsou postiženy okraje operačního preparátu [12, 13]. Ve stadiu IA1 s lymfangioinvasí/angioinvasí, IA2 a ve stadiu IB1 nádorů do 20 mm v největším rozměru s maximální infiltrací do poloviny stromatu je možno se přiklonit k radikální fertilitu zachovávající operaci.

V současné době se nejčastěji kombinuje laparoskopická pánevní lymfadenektomie, vč. biopsie sentinelové uzliny se simplexní trachelektomií provedenou vaginálně nebo kombinovanou laparoskopicko-vaginální technikou [16, 18]. Podmínkou těchto operací je peroperační identifikace a histopatologické zpracování (frozen section – FS) sentinelových mizních uzlin [2, 3]. Při pozitivitě je fertilitu zachovávající výkon kontraindikován. Pacientka musí být v tomto směru před operací informována a je možné při metastatickém postižení sentinelové uzliny, již v průběhu jedné anestezie, provést operační výkon adekvátní radikality, tj. systematickou pánevní a paraaortální lymfadenektomii a radikální hysterektomii v rozsahu typu C2 nebo je výkon ukončen a následuje kurativní konkomitantní chemoradioterapie [1, 7, 18]. Identický postup je doporučen v případě pooperačního zjištění infiltrace lymfatických uzlin z definitivní histologie nebo v případech, kdy nádor dosahuje hranice trachelektomie (konizace). Po fertilitu zachovávajícím výkonu se doporučuje snaha o těhotenství s odstupem tří, resp. lépe šesti měsíců po absolvování dvou konsektivních gynekologických kontrol, které vyloučí návrat nemoci [13].

U patientek s invazivním karcinomem ovaria může být provedena fertilitu zachovávající chirurgická léčba při splnění určitých histopatologických kritérií. Konzervativní přístup je možný, pokud se jedná o nádor neepitelový ze zárodečných buněk nebo ze zárodečného stromatu. Konzervativní operaci je u epitelálních zhoubných nádorů možné nabídnout patientkám ve stadiu T1a; G1(2); histotyp endometroidní, serózní a mucinózní (event. T1b – zachování dělohy) – za

podmínky provedení kompletního chirurgického stagingu. U endometroidního histotypu je nutná histologická verifikace endometria (hysteroskopie s biopsií). V případě, že se jedná o nepříznivý grade (tj. špatně diferencovaný nádor) nebo iatrogeně o stadium IC, lze v rámci klinických studií a na přání pacientky (pozitivní reverz) zvolit rovněž konzervativní postup, měla by však následovat adjuvantní chemoterapie. Cílem operace je zachovat fertilitu (optimálně jeden vaječník a dělohu, případně pouze dělohu) za podmínky jinak kompletního chirurgického stagingu. Resekce ani biopsie makroskopicky a ultrazvukově nesuspекtního druhostranného ovaria při konzervativní operaci není indikována [24]. Pokud jsou podmínky splněny, standardní radikální, ale současně plodnost zachovávající výkon zahrnuje laváž, biopsii standardních lokalit a všech suspektních lézí, unilaterální adnexektomii, omentektomii, apendektomii a aortopelvickou lymfadenektomii. Vyskytne-li se oboustranné postižení vaječníků, je nutné provést oboustrannou adnexektomii. I zde je možné na základě přání pacientky zachovat dělohu, žena již sice nemůže zplodit biologicky vlastního potomka, ale v rámci programu asistované reprodukce přichází v úvahu využití darovaných oocytů [11].

Ve skupině borderline ovariálních tumorů je operační výkon méně radikální. Nezahrnuje lymfadenektomii a při oboustranném postižení vaječníků je možné v případě, že není makroskopicky postižen celý vaječník, provést pouze jeho resekci. Všechny alternativy možných nálezů v průběhu operace musí být s pacientkou detailně diskutovány před operačním výkonem a stvrzeny jejím podpisem v příslušném informovaném souhlasu. Při zjištění nesplnění podmínek pro plodnost zachovávající operaci v průběhu vlastního výkonu je pak při předoperačním souhlasu pacientky jednoznačně indikován radikální operační výkon, tj. i s odstraněním dělohy [24]. Pokud jsou kritéria pro fertilitu zachovávající výkon splněna, vč. následného potvrzení definitivní histologií, doporučuje se snaha o těhotenství s odstupem tří, resp. lépe šesti měsíců po absolvování dvou negativních gynekologických kontrol, které vyloučí návrat nemoci [13]. Po dokončení reprodukčních plánů je doporučeno odstranění ponechaných adnex. V případě, že žena graviditu bezprostředně neplánuje, je vhodná hormonální kontracepce a důsledná dispensární péče.

Screeningová metoda u ovariálního karcinomu k dispozici není, pouze v případech familiárního výskytu zhoubných nádorů je jistě indikována genová mutační analýza, zejména na přítomnost mutací v genech BRCA 1, 2. V případě mutace v BRCA 1 genu se udává celoživotní riziko karcinomu

ovaria 40–60 %, u mutace v BRCA 2 genu přibližně 20 %, přičemž míra rizika se výrazněji zvyšuje po dosažení 40 let věku [25].

Postupy našeho pracoviště se řídí aktuálními guidelines pro léčbu gynekologických nádorů v reprodukčním věku.

Nejčastější postoperační komplikací u karcinomu ovaria byl pětkrát nález lymfocysty, v jednom případě komplikován oboustrannou hydronefrózou, ve dvou případech s lymfedémem dolních končetin [8, 21]. Po výkonech na hrdle se dvakrát objevila stenóza cervikálního kanálu s následnou operační korekcí (dilatací). V jednom případě byla provedena embolizace uterinních arterií pro silné pooperační krvácení [15]. Výsledky onkogynekologické léčby jsou srovnatelné s ostatními pracovišti nejen v České republice, ale i v zahraničí. V našem souboru se aktuálně nachází 12 pacientek v remisi, pacientka s Yolk-sac tumorem zemřela na rychlou progresi a generalizaci onemocnění do 1 roku od operace. Tato pacientka odmítla primárně indikovaný radikální onkogynekologický výkon bez zachování fertility i přes důsledné předoperační poučení o vysoce pravděpodobném nesplnění podmínek fertilitu zachovávajícího výkonu. U jedné pacientky byl diagnostikován tumor ovaria v 18. týdnu gravidity. Byla nejprve provedena jednostranná adnexektomie laparoskopickou cestou a po spontánním porodu byl radikální fertilitu zachovávající výkon dokončen s negativním histologickým nálezem v dodatečně odstraněných tkáních.

Obecně je z hlediska způsobu vedení porodu u této skupiny pacientek jednoznačný trend vedení porodu vaginální cestou, pokud neexistují jiné důvody, které by tomuto přístupu bránily. U pacientek po operačním řešení zhoubných nálezů na děložním hrdle se častěji setkáváme s porody předčasnými, tj. před ukončeným 37. týdnem těhotenství, z důvodu zkrácení děložního hrdla operačním výkonem, čímž dojde k oslabení jeho uzávěrového mechanismu. Na druhou stranu v případě výraznějšího projizvení reziduálního hrdla může být v průběhu porodu insuficientní dilatace porodnické branky nutností ukončení běžícího porodu císařským řezem [12, 17]. V našem souboru rodily pacientky převážně vaginálně, pouze jeden porod byl ukončen císařským řezem právě pro jizvení reziduálního hrdla.

Základem dobrých léčebných i následně těhotenských výsledků je nezbytná centralizace pacientek, které jsou adeptkami tohoto specifického léčebného přístupu na pracoviště, která disponují adekvátním personálním i technickým vybavením pro provádění těchto léčebných výkonů. Tuto funkci naplňují komplexní onkologická centra, která jsou konstituována na krajské úrovni a jejichž součástí jsou rovněž centra vysoce specializované péče v onkogynekologii, která

tuto problematiku řeší. Na druhou stranu pro úspěch této snahy zdravotnických pracovníků je naprosto nezbytná spolupráce dané ženské subpopulace, která je podmíněna disciplinovaností a pravidelným absolvováním preventivních prohlídek, účastí na existujících screeningových programech.

ZÁVĚR

Metody a postupy našeho onkogynekologického centra v problematice fertilitu zachovávající radikální operační léčby jsou v souladu s aktuálními doporučeními, která respektují onkologickou bezpečnost u pacientek s maligním onemocněním se současným přáním zachování fertility. Prezentovaný soubor je sice malý, nicméně výsledky prokazují jak z hlediska onkologické léčby, tak z pohledu následné snahy o graviditu oprávněnost tohoto postupu.

LITERATURA

1. **Bats, AS., Buénerd, A., Querleu, D., et al.** Diagnostic value of intraoperative examination of sentinel lymph node in early cervical cancer: a prospective, multicenter study. *Gynecol Oncol*, 2011, 123(2), p. 230–235. doi: 10.1016/j.ygyno.2011.08.010. Epub 2011 Sep 3.
2. **Cibula, D., Abu-Rustum, NR., Dusek, L., et al.** Prognostic significance of low volume sentinel lymph node disease in early-stage cervical cancer. *Gynecol Oncol*, 2012, 124(3), p. 496–501. doi: 10.1016/j.ygyno.2011.11.037. Epub 2011 Nov 25.
3. **Cibula, D., Oonk, MH., Abu-Rustum, NR.** Sentinel lymph node biopsy in the management of gynecologic cancer. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2015, 27(1), p. 66–72. doi: 10.1097/GCO.0133.
4. **Cibula, D., Petruželka, L., et al.** *Onkogynekologie*. Praha: Grada Publishing, 2009, 614 s. ISBN 978-80-247-2665-6.
5. **Cibula, D., Zikán, M., Dusek, L., Majek, O.** Oral contraceptives and risk of ovarian and breast cancers in BRCA mutation carriers: a meta-analysis. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2011, 11(8), p. 1197–1207. doi: 10.1586/era.11.38.
6. **Dusek, L., Muzik, J., Maluskova, D., et al.** Cancer incidence and mortality in the Czech Republic. *Klin Onkol*, 2014, 27(6), p. 406–423.
7. **Eiriksson, L., Covens, A.** Sentinel lymph node mapping in cervical cancer: the future? *BJOG*, 2012, 119, p. 129–133. doi: 10.1111/j.1471-0528.2011.03134.x.
8. **Felsingarová, Z., Minář, L., Weinberger, V.** Incidence a terapie lymphocyst po provedené systematické pánevní a paraaortální lymfadenektomii. *Čes Gynek*, 2014, 79, 5, s. 388–392.
9. **Fischerova, D., Cibula, D.** Ultrasound in gynecological cancer: is it time for re-evaluation of its uses? *Curr Oncol Rep*, 2015, 17(6), p. 28. doi: 10.1007/s11912-015-0449-x.
10. **Fischerova, D.** Ultrasound scanning of the pelvis and abdomen for staging of gynecological tumors: a review. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 2011, 38(3), p. 246–266.
11. **Fruscio, R., Corso, S., Ceppi, L., et al.** Conservative management of early-stage epithelial ovarian cancer: results of a large retrospective series. *Ann Oncol*, 2013, 24(1), p. 138–144. doi: 10.1093/annonc/mds241. Epub 2012 Sep 3.
12. **Halaska, M., Robova, H., Pluta, M., Rob, L.** The role of trachelectomy in cervical cancer. *Ecancermedicalscience*, 2015, 9, p. 506. doi: 10.3332/ecancer.2015.506. eCollection 2015.
13. **Minář, L.** Fertilitu zachovávající terapie gynekologických malignit. *Čes Gynek*, 2009, 74, 6 s. 420–427.
14. **Minář, L., Ivanová, Z., Jandáková, E.** Ovariální epiteliální nádory v adolescentním věku. *Čes Gynek*, 2014, 79, 2 s. 98–102.
15. **Minář, L., Weinberger, V., Kysela P.** Komplikace radikálních onkogynekologických operací. *Čes Gynek*, 2010, 75(4), p. 346–352.
16. **Rob, L., Robova, H., Chmel, R., et al.** Surgical options in early cervical cancer. *Int J Hyperthermia*, 2012, 28(6), p. 489–500. doi: 10.3109/02656736.2012.675116. Epub 2012 Jun 12.
17. **Rob, L., Skapa, P., Robova, H.** Fertility-sparing surgery in patients with cervical cancer. *Lancet Oncol*, 2011, 12(2), p. 192–200. doi: 10.1016/S1470-2045(10)70084-X. Epub 2010 Jul 8.
18. **Robová H., Rob, L., Pluta, M., et al.** Guideline gynekologických zhoubných nádorů: Standard-komplexní léčba časných stadií zhoubných nádorů děložního hrdla. *Onkogynekologie* [online]. 15.6.2013 [cit. 2014-02-28]. Dostupné z: http://www.onkogynekologie.com/wp-content/uploads/2011/03/Guideline-C53_2013.pdf.
19. **Sehnal, B., Driák, D., Kmonicková, E., et al.** Současná klasifikace zhoubných nádorů v onkogynekologii – část II. *Čes Gynek*, 2011, 76(5), p. 360–366.
20. **Sláma, J.** Pooperační sledování po konzervativním ošetření prekanceróz děložního hrdla. *Čes Gynek*, 2011, 76(5), p. 339–342.
21. **Weinberger, V., Cibula, D., Zikán, M.** Lymphocele: prevalence and management in gynecological malignancies. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2014, 14(3), p. 307–317. doi: 10.1586/14737140.2014.866043. Epub 2014 Feb 3.
22. **Weinberger, V., Dvořák, M., Haaková, L., et al.** Ultrazvukový staging karcinomu děložního hrdla – Návrh standardního postupu. *Čes Gynek*, 2014, 79, 6, s. 447–455.
23. **Weinberger, V., Minář, L.** Diagnostics of malign ovarian tumors by ultrasound and CA 125 – our experience. *Intern J Gynecol Cancer*, 2013, s. 494–1759. ISSN 1048–891X.
24. **Zikán, M., Cibula, D., Fischerová, D., et al.** Guideline gynekologických zhoubných nádorů: Standard – komplexní léčba ovariálních epiteliálních zhoubných nádorů. *Onkogynekologie* [online]. 15.6.2013 [cit. 2014-02-28]. Dostupné z: http://www.onkogynekologie.com/wp-content/uploads/2011/03/Guideline_C56_Epit_2013.pdf
25. **Zikán, M.** Doporučení genetické testace u pacientek s gynekologickým zhoubným nádorem. *Čes Gynek*, 2015, 80(2), p. 97–103.

MUDr. Michal Felsingr

Viniční 220

615 00 Brno

e-mail: felmi@seznam.cz

5.1.2. Minář L, Felsingarová Z, Jandáková E. Ovariální epiteliální malignity v adolescentním věku. (2014). Česká Gynekologie, 79(2), pp. 98-102.

Ovariální epiteliální malignity v adolescentním věku

Ovarian epithelial malignant tumors in adolescence

Minář L.¹, Ivanová Z.¹, Jandáková E.²

¹Gynekologicko-porodnická klinika LF MU a FN, Brno, přednosta prof. MUDr. P. Ventruba, DrSc., MBA

²Ústav patologie LF MU a FN Brno, vedoucí doc. MUDr. J. Feit, CSc.

ABSTRACT

Objective: Ovarian epithelial malignant tumors in adolescence.

Design: Literature review with case reports.

Setting: Department of Gynaecology and Obstetrics, Faculty of Medicine at Masaryk's University and Fakultní Hospital Brno.

Methods: Literature review on ovarian epithelial malignant tumors in adolescence, their epidemiology, diagnosis and therapy with illustrative case reports.

Conclusion: The ovarian epithelial malignant tumors in the adolescence represent rare group of these diseases according to the data from the National Cancer Registry. However, it is a very sensitive area of oncogynecology, that requires highly personalized approach and the cooperation with patient's family. The ovarian epithelial malignant tumors in the age group of 15–19 years show

some differences from these diseases of adults and older women. The differences concern the extent of the disease at the time of the diagnosis, the histopathological characteristics of the tumors and the proportion surgical therapy and chemotherapy. The diagnostic algorithm requires the cooperation with the colleagues from pediatric gynecology and oncology. Due to the occurrence of localized stages and good tumor differentiation prevails the monotherapy presented the surgical treatment, especially in the form of the radical fertility-preserving procedures. The care of the patients should be concentrated into the oncogynecological centres.

KEYWORDS

ovarian epithelial malignant tumors, adolescence, fertility sparing surgical treatment, chemotherapy

SOUHRN

Cíl studie: Ovariální epiteliální malignity v adolescentním věku.

Typ studie: Literární přehled s kazuistikami.

Název a sídlo pracoviště: Gynekologicko-porodnická klinika LF MU a FN Brno.

Metodika: Literární přehled o ovariálních epiteliálních malignitách v adolescentním věku, jejich epidemiologii, diagnostice a terapii s ilustrativními kazuistikami.

Závěr: Podle údajů Národního onkologického registru představují onemocnění adolescentek ovariální epiteliální malignitou skupinu sice zcela raritní, ale současně jde o velmi citlivou oblast onkogynekologie, kde je nezbytný vysoce individualizovaný přístup a spolupráce s rodinou pacientky. Epiteliální ovariální malignity ve věkové ka-

tegorii 15–19 let vykazují ve srovnání s onemocněními dospělých a starších žen určité odlišnosti, které se týkají rozsahu onemocnění v době diagnózy, histopatologických vlastností nádorů a použitých léčebných modalit. Diagnostický algoritmus vyžaduje spolupráci dětského gynekologa a onkologa. Vzhledem k výskytu lokalizovaných stadií a dobré diferenciaci tumorů převažuje monoterapie prezentovaná chirurgickou léčbou, a to zejména v podobě radikálních fertilitu zachovávajících výkonů. Péče o pacientky by měla být soustředěna do onkogynekologických center.

KLÍČOVÁ SLOVA

ovariální epiteliální malignity, adolescence, fertilitu zachovávající chirurgická léčba, chemoterapie

Čes. Gynek., 2014, 79, č. 2, s. xx–xx

ÚVOD

V Evropě připadá na věkovou kategorii adolescentů (tj. 15–19 let) méně než 0,3 % ze všech invazivních nádorů [2]. V České republice je ročně

diagnostikováno kolem 60 tisíc nových maligních onemocnění, incidence zhoubných nádorů ve věkové kategorii adolescentů se pohybuje kolem 15/100 000/rok, v absolutních číslech je tedy

ročně diagnostikováno v této věkové kategorii 90–100 nových nádorů. Ovariální malignity představují z hlediska záhytu v naší ženské populaci druhou nejčastější skupinu gynekologických malignit, podle Národního onkologického registru (NOR) byla v roce 2010 incidence 20,6/100 000/rok, což odpovídá absolutnímu počtu 1107 nových onemocnění.

Adolescentky se podílejí na této incidenci zcela minoritně, podle údajů NOR se incidence zhoubných nádorů vaječníků v horizontu posledních 30 let pohybuje u adolescentek v rozmezí 0–2,46, v absolutních číslech je to 0–8 nových případů ročně, celkem bylo v časovém období 1977–2010 v této věkové kategorii diagnostikováno 149 ovariálních malignit.

Poslední dostupné údaje z roku 2010 udávají incidenci 0,7, což jsou pouze 2 nové případy [14]. Ve spektru ovariálních maligních nálezů v adolescentním věku na rozdíl od dospělých a starších žen převládají nádory germinální, zatímco epiteliální malignity a borderline tumory představují podle statistik pouze 16–20 %. Parametry mortality jsou u adolescentek nižší, což je podmíněno určitými specifiky, která se týkají časného záhytu a histopatologických charakteristik ovariálních nádorů [3]. S tím úzce souvisí i možnosti terapie, poměrně často jde pouze o modalitu chirurgickou s možností radikálního fertilitu zachovávajícího onkogynekologického výkonu.

ETIOLOGIE A KLINICKÉ PŘÍZNAKY

Rizikové faktory ovariálních epiteliálních malignit mají vztah k reprodukčním funkcím a jsou to faktory hormonální (rizika představují dlouhé menoaktivní období, absence gravidity), faktory zevního prostředí (obezita) a faktory hereditární. Vzhledem k popisované věkové skupině se předpokládá účast zejména faktorů hereditárních (mutace tumor supresorových genů BRCA 1 a 2, Lynch syndrom typ II). Z hlediska klinických příznaků je skupina adolescentů rovněž odlišná od dospělých a starších pacientek, u kterých je 75 % případů diagnostikováno v pokročilých stádiích III a IV s přítomností ascitu.

U adolescentů je nemoc v době diagnózy většinou lokalizovaná s přítomností velkoobjemového nádoru. Většina pacientek je asymptomatických a jde o náhodný nález se zvětšením objemu břicha s podezřením spíše na graviditu. Zvětšení objemu břicha je způsobeno nikoliv ascitem, ale velkoobjemovým tumorem. Mohou být samozřejmě přítomny i nespecifické bolesti břicha a příznaky z útlaku pánevních struktur (obstipace, dysurie) [1].

DIAGNOSTIKA

Diagnostický algoritmus adolescentních pacientek má podobný základ ve spektru obligatorních (ev. fakultativních) stagingových vyšetření jako u dospělé populace, vyznačuje se však určitými specifiky. Jedním z nich je nutnost spolupráce s dětským gynekologem u virginálních pacientek k zajištění objektivního vyšetření. Expertní onkogynekologický ultrazvuk, který je základní zobrazovací vyšetřovací metodou, je realizován transabdominálním, ev. transrektálním přístupem [6]. Vzhledem k rozložení histopatologických typů je vhodné při předoperační diagnostice doplnit vyšetření epiteliálních tumor markerů (CA 125, CEA) o markery germinálních tumorů (tedy AFP, beta-hCG, inhibin, LDH). Histopatologicky se dominantně vyskytují jak u malignit, tak u borderline tumorů varianta serózní a mucinózní, ostatní typy jsou extrémně vzácné se závažnější prognózou. Odlišnost od populace dospělých nemocných se týká i stupně diferenciacie tumorů, která má prognostický význam a u časných stadií je důležitá v rozhodování o adjuvantní chemoterapii. Celkem 84 % nemocných adolescentek je postiženo dobře diferencovanými nádory [5, 7]. O biologických charakteristikách epitelových malignit adolescentek je informací málo, týkají se zejména mutací BRCA 1 a 2, které by měly být u nemocných vyšetřeny. Cytogenetickým vyšetřením se zjišťují komplexní změny karyotypu, což je nárůst genetického materiálu na chromozomu 11p, 12, 18, 19p, popřípadě ztráta chromozomu 17 nebo X [10].

TERAPIE

Základní léčebnou modalitou je terapie chirurgická. Kvalitní předoperační diagnostika umožňuje adekvátně informovat pacientku a její rodinu o možných variantách řešení patologického nálezu, přičemž chirurgická léčba by měla být jednoznačně soustředěna do onkogynekologických center. Podle statistik NOR je v této věkové skupině zachyceno v časných stádiích nemoci (tj. ve stadiu I a II) v průměru 65–75 % nových onemocnění [14]. Z toho rezultuje opodstatněná snaha o provádění fertilitu zachovávající radikální chirurgie, samozřejmě při striktním naplnění podmínek pro tento typ výkonu. Principem fertilitu zachovávajícího výkonu je ponechání dělohy a jednoho ovaria, v případě oboustranného adnexálního postižení je ponechána pouze děloha, ale tato žena je již odkázána na techniky asistované reprodukce s využitím programu dárcovství oocytů. Konzervativní operace je možná při kompletním chirurgickém stagingu u stadia T1a (ev. T1b s ponecháním pouze dělohy) u dobře a středně diferencovaných tumorů, pokud jde o histologický typ serózní, mucinózní

nebo endometroidní. U endometroidního histotypu je nutné doplnit hysteroskopii s biopsií a histologickou verifikací endometria. Pacientka musí být současně poučena o vyšším riziku recidivy. Fertilitu zachovávající radikální výkon zahrnuje odběr peritoneální tekutiny nebo laváž ve standardních lokalitách, ev. brániční stěry, cílené biopsie z peritonea přední exkavace, pánevních stěn a parakolických prostor, současně i biopsii ze všech suspektních ložisek nebo adhezí v oblasti pánve a dutiny břišní, omentektomii, apendektomii, pánevní a paraaortální lymfadenektomii a jednostrannou nebo oboustrannou adnexektomii podle stadia onemocnění [13]. Častěji se u mladších žen setkáváme s borderline ovariálními tumory, které mají lepší prognózu a nižší riziko recidiv. Ve srovnání s invazivním karcinomem jsou příznivější podmínky pro zachování ovaria nebo jeho části, racionální je však provádět resekční výkon pouze při bilaterálním postižení nebo při jednostranné adnexektomii v anamnéze vzhledem k rizikům recidivy [8, 9]. Rozsah fertilitu zachovávajícího výkonu je menší než u invazivního karcinomu, kromě adekvátního výkonu na adnexech se provádí odběr peritoneální tekutiny nebo laváž ve standardních lokalitách, random biopsie, současně i exstirpace všech suspektních ložisek nebo adhezí a zvětšených lymfatických uzlin v retroperitoneu a infrakolická omentektomie, naopak systematická lymfadenektomie nepatří do standardu výkonu [4]. V případě nesplnění podmínek pro konzervativní výkon u invazivního karcinomu je indikován kompletní chirurgický staging, včetně odstranění dělohy a obou adnex, podle stadia nemoci je pak ev. indikována adjuvantní chemoterapie, která je realizována zpravidla na pracovišti dětské onkologie. V případě, že je optimální cytoredukce s makroskopicky nulovým reziduem nepravděpodobná, je možné využít rovněž koncept biopsické verifikace s neoadjuvantní chemoterapií a odloženou primární cytoreduktivní operací [12].

VLASTNÍ POZOROVÁNÍ

Na našem pracovišti jsme v období od ledna 2012 do června 2013 zaznamenali 2 případy epitelálních malignit v adolescentním věku, v jednom případě již šlo o invazivní karcinom, ve druhém o recidivující borderline tumor.

V první kazuistice je prezentována 15letá pacientka, která byla na naše pracoviště referována pro nález velkoobjemového tumoru pánve a dutiny břišní, pravděpodobně ovariálního orruga. Její rodinná i osobní anamnéza, včetně onkologické, byla negativní. Menstruovat začala ve 12 letech, menstruační cyklus v době diagnózy byl pravidelný. Šlo se o virginální pacientku, bez medikace

hormonální antikoncepcí, s přiměřeně vyvinutými sekundárními pohlavními znaky. Z pohledu aktuálního objektivního nálezu udávala asi 14 dnů zvětšování obvodu břicha a tlakové bolesti břicha. Objektivní nález byl charakterizován vyklenutím břišní stěny nad niveau, při objektivním vyšetření byl nález verifikován jako polotuhá tumorózní rezistence vystupující dva prsty nad pupek, nález při vaginoskopii byl negativní. Při abdominálním ultrazvukovém vyšetření byla patrna drobná děloha utlačená nehomogenní rezistencí s převažující solidní složkou, výrazně vaskularizovaná, rozměrů 20 × 11 × 10 cm, bez přítomnosti ascitu. Nádorové markery byly negativní, pouze se zjistila hraniční hodnota CA 19-9 a mírná elevace CA 72-4, další součásti obligatorního stagingu byly negativní. Pacientka byla indikována k probatorní laparotomii. Z peroperační histologie byl referován dobře diferencovaný mucinózní cystadenokarcinom (obr. 1). Po revizi pánve a dutiny břišní, kde nebyly shledány makroskopické projevy diseminace nádoru, byl proveden radikální fertilitu zachovávající výkon s ponecháním dělohy a makroskopicky intaktních kontralaterálních adnex. Všechny další odebrané tkáně byly podle definitivní histologie již bez nálezu nádorových změn (včetně cytologie), bylo získáno celkem 43 lymfatických uzlin (27 pánevních a 16 paraaortálních). Definitivní histologie potvrdila původní příznivý histotyp i grading nádoru a pacientka byla převedena do dispenzární péče.

Druhé kazuistické sdělení se týká pacientky s recidivujícím borderline tumorem. První záchyt patologie v oblasti adnex byl ve věku 14 let, kdy byla pacientka přijata na pracoviště dětské chirurgie s příznaky náhlé příhody břišní a přítomností cystické rezistence v dutině břišní. Jednalo se o obézní, virginální pacientku s negativní rodinnou i osobní anamnézou, včetně onkologické. Menstruovat začala ve 13 letech, menstruační cyklus v době diagnózy byl nepravidelný, bez hormonální medikace. Operační vstup byl veden chirurgem laparotomicky s následným přivoláním gynekologa. Byl zjištěn hladkostěnný tumor 20 × 17 × 15 cm, který vycházel z peritoneálního listu nad levými adnexy, jinak nález v peritoneální dutině negativní, včetně intaktního jednostranného ovaria. Definitivní histologický nález byl odečten jako serózní borderline tumor. Po čtyřech měsících při kontrole byla detekována rezistence 7 × 5 × 4 cm v oblasti pravých adnex, anechogenní s endofytickou, nevaskularizovanou prominencí průměru 2 cm do lumina, stagingová vyšetření byla negativní, včetně tumor markerů. Byla provedena laparoskopická exstirpace cysty se zachováním pouzdra a extrakcí preparátu v endobagu. Peroperační kryovýšetření nález uzavřelo

jako serózní cystadenofibrom, definitivní histologie nález korigovala na seromucinózní borderline tumor s negativní laváží. Po konzultaci s rodinou pacientky byl zvolen observační postup, při další kontrole po čtyřech měsících byl negativní nález v oblasti adnex bilaterálně. Při další kontrole po osmi měsících od druhého výkonu se však objevila recidiva cystické rezistence v oblasti pravých adnex, velikosti 4 × 4 × 3,5 cm s nevascularizovaným endofytem průměru 1,5 cm v lumen cysty a drobnocysticky změněným povrchem v rozsahu přibližně jedné čtvrtiny při negativním dalším stagingu, včetně tumor markerů. V této fázi již bylo indikováno vzhledem k anamnéze pacientky provedení pravostranné adnexektomie, peroperační i definitivní histologií byl vysloven identický závěr, tj. recidiva seromucinózního borderline tumoru (obr. 2). Další odebrané tkáně, tj. infrakolické omentum a biopsie z peritonea i laváž byly bez nálezu maligních buněk. Nyní je pacientka v dispenzární péči s dvěma negativními konsektivními kontrolami.

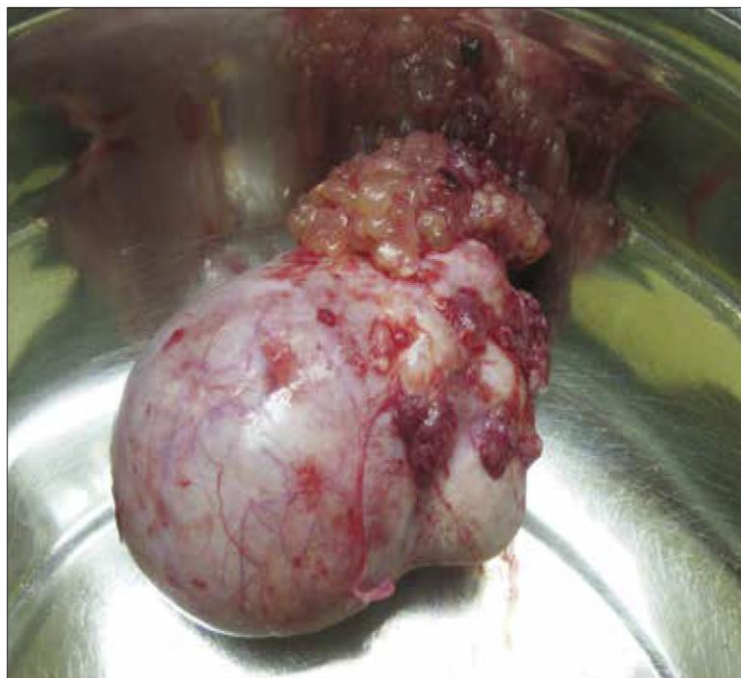
ZÁVĚR

Ovariální epiteliální malignity adolescentek představují raritní skupinu gynekologických malignit. Většinou jsou lokalizované v době diagnózy, mají nižší stupeň malignity a méně agresivní chování než u dospělých a starších žen. Záchyt v iniciálních stádiích umožňuje statisticky častěji provedení radikálního, ale fertilitu zachovávajícího onkogynekologického operačního výkonu. Ve shodě s časnější diagnózou je i lepší prognóza, pětileté přežívání se týká až 85 % pacientek [11]. Pravidelná dispenzární péče je indikována, ale výsledky nezlepšuje, což je ve shodě s obecným názorem na problematiku

dispenzární péče onkogynekologických pacientek. Z lidského pohledu představuje tato skupina diagnóz vysoce citlivou oblast onkogynekologie, která z odborného hlediska vyžaduje vysoce individualizovaný přístup, spolupráci s rodinou pacientky a ve vlastním diagnosticko-terapeutickém algoritmu zapojení nejen onkogynekologa,



Obr. 1 Mucinózní cystadenokarcinom



Obr. 2 Seromucinózní borderline tumor

ale i dalších subspecializací, především dětského gynekologa a dětského onkologa.

LITERATURA

1. **Bajčiová, V.** Epitelové nádory ovaria. In Bajčiová, V., Tomášek, J., Štěrba, J. Nádory adolescentů a mladých dospělých. Praha: Grada Publishing, 2011, s. 197–203.
2. **Bleyer, WA., Viny, A., et al.** Cancer in 15- to 29-year olds by primary site. *Oncologists*, 2006(11), p. 590.
3. **Brown, J., Olson, T., et al.** Malignancies of the ovary. Chapter 13. In Bleyer, WA., Barr, RD. *Cancer in adolescents and young adults*. Berlin: Springer-Verlag, 2007, p. 219–221.
4. **Cíbula, D., Petruželka, L., et al.** *Onkogynekologie*. Praha: Grada Publishing, 2009, s. 503–508.
5. **Dundr, P.** Histopatologická klasifikace nádorů ženského genitálu. *Mod Gynek Porod*, 2007, 16(3), s. 509–510.
6. **Fischerová, D.** Ultrazvukové zobrazení benigních a maligních ovariálních nádorů. *Mod Gynek Porod*, 2007, 16(4), s. 752–754.
7. **Motlík, K., Živný, J.** *Patologie v ženském lékařství*. Praha: Grada, 2001, s. 550.
8. **Poncelet, C., Fauvet, R., Boccara, J., et al.** Recurrence after cystectomy for borderline ovarian tumors: result of a French multi-center study. *Ann Surg Oncol*, 2006, 13, p. 565–571.
9. **Silva, EG., Gerhenson, DM., Malpica, A., et al.** The recurrence and the overall survival rates of ovarian serous borderline neoplasms with noninvasive implants in the time dependent. *Am J Surg Pathol*, 2006, 30(11), p. 1367–1370.
10. **Stepanian, G., Cohn, DE.** Gynecologic malignancies in adolescents. *Adolesc Med Clin*, 2004, 15(3), p. 549–558.
11. **Tsai, JY., Saigo, PE., Brown, C., et al.** Diagnosis, pathology, staging, treatment and outcome of epithelial ovarian neoplasia in patients age < 21 years. *Cancer*, 2001, 91(11), p. 2065–2070.
12. **You, W., Dainty, LA., et al.** Gynecologic malignancies in women aged less than 25 years. *Obstet Gynecol*, 2005, 105(6), p. 1405–1407.
13. <http://www.onkogynekologie.com> - Guideline C56 Epit 2013.
14. <http://www.svod.cz>

MUDr. Luboš Minář

Gynekologicko-porodnická klinika
LF MU a FN Brno
Pracoviště reprodukční medicíny
Obilní trh 11
602 00 Brno
e-mail: lubosminar@seznam.cz

5.2. Specifika operační erudice onkogynekologa (problematika systematické retroperitoneální lymfadenektomie)

Operační léčba je základní modalitou léčby gynekologických malignit a má kromě terapeutického významu rovněž význam stagingový. Chirurgický staging je přes rozvoj moderních zobrazovacích metod nejpřesnější nástroj klasifikace nemoci. Neoddiskutovatelně se to týká především časných stádií nemoci, kde umožní odhalit subklinické metastatické postižení, které stojí mimo rozlišovací schopnost současných zobrazovacích metod [51]. Nedílnou součástí chirurgického stagingu je zjištění stavu regionálních lymfatických uzlin, který je u většiny zhoubných nádorů nejdůležitějším prognostickým faktorem a významným kritériem pro indikaci adjuvantní terapie [119-121]. Diskutován je rovněž terapeutický význam systematického odstranění metastaticky postižených mízních uzlin [122-125].

I přes dynamický rozvoj konceptu biopsie sentinelové uzliny v gynekologické onkologii, který je jednoznačně racionální a spojený s profitem snižování morbidity operovaných pacientek, zůstává systematická lymfadenektomie důležitou součástí radikálních onkogynekologických operací. Tukově-lymfatická tkáň, která je odstraňována v rámci systematické lymfadenektomie, je anatomicky lokalizována podél velkých magistrálních cév. Kromě karcinomu vulvy a dolní části pochvy, které jsou drénovány do lymfatických uzlin v inguinofemorální oblasti, je svodnou lymfatickou oblastí pro ostatní nádory oblast pánve, resp. pánve a dolního břicha až do výše průběhu renálních žil.

V průběhu retroperitoneální preparace jsou cévní struktury základním vedoucím bodem pro operátora. Detailní znalost cévní anatomie a povědomí o možných anomáliích je základním předpokladem úspěšné operace. Anomálie embryonálního vývoje prezentující se v podobě duplicit, akcesorních větví nebo atypického průběhu se týkají obou typů cévních struktur. Onkogynekologický operátor musí být v této problematice orientován, neboť dle literárních údajů jsou cévní anomálie poměrně časté. Frekventněji se týkají systému žilního, kde prevalence

varíruje v rozmezí 0,1-43%, zatímco u systému arteriálního je to 9-31% [126]. Rizikovější anatomická lokalizace z hlediska závažnosti hemoragických komplikací je oblast suprapelvicá, zejména infrarenální. V žilním systému se nejčastěji anomálně projevuje utváření levostranné ledvinné žíly s variantou její duplikace a retroartálního průběhu, v systému arteriálním zase variety týkající se renální arterie s přítomností pólových cév [127-129]. Nedostatečná erudice a cévní poranění v průběhu výkonu mohou rezultovat až v život ohrožující krvácení, mohou být rovněž příčinou komplikací pooperačních (trombembolické příhody v souvislosti s nástěnným cévním poraněním, částečný infarkt ledviny při podvazu příslušné pólové ledvinné tepny atd.). Nezbytností je tedy nejen adekvátní operační technika podpořená dokonalou znalostí anatomie a respektování specifík otevřeného a miniinvazivního přístupu při retroperitoneální chirurgii, ale součástí základní erudice onkogynekologa by měla být rovněž schopnost dočasného nebo trvalého řešení vzniklých krvácivých komplikací v závislosti na jejich povaze, rozsahu i možném forezním dopadu. Klinické zkušenosti autora s touto problematikou jsou prezentovány v **příloze 5.2.1.**

5.2.1. Minář L, Weinberger V, Felsinger M. Cévní anatomie aortopelvickeho retroperitonea a její abnormality v souvislosti s radikální onkogynekologickou operativou-vlastní zkušenosti. (2017). Česká Gynekologie, 82(2), pp. 100-107.

Cévní anatomie aortopelvického retroperitonea a její abnormality v souvislosti s radikální onkogynekologickou operativou – vlastní zkušenosti

Vascular anatomy and abnormalities of retroperitoneal pelvic and paraaortic area in relation to the radical oncogynecological surgery – individual experiences

Minář L., Weinberger V., Felsing M.

Onkogynekologické centrum, Gynekologicko-porodnická klinika LF MU a FN, Brno, přednosta prof. MUDr. P. Ventruba, DrSc., MBA

ABSTRACT

Objective: The overview of vascular anatomy and abnormalities of retroperitoneal pelvic and paraaortic area in relation to the radical oncogynecological surgery.

Design: Retrospektive study.

Setting: Gynecologic Oncology Center, Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Masaryk University and University Hospital Brno.

Material and methods: The overview of visualized vascular anatomy of retroperitoneal pelvic, infrarenal suprapelvic and subhepatic area in relation to the radical oncogynecological surgery. Presentation of

physiological vascular anatomy. Summary of the most common abnormalities and potential complications in terms of vascular injury. Basic management of these complications from the viewpoint of oncogynecologist.

Conclusion: The perfect knowledge of vascular anatomy and its possible abnormalities has represented an absolute necessity for uncomplicated course and sufficient extent of radical surgery.

KEYWORDS

pelvic and paraaortic retroperitoneal area, vascular anatomy, vascular abnormality, vascular injury

SOUHRN

Cíl studie: Přehled cévní anatomie a jejich abnormalit v oblasti aortopelvického retroperitonea v souvislosti s radikální onkogynekologickou operativou.

Typ studie: Původní práce – retrospektivní studie.

Pracoviště: Onkogynekologické centrum FN Brno, Gynekologicko-porodnická klinika LF MU a FN Brno.

Materiál a metodika: Přehled vizualizovatelné cévní anatomie retroperitonea v oblasti pelvické, infrarenální suprapelvicke a subhepatální v rámci radikální onkogynekologické operativy. Prezentace fyziologické cévní

anatomie, přehled nejčastějších abnormit a potenciálních komplikací ve smyslu poranění cévních struktur a základní nástin jejich řešení z pohledu onkogynekologického operátora.

Závěr: Dokonalá znalost anatomie včetně cévních struktur a jejich možných abnormit je naprostou nezbytností pro nekomplikovaný průběh a sufficientní rozsah radikální onkogynekologické operace.

KLÍČOVÁ SLOVA

aortopelvické retroperitoneum, cévní anatomie, cévní abnormita, poranění cévy

MUDr. Luboš Minář, PhD., e-mail: Minar.Lubos@fnbrno.cz
Čes. Gynek., 2017, 82, č. 2, s. xxx-xxx

ÚVOD

Systematická aortopelvicá lymfadenektomie představuje stále nedílnou součást radikální onkogynekologické operativy i přes jednoznačnou snahu směřující k zavedení konceptu lymfatického mapování s biopsií sentinelové uzliny u řady gynekologických malignit. Stav regionálních lymfatických uzlin představuje zásadní prognostický faktor a rozhodující kritérium pro aplikaci adjuvantní terapie [23]. Systematická lymfadenektomie je prováděna v indikovaných případech v rámci kompletního chirurgického stagingu, předmětem diskusí je rovněž její terapeutický význam [28]. Systematická aortopelvicá lymfadenektomie je určena pro epitelální malignity ovaria, vejcovodu, primárně peritoneální karcinom, high risk typy karcinomu endometria, karcinosarkomy a high grade sarkomy děložního těla [1, 9]. Může být provedena (v těchto případech smysluplně vždy s využitím miniinvasivního přístupu) rovněž u primárně inoperabilních karcinomů děložního hrdla v předléčebném stagingu lymfatických uzlin. Izolovaná paraaortální lymfadenektomie je indikována v některých případech germinálních ovariálních malignit (např. dysgerminom) [19]. U karcinomu děložního hrdla je možné doplnit paraaortální výkon jako jednu z možností dalšího léčebného postupu při pozitivitě pánevních uzlin [21], pelvicá oblast je svodnou lymfatickou oblastí rovněž pro karcinomy proximální pochvy.

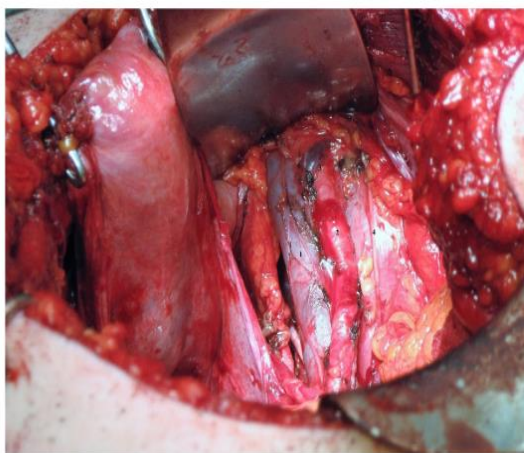
Systematická aortopelvicá disekce tukově-lymfatické tkáně je výkon standardně prováděný onkogynekologickými operátory na úrovni regionálních onkogynekologických center. Rutinní provedení výkonu vyžaduje určitou learning curve podloženou dokonalou znalostí anatomických struktur inkriminované oblasti. Vždy je nutno počítat s nejrůznějšími úskalími, která se mohou v průběhu výkonu vyskytnout. Mezi ně patří i různé variety a abnormality uspořádání magistrálních cévních svazků a jejich větví [10], které přitom představují jeden ze základních orientačních bodů při vlastním provedení výkonu.

Kromě provedení systematické aortopelvicé lymfadenektomie by měla k základní erudici onkogynekologického operátora patřit rovněž schopnost orientace v oblasti horního břicha, která je nezbytná pro adekvátní rozsah operačních výkonů u karcinomů vycházejících zejména z děložních adnex nebo peritonea. I zde jsou oblasti patřící sice historicky do erudice břišních chirurgů, nicméně znalost jejich existence a anatomie je faktorem, který může výraznou měrou přispívat k dosažení kýženého cíle, tedy makroskopicky nulového rezidua na konci operace [13].

VLASTNÍ POZOROVÁNÍ

Pelvicá oblast

Při pánevní lymfadenektomii je při systematickém výkonu odstraňována tukově-lymfatická tkáň podél vasa iliaca communis, vasa iliaca externa, vasa iliaca interna, z obturatorní fossy a z oblasti presakrální. Distální hranici disekce představuje oblast přechodu externích ilických cév do tříselného kanálu, konkrétně úroveň přemostující žíly, tj. vena circumflexa ilium profunda, kterou doprovází stejnojmenná arterie (obr. 1). V oblasti obturatorní fossy je tukově lymfatická tkáň oddělena od stydké kosti, zde je zpravidla při disekci patrná varikózní větev, která dále běží po horním raménku stydké kosti, tzv. corona mortis Hesselbachii. Alespoň malá žíla se na tomto místě vyskytuje téměř konstantně. Přichází z canalis obturatorius, podle anatomické nomenklatury se jedná o vena obturatoria accessoria. Tepna se zde nachází asi ve 25 % případů jako spojka mezi arteria iliaca externa (resp. pubickou větví arteria epigastrica profunda) a pubickou větví arteria obturatoria [7]. Kaudálně se tkáň odstraňuje z oblasti kolem obturatorního nervově cévního svazku a směrem proximálním od interní ilického cévního svazku. Na vytvoření mediální hranice v obturatorní fosse se podílí kmen umbilikální arterie odstupující z arteria iliaca interna.

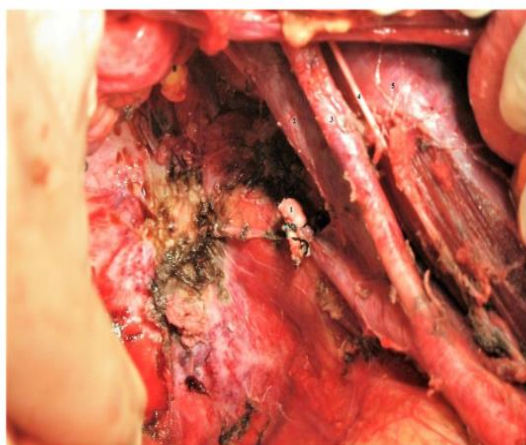


Obr. 1 Distální hranice pánevní lymfadenektomie ve vztahu k externím ilickým cévám vpravo (všechny obrázky z archivu autora)

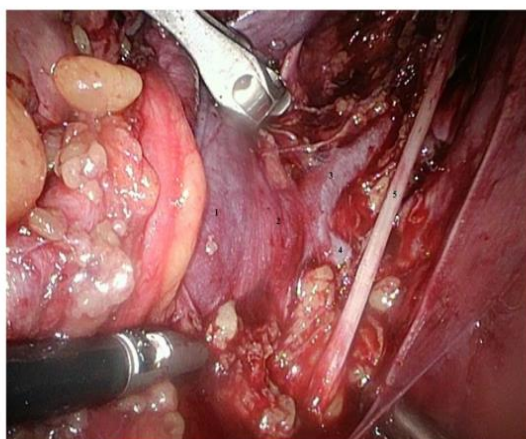
1 - v. iliaca externa, 2 - a. iliaca externa, 3 - v. circumflexa ilium profunda, 4 - n. genitofemoralis

Při preparaci tkáně je riziko poranění variabilních žilních anastomóz v oblasti obturatorní fossy [14], které lze zpravidla vyřešit kombinací komprese horkou rouškou a koagulace, ev. založením ligatury, alternativou je užití lokálně působících hemostatických prostředků s obsahem fibrinogenu a trombinu [25]. Závažnější je poranění kmene vnitřní ilické žíly, které je nutno zpravidla řešit opichem, někdy i úplnou resekci žíly [20]. Resekce

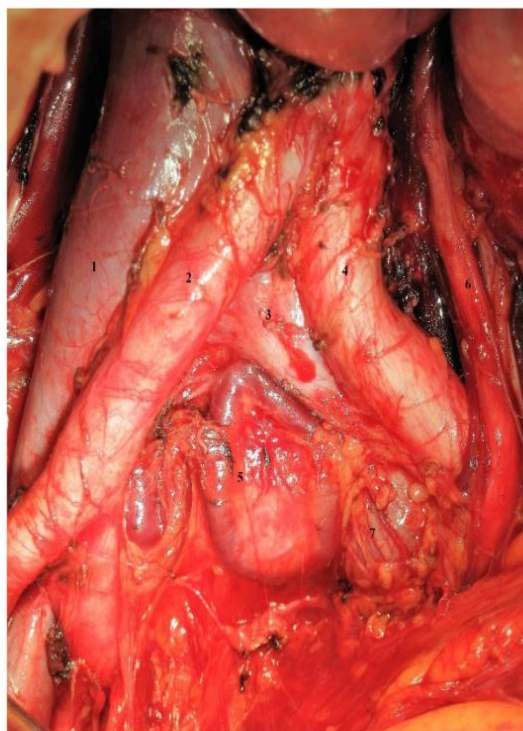
vnitřní ilické tepny (obr. 2) je v onkogynekologii vyhrazena pro případy jinak peroperačně neřešitelného arteriálního krvácení z větvení tohoto cévního kmene [20], je prováděna rovněž při laterálně extendované radikální hysterektomii typu D [6]. Při odsunutí externího a společného ilického cévního svazku mediálně odstraňujeme tkáň kolem gluteálních žil, kde je při preparaci nutno postupovat s adekvátní obezřetností, neboť při jejich poranění je tato oblast anatomicky velmi špatně přístupná (obr. 3). Proximální hranici pánevní lymfadenektomie představuje oblast aortální bifurkace vznikající spojením společných ilických artérií. Distálně od bifurkace se nachází oblast presakrální. Při preparaci této oblasti může dojít k drobnějším lézím přední stěny společných ilických žil řešitelných zpravidla kompresí horkou rouškou nebo cíleným opichem, centrálně po periostu probíhá venózní pletěň vena sacralis mediana, která může být varikózně změněna (obr.



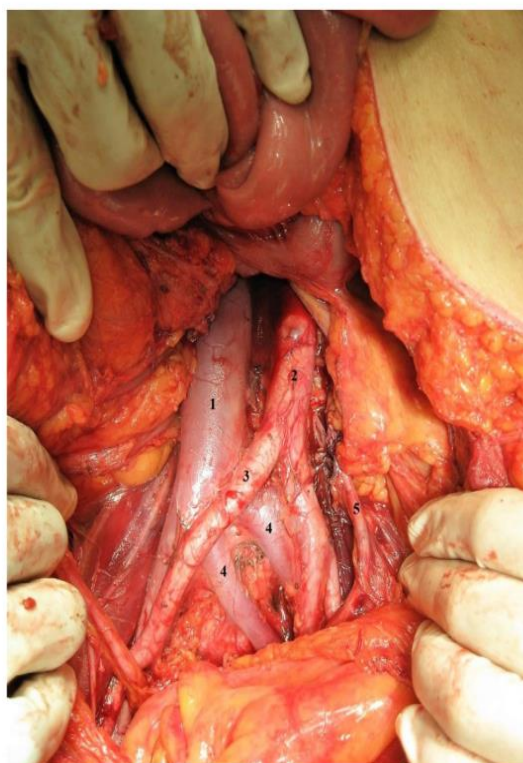
Obr. 2 Oblast resekce arterie iliaca interna vpravo
1 – resekovaný pahýl a. iliaca interna, 2 – v. iliaca externa, 3 – a. iliaca externa, 4 – n. genitofemoralis, 5. – m. psoas major



Obr. 3 Oblast bifurkace vena iliaca communis vpravo (laparoskopický pohled)
1 – bifurkace v. iliaca communis, 2 – odstup kmene v. iliaca interna, 3 – v. obturatoria, 4 – v. glutea superior, 5 – n. obturatorius



Obr. 4 Presakrální oblast
1 – v. iliaca communis dx., 2 – a. iliaca communis dx., 3 – v. iliaca communis sin., 4 – a. iliaca communis sin., 5 – v. sacralis mediana, 6 – ureter sin., 7 – lymphonodus



Obr. 5 Duplicita vena iliaca communis vlevo
1 – v. cava inferior, 2 – aorta, 3 – a. iliaca communis dx., 4 – duplexní v. iliaca communis sin., 5 – ureter sin.

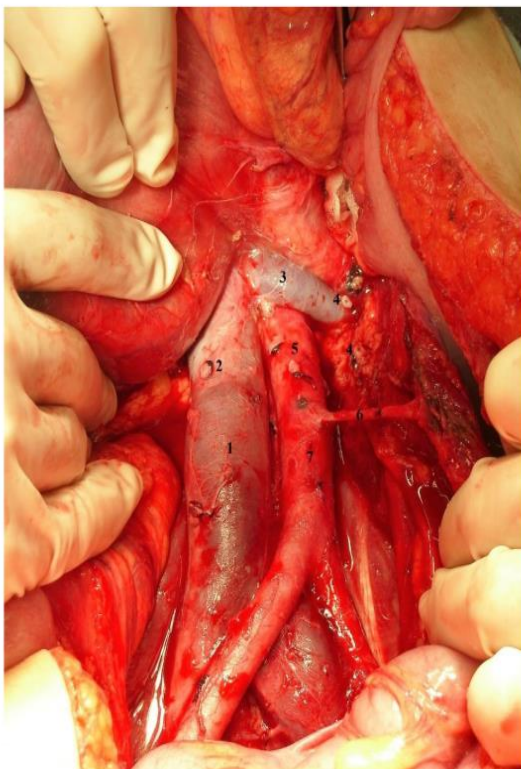
4). Abnormality v utváření magistrálních ilických svazků se týkají dominantně společných ilických žil [17], z naší klinické praxe uvádíme příklad duplikatury levostranné vena iliaca communis (obr. 5).

Suprapelvicíká oblast

Oblast suprapelvicíké lymfadenektomie je ohraničena distálně bifurkací aorty a proximálně průběhem levostranné renální žíly. Tukově lymfatická tkáň by měla být disekována z oblasti preaortální, paraaortální a retroaortální, z identických lokalit kolem dolní duté žíly a z oblasti interaortokavální. Typická anatomie této oblasti v žilním řečišti je dána pravostranným průběhem vena cava inferior. Tato žíla má díky složitému embryonálnímu vývoji četné variety vyskytující se v asi 1,5–4,4% případů [17, 26]. Při lymfadenektomii této oblasti se tedy podstatně častěji vyskytuje možnost poranění infrarenálního úseku dolní duté žíly. Mezi velké žilní anomálie týkající se suprapelvicíké oblasti patří levostranná vena cava inferior [2, 12, 15] zpravidla ve spojení se situs viscerum inversus nebo duplikace dolní duté žíly, kdy žíla vede vpravo i vlevo od páteře [4, 24]. Odstupuje v tomto případě od spojení vena iliaca interna dextra s vena iliaca communis sinistra [3]. Její průměr může být prakticky stejný jako průměr fyziologicky vpravo uložené dolní duté žíly. V literatuře popisovanou anomálií je rovněž perzistence tzv. vena cavalis, která spojuje vena iliaca communis dextra a vena renalis dextra [11].

Další anomálie se týkají větví ústících do dolní duté žíly, zejména se jedná o anomální utváření a průběh ledvinných cév, zatímco ovariální cévy zpravidla zachovávají typickou anatomickou morfologii [7, 27]. Pravá ovariální žíla zpravidla ústí do dolní duté žíly přibližně šest až sedm centimetrů proximálně od jejího kořene a zpravidla jeden centimetr distálně od pravé renální žíly, vzácněji může také ústít přímo do pravé renální žíly. Levá ovariální žíla obvykle sleduje průběh levého ureteru a vlevo od aorty ústí do stejnostranné renální žíly. Obdobný průběh mají arteriální ovariální kmeny, pravý odstupuje z přední stěny aorty přibližně pět až šest cm nad bifurkací aorty, levý zpravidla z levé renální arterie (obr. 6). Při lymfadenektomii přerušujeme vždy pravostranný cévní svazek, který je možno celý disekovat v rámci ponechaného rezidua infundibulopelvicíkého vazů po jeho přerušení při adnexektomii.

Rizikovou lokalitou z hlediska poranění je oblast kořene dolní duté žíly a úsek přibližně dva až tři cm proximálně s konstatně se vyskytujícími perforátory, tzv. fellow veins. Ty drénují tukově lymfatickou tkáň adheující k dolní

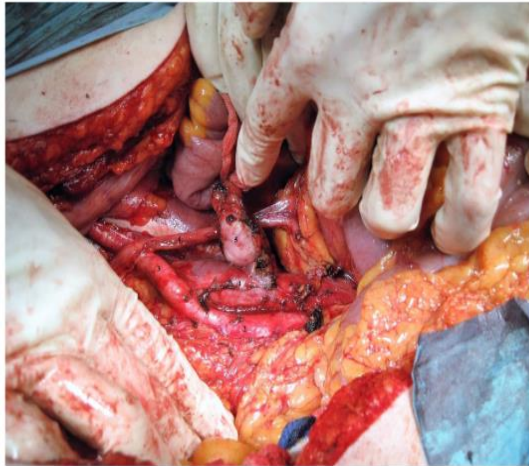


Obr. 6 Fyziologie infrarenální suprapelvicíké oblasti

1 – v. cava inferior, 2 – ústí v. ovarica dx., 3 – v. renalis sin., 4 – pahýly v. ovarica sin., 5 – odstup a. ovarica dx., 6 – a. mesenterica inferior, 7 – aorta

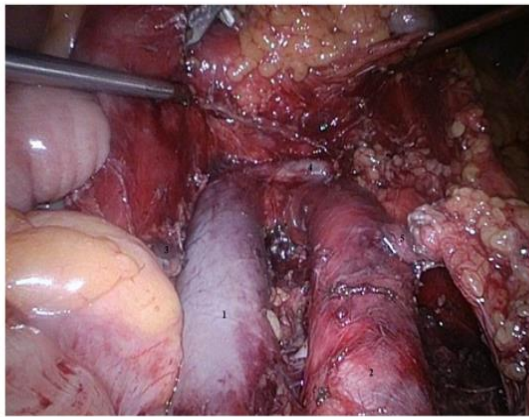
duté žíle. V literárních zdrojích je možno najít práce popisující distribuci a strukturu těchto drobných žil ústících do přední stěny dolní duté žíly. Průměrný počet udávaných žil je 3,33 s rozdělením do tří úrovní, přičemž v úrovni I bylo nalezeno 20 % žil a v úrovních II a III bylo nalezeno 40 % drobných žil. Z hlediska morfologie je popisováno neobvyklé uspořádání cévní stěny dolní duté žíly, do které vstupují drobné žíly preformovaným rukávovitým kanálem a v níž jsou ukotveny v blízkosti jejího lumen. Tento poznatek je klíčovým mechanismem objasňujícím snadné vytržení těchto žil během operačních výkonů [26]. Ošetření těchto lézí zpravidla nečiní výraznější potíže, bodovou lézí lze často vyřešit pouhou kompresí horkou rouškou, v případě větší léze je nutný cílený opich, alternativou je přiložení hemostatického preparátu [25]. Zvýšené riziko traumatu žilní stěny je přítomno rovněž v případě metastatické lymfadenopatie doprovázené patologickou neovaskularizací a pevnou adhezí paketu na cévní stěnu (obr. 7).

Ze zadní stěny aorty a dolní duté žíly vycházejí tři až čtyři páry lumbálních cév, proto disekce v retroprostoru obou magistrálních kmenů musí být prováděna s náležitou opatrností při znalosti této skutečnosti, stejně tak exstirpace hlubokých interartokaválních uzlin [5]. Probíhající lumbální



Obr. 7 Inframesenterická oblast s extirpovanou bulky metastázou

1 - v. cava inferior, 2 - aorta, 3 - a. iliaca communis dx., 4 - ureter dx., 5 - bulky uzlinová metastáza

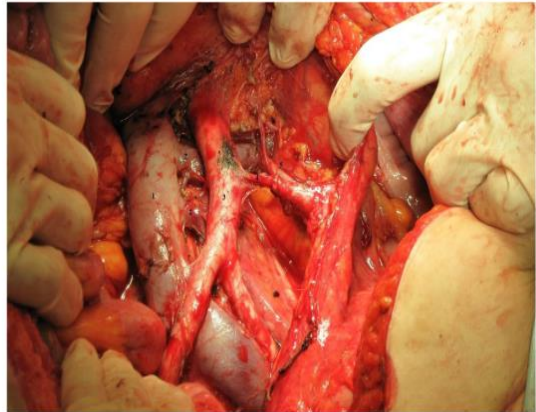


Obr. 8 Fyziologie infrarenální suprapelvickej oblasti (laparoskopický pohled)

1 - v. cava inferior, 2 - aorta, 3 - v. ovarica dx., 4 - v. renalis sin., 5 - a. mesenterica inferior

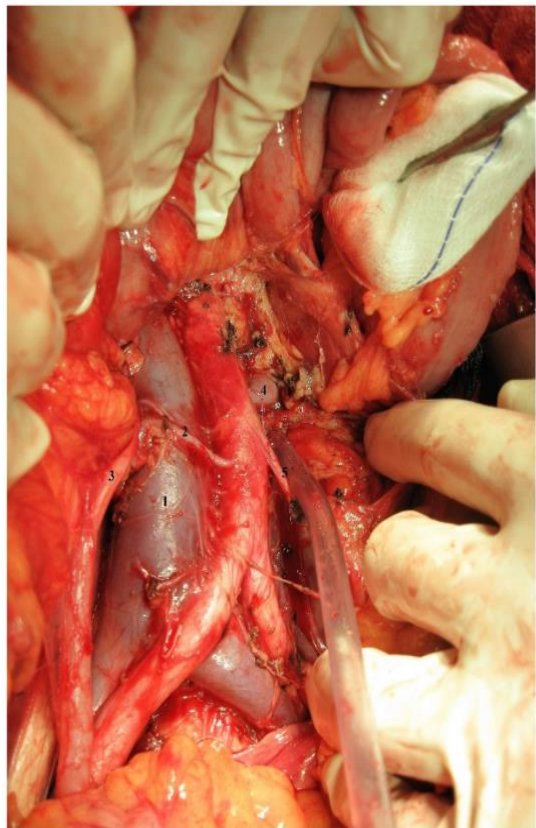
cévy je možno preventivně koagulovat a přerušit, čímž snižujeme riziko disrupce cévní stěny na jiném místě při tahu za disekovanou tkáň. V případě poranění zadní cévní stěny je léze velmi obtížně dostupná, je nutné odsunutí a částečné přetočení cévní stěny za podmínky dostatečné mobilizace dolní duté žíly, v případě aorty se pro adekvátní naložení stehu neobejdeme bez aplikace cévních svorek nad místo poranění a pod něj při její současné dostatečné mobilizaci. Alternativou může být v případě poranění žilní stěny aplikace hemostatických preparátů obsahujících komponenty fibrinogenu a trombinu [25].

Při preparaci v oblasti preaortální je nutno věnovat pozornost odstupu arteria mesenterica inferior. Tento kmen odstupuje z přední stěny aorty tři až čtyři centimetry nad aortální bifurkací (obr. 8). Navazuje krevním zásobením na horní mezenterickou tepnu, přičemž anastomózou s arteria colica dextra vytváří tzv. anastomosis magna



Obr. 9 Duplicita levostranné vena renalis s retroaortálním soutokem

1 - v. cava inferior, 2 - v. renalis sin. duplex, 3 - aorta, 4 - a. mesenterica inferior, 5 - v. ovarica sin.



Obr. 10 Akcesorní pravá pólová arteria renalis při současném retroaortálním průběhu levostranné vena renalis

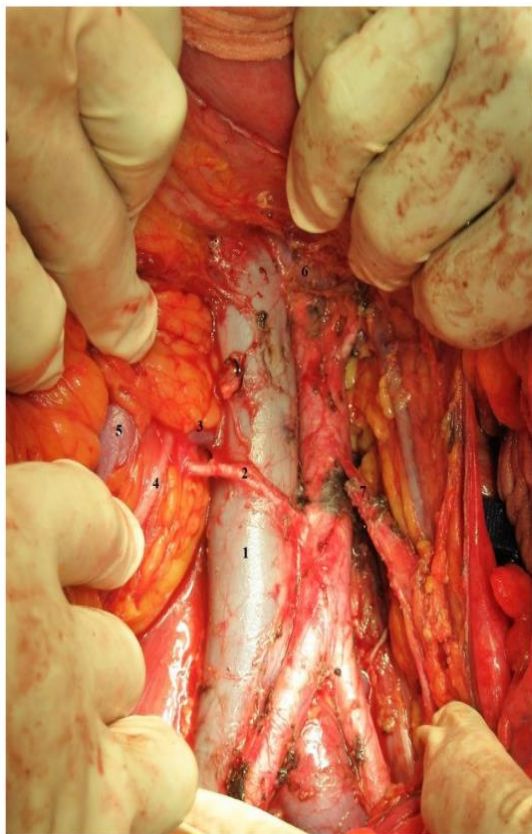
1 - v. cava inferior, 2 - a. renalis accessoria dx., 3 - ureter dx., 4 - v. renalis sin., 5 - a. mesenterica inferior

Haleri. Tepna přivádí krev prostřednictvím dalšího větvení pro zbytek colon transversum, pro colon descendens, sigma a jako arteria rectalis superior pro rektum, přičemž zde anastomózuje s párovou arteria rectalis media odstupující z arteria iliaca interna [7]. To umožňuje částečnou (ne však zcela dostačující) kompenzaci v případě obstrukce některé z předcházejících tepenných větví. V případě iatrogenního přerušeni odstupu

dolní mezenterické arterie je vždy nutno zvážit reimplantaci tepny cévním chirurgem.

Hlavní úskalí s rizikem poranění žilních kmenů suprapelvicicky se týká anomálního utváření odstupu renálních žil, zejména žíly levostranné [14, 16]. Typická anatomie je představována pre-aortálním průběhem levé renální žíly, která bývá v průměru dvojnásobné délky ve srovnání s pravou renální větví. Kaudálně žílu doplňuje tepenný kmen. Poměrně častou varietou je však retroaortální průběh levé renální žíly, na nějž je nutno při preparaci kraniální hranice suprapelvicické lymfadenektomie vždy myslet [22]. Retroaortální průběh může být doplněn i současnou žilní duplicitou (obr. 9), v tepenném systému se na úrovni dolního pólu ledviny objevuje odstup akcesorních renálních tepen, které mohou být při preparaci rovněž poraněny, zejména vpravo vzhledem k prekaválnímu průběhu (obr. 10). Poranění může rezultovat v ischemii části ledviny [8, 18].

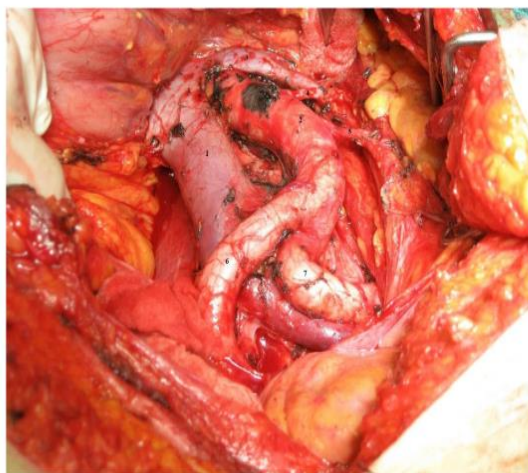
Dalším komplikujícím faktorem vzhledem k možnosti poranění renálních cév je přítomnost ptózy ledvin, kdy odstup cév z aorty a dolní duté žíly může být lokalizován až pod úroveň dolní mezenterické arterie (obr. 11). Z tohoto důvodu je nutná znalost popisu zobrazovacích metod předoperačně,



Obr. 11 Anatomie suprapelvicické oblasti při ptóze pravé ledviny
1 - v. cava inferior, 2 - a. renalis dx., 3 - v. renalis dx., 4 - ureter dx., 5 - ren dx., 6 - v. renalis sin., 7 - a. mesenterica inferior

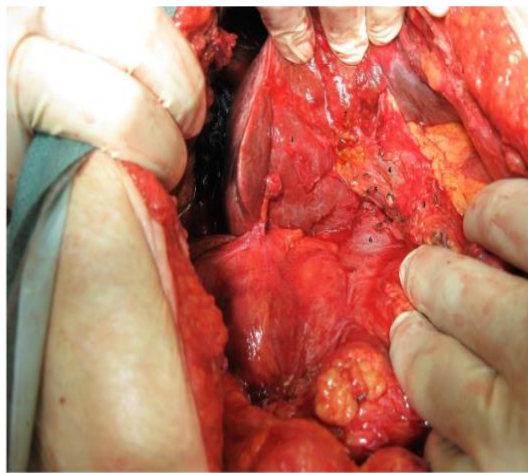
při laparotomickém operačním přístupu pak ještě ev. doplněná palpační kontrolou uložení ledvin před zahájením suprapelvicické lymfadenektomie.

Poranění magistralních tepen je méně časté. Komplikujícím faktorem kromě anomálií typu akcesorních ledvinných tepen však může být např. ateroskleróza objevující se u pacientek vyššího věku. Ta může být někdy příčinou poměrně výrazné deviace tepny od jejího klasického průběhu, rovněž je při manipulaci s cévou zvýšené riziko uvolnění sklerotických plátů (obr. 12).



Obr. 12 Deviace průběhu magistralních tepen v souvislosti s aterosklerózou

1 - v. cava inferior, 2 - aorta, 3 - v. renalis sin., 4 - a. renalis sin., 5 - a. mesenterica inferior, 6 - a. iliaca communis dx., 7 - a. iliaca communis sin.



Obr. 13 Anatomie subhepatálního retroperitonea

1 - hepar, 2 - lůžko po cholecystektomii, 3 - lig. hepatoduodenale, 4 - ductus choledochus, 5 - v. portae, 6 - v. cava inferior

Subhepatální oblast

Při radikální onkogynekologické operativě disseminovaného karcinomu ovaria, vejcovodu nebo primárně peritoneálního karcinomu je základním cílem dosažení makroskopicky nulového rezidua, přičemž nádorová diseminace může být přítomna

kdekoliv na peritoneálním povrchu nebo retroperitoneálně v oblasti celé pánve a dutiny břišní. Nezbytností je tedy rovněž orientace v oblasti horního břicha nad úroveň renálních cév a to se týká i oblasti retroperitonea [13]. Při kompletní peritonektomii včetně subhepatální krajiny při ev. doplnění cholecystektomie v rámci výkonu se tak dostáváme např. k anatomickému prostoru oblasti hepatoduodenálního ligamenta, které může být rovněž postiženo maligní lymfadenopatií. Jedná se o strukturu rozprostírající se mezi játry a duodenem a kromě četných lymfatických majících význam v nádorové diseminaci obsahuje žlučovod, vlákna nervus vagus a důležité cévní struktury, tj. jaterní tepnu a portální žílu (obr. 13) [7].

Možnosti řešení cévní léze z pohledu onkogynekologa

Zvládnutá technika operačních výkonů na základě dokonalé znalosti anatomie je základní prevencí vzniku možných komplikací. Cílem je udržet maximální přehlednost operačního pole s vyvarováním se iatrogennímu poranění a pečlivou zástavou krvácení v průběhu operace. Při laparotomickém přístupu je neocenitelný i vlastní palpační vjem, při laparoskopii je důležitým pomocníkem rovněž tlak vytvořeného kapnooperitonea „napomáhající“ disekci tkání. V případě vzniku léze je nutná okamžitá orientace v možnostech řešení vzniklého krvácení podle rozsahu a typu poranění cévních struktur. Při žilním poranění při laparotomickém přístupu přichází v úvahu komprese horkou rouškou, užití bipolární koagulace, opich monofilamentózním prolenovým stehem nebo zajištění lokální hemostázy pomocí preparátů s obsahem fibrinogenu a trombinu [25], u arteriálních poranění zpravidla vystačíme s koagulací a případnou pojistnou ligaturou jen v případě poranění nástěnných drobných větví, v ostatních případech je nutný opich, někdy i s užitím cévních svorek umožňujících přechodnou lokální kontrolu krvácení a přípravu operačního pole pro suturu léze. Při laparoskopickém přístupu je hlavní zásadou šetrná disekce s udržením „nekrvavého“ operačního pole. V případě vzniknuvšího poranění je nutno zvážit podle okolností schopnost ošetření léze laparoskopickým přístupem nebo přistoupit ke konverzi v laparotomii. Při laparoskopii dominuje použití bipolární koagulace, je možná komprese pomocí tamponu a lokální hemostáza pomocí „předrolovaných“ hemostatických preparátů [25] s možnou inzercí do dutiny peritoneální cestou laparoskopického portu. V případě adekvátní erudice v laparoskopické sutuře je při příznivých anatomických podmínkách možné i řešení endoskopické se zachycením místa léze určeného k sutuře pomocí atraumatického úchopového instrumentu, ev.

i s využitím cévních svorek (např. při lézi v oblasti externích ilických cév).

ZÁVĚR

Dokonalá znalost anatomie retroperitoneálních prostor majících vztah k možné diseminaci gynekologických malignit je základním předpokladem pro rozvoj operační erudice onkogynekologa. Cévní struktury jsou přitom jedním ze základních vodičích bodů pro orientaci v operačním poli a jejich rutinní znalost vytváří předpoklad pro suficientní rozsah radikální operace. Velice důležité je rovněž povědomí o přítomnosti možných cévních abnormalit, které se mohou stát zdrojem závažných peroperačních i pooperačních komplikací. Rovněž je nutné se zaměřit na rozvoj erudice v řešení těch komplikací, které forenzně nevyžadují intervenci cévní nebo jiné chirurgické subspecializace.

Práce vznikla za podpory MZ ČR – RVO (FNBr, 65269705).

LITERATURA

1. **Aletti, GD., Powless, C., Bakkum-Gamez, J., et al.** Pattern of retroperitoneal dissemination of primary peritoneum cancer: basis for rational use of lymphadenectomy. *Gynecol Oncol*, 2009, 114, 1, p. 32–36.
2. **Allen, C., Sauerland, E., Sievert C, Bardin J.** Left-sided inferior vena cava. *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord*, 2014, 2, 2, p. 206.
3. **Aljabri, B., MacDonald, PS., Satin, R., et al.** Incidence of major venous and renal anomalies relevant to aortoiliac surgery as demonstrated by computed tomography. *Ann Vasc Surg*, 2001, 15, 6, p. 615–618.
4. **Babu, CS., Lalwani, R., Kumar, I.** Right double inferior vena cava with preaortic iliac confluence – case report and review of literature. *J Clin Diagn Res*, 2014, 8, 2, p. 130–132.
5. **Bubb, K., du Plessis, M., Hage, R., et al.** The internal anatomy of the inferior vena cava with specific emphasis on the entrance of the renal, gonadal and lumbar veins. *Surg Radiol Anat*, 2016, 38, 1, p. 107–114.
6. **Cibula, D., Abu-Rustum, NR., Benedetti-Panici, P., et al.** New classification system of radical hysterectomy: emphasis on a three-dimensional anatomic template for parametrial resection. *Gynecol Oncol*, 2011, 122, 2, p. 264–268.
7. **Čihák, R.** Anatomie. 3. ed. Praha: Grada Publishing, 2016, 832 s.
8. **Eitan, R., Abu-Rustum, NR., Walker, JL., Barakat, RR.** Ligation of an anatomic variant of renal vasculature during laparoscopic periaortic lymph node dissection: a cause of postoperative renal infarction. *Gynecol Oncol*, 2003, 91, 2, p. 416–420.
9. **Fotopoulou, C., El-Balat, A., du Bois, A., et al.** Systematic pelvic and paraaortic lymphadenectomy in early high-risk or advanced endometrial cancer. *Arch Gynecol Obstet*, 2015, 292, 6, p. 1321–1327.

10. **Gyimadu, A., Salman, MC., Karcaaltincaba, M., Yuce, K.** Retroperitoneal vascular aberrations increase the risk of vascular injury during lymphadenectomy in gynecologic cancers. *Arch Gynecol Obstet*, 2012, 286, 2, p. 449–455.
11. **Honma, S., Tokiyoshi, A., Kawai, K., et al.** Preureteric inferior vena cava with possible rudiment of the proper inferior vena cava. *Ann Anat*, 2007, 189, 2, p. 191–195.
12. **Chang, SJ., Ryu, HS.** Laparoscopic para-aortic lymphadenectomy in endometrial cancer patient with left-sided inferior vena cava. *Gynecol Oncol*, 2012, 126, 1, p. 147–148.
13. **Chiva, LM., Castellanos, T., Alonso, S., Gonzalez-Martin, A.** Minimal macroscopic residual disease (0.1–1 cm). Is it still a surgical goal in advanced ovarian cancer? *Int J Gynecol Cancer*, 2016, 26, 5, p. 906–911.
14. **Christison-Lagay, ER., Fishman, SJ.** Vascular anomalies. *Surg Clin North Am*, 2006, 86, 2, p. 393–425.
15. **Khamanarong, K., Woraputtaporn, W., Teerakul, S., et al.** Left sided inferior vena cava: a case report. *J Med Assoc Thai*, 2010, 93, 8, p. 998–1000.
16. **Klemm, P., Fröber, R., Köhler, C., Schneider, A.** Vascular anomalies in the paraaortic region diagnosed by laparoscopy in patients with gynaecologic malignancies. *Gynecol Oncol*, 2005, 96, 2, p. 278–282.
17. **Kose, MF., Turan, T., Karasu, Y., et al.** Anomalies of major retroperitoneal vascular structure. *Int J Gynecol Cancer*, 2011, 21, 7, p. 1312–1319.
18. **Lee, YS., Lee, JH., Choi, JS., et al.** Accessory polar renal artery encountered in transperitoneal systemic laparoscopic paraaortic lymphadenectomy. *Eur J Gynaecol Oncol*, 2011, 32, 1, p. 87–90.
19. **Li, J., Wu, X.** Current strategy for the treatment of ovarian germ cell tumors: role of extensive surgery. *Curr Treat Options Oncol*, 2016, 17, 8, p. 44.
20. **Oderich, GS., Panneton, JM., Hofer, J., et al.** Iatrogenic operative injuries of abdominal and pelvic veins: a potentially lethal complication. *J Vasc Surg*, 2004, 39, 5, p. 931–936.
21. **O'Hanlan, KA.** Comprehensive, therapeutic retroperitoneal pelvic and infrarenal aortic lymphadenectomy for advanced cervical carcinoma. *Gynecol Oncol*, 2013, 130, 3, p. 634–635.
22. **Shindo S, Kubota K, Kojima A, et al.** Anomalies of inferior vena cava and left renal vein: risks in aortic surgery. *Ann Vasc Surg*, 2000, 14, 4, p. 393–396.
23. **Sláma, J., Kocián, R.** Technika pánevní a paraaortální lymfadenektomie. *Čes Gynek*, 2016, 81, 4, s. 253–264.
24. **Strauss, A., Kuehnle, E., Hilpert, F., et al.** Double inferior vena cava: a crucial finding complicating para-aortic lymphadenectomy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2011, 154, 2, p. 228–229.
25. **Takagi, T., Tsujimoto, H., Torii, H., et al.** Two-layer sheet of gelatin: A new topical hemostatic agent. *Asian J Surg*, 2016, Nov 2, pii: S1015-9584(16)30118-X.
26. **Turyna, R., Kachlík, D., Kucera, E., et al.** Complications in right-sided paraaortic lymphadenectomy: ventral tributaries of the inferior vena cava. *J Anat*, 2013, 223, 1, p. 69–73.
27. **Uflacker, R.** Atlas of vascular anatomy: an angiographic approach. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007, 905 p.
28. **Zivanovic, O., Sheinfeld, J., Abu-Rustum, NR.** Retroperitoneal lymph node dissection. *Gynecol Oncol*, 2008, 111(2 Suppl), p. S66–69.

MUDr. Luboš Minář, PhD.

Onkogynekologické centrum FN Brno
Gynekologicko-porodnická klinika
LF MU a FN
Obilní trh 11
602 00 Brno
e-mail: Minar.Lubos@fnbrno.cz

5.3. Operační komplikace radikálních onkogynekologických výkonů

Radikální onkogynekologické operace jsou spojeny s vyššími parametry morbidity než klasická gynekologická operativa, neboť tyto výkony prezentované kompletním chirurgickým stagingem u časných stádií a rozsáhlou cytoredukcí a exenteračními operacemi u pokročilých stádií přesahují rozsah gynekologických orgánů. To je spojeno se zvýšeným rizikem poranění anatomických struktur jiných orgánových systémů, včetně jejich inervace a příslušejícího lymfovaskulárního aparátu. Poranění může být asociováno s operační technikou, použitou operační technologií, anatomickou lokalitou a může se projevit okamžitě a/nebo odloženě.

Získání specializace v onkogynekologii je založeno na dlouhodobějším rozvoji speciální erudice, která musí být podpořena dokonalou znalostí anatomie přesahující rozsah gynekologických orgánů [130-132]. Kromě rozvoje praktické erudice je pro prevenci vzniku a redukci závažnosti komplikací naprostou nezbytností sledování a uplatňování moderních operačních trendů, miniinvazivního přístupu, rozvoj „nerve sparing“ technik a implementace moderního operačního instrumentária a nových technologií umožňujících šetrnou preparaci tkání a bezpečnou zástavu krvácení s minimalizací termického poškození okolních tkání [133-140]. Neméně důležité je povědomí o možném vzniku komplikací. V případě peroperačního poranění je zásadní jeho rychlé rozpoznání a okamžitá rekonstrukce, která může být dle charakteru komplikace buď v režii onkogynekologa samotného nebo s využitím nezbytné interdisciplinární spolupráce jiného operačního oboru. Stejná pozornost musí být věnována i pooperačnímu průběhu a příslušným komplikacím časným a pozdním. Tato problematika je analyzována v publikačním výstupu autora prezentovaném souhrnnou prací (viz **příloha 5.3.1.**) a rovněž se jí autor věnuje i v publikaci věnované profitu zadní modifikované supralevátorové exenterace u pokročilých ovariálních karcinomů (viz **příloha 4.1.1.**)

Samostatnou pozornost v komplexu komplikací onkogynekologických operací si zasluhuje problematika lymfatického ascitu a lymfocyst. Jejich vznik je specifický pro onko-

gynekologickou radikální operativu, a sice v souvislosti s chirurgickým stagingem a odstraněním poměrně velkého objemu tukově-lymfatické tkáně lokalizované podél magistrálních cévních kmenů oblasti pánve, dolního břicha a třísel v průběhu systematické lymfadenektomie [141-143]. Povědomí o jejich existenci a morfologii na používaných zobrazovacích metodách je zásadní pro správný management těchto nálezů, který se řídí přítomností klinické symptomatologie [144,145]. Problematika je analyzována na souboru 111 pacientek operovaných v Onkogynekologickém centru FN Brno. Analýza v doloženém publikačním výstupu (viz **příloha 5.3.2.**) poskytuje informace o procentuálním výskytu lymfocyst, jejich vazbě na rozsah provedené lymfadenektomie a typ malignity a o možnostech terapie symptomatických lymfocyst.

5.3.1. Minář L, Weinberger V, Kysela P. Komplikace radikálních onkogynekologických operací. (2010). Česká Gynekologie, 75(4), pp. 346-352.

Minář L.¹, Weinberger V.¹, Kysela P.²

¹Gynekologicko-porodnická klinika LF MU a FN, Brno, přednosta prof. MUDr. P. Ventruba, DrSc.

²Chirurgická klinika LF MU a FN, Brno, přednosta prof. MUDr. Z. Kala, CSc.

ABSTRACT

Objective: Information sheet about the most frequently complications of radical oncogynecological operations.

Design: Literature review with case reports.

Setting: Department of Gynaecology and Obstetrics, Faculty of Medicine, Masaryk's University and Faculty Hospital, Brno.

Methods: Literature review about complications of radical oncogynecological operations with illustrative case reports.

Conclusions: Radical oncogynecological operations, due to their size, associated with a higher morbidity compared with traditional gynecological surgery. The literature states morbidity parameters between 25-45% depending on the center of erudition and range of out performance. Basic division of surgical complications is on perioperative complications and postoperative complications, which are further divided into early and late.

The most frequently intraoperative complication is large blood loss requiring the application of blood substitutes. Less common complications are injury to the urinary bladder, ureter, rarely bowel or neural structures, especially nerve obturatorius. Among early postoperative complications are dominated urological complications, particularly urinary bladder hypotonia, another important group are the vascular complications, ie trombembolia and bleeding. Between late postoperative complications is possible to define several basic groups, ie urology, intestinal, lymphovascular and complications associated with laparotomy wound suture.

Prevention of complications should be based on several basic assumptions. These include adequate erudition and composition of the operating team, perfect knowledge of anatomical conditions in the pelvic retroperitoneum, the paraaortic, the paracaval and inguinal area, implementation radicality adequate performance in relation to the extent of the disease and developing new surgical techniques (eg nerve sparing surgery). Absolute necessity is also the possibility of interdisciplinary cooperation with other surgical disciplines, which is important both in terms of preventing complications, and for their event. subsequent solutions.

Key words: intraoperative and postoperative complications, blood loss, injury to the urinary bladder and ureter, urinary fistula, thromboembolic complications, lymphedema, lymphocyst, hemangioma.

SOUHRN

Cíl studie: Informační přehled o nejčastějších komplikacích radikálních onkogynekologických operací.

Typ studie: Literární přehled s kazuistikou.

Název a sídlo pracoviště: Gynekologicko-porodnická klinika LF MU a FN Brno.

Metodika: Literární přehled o komplikacích radikálních onkogynekologických operací s ilustrativní kazuistikou.

Závěr: Radikální onkogynekologické operace jsou vzhledem ke svému rozsahu spojeny s vyšší morbiditou ve srovnání s klasickou gynekologickou operativou. V literatuře se uvádějí parametry morbidity v rozmezí 25-45 % v závislosti na erudici centra a spektru prováděných výkonů. Základní rozdělení komplikací operačních výkonů je na komplikace peroperační a komplikace pooperační, které se dále dělí na časné a pozdní.

Nejčastější peroperační komplikací je velká krevní ztráta vyžadující aplikaci krevních náhrad. Méně časté komplikace pak představují poranění močového měchýře, ureteru, vzácněji trávicí trubice nebo nervových struktur, zejména nervus obturatorius. Mezi časnými pooperačními komplikacemi dominují komplikace urologické, zejména hypotonie močového měchýře, další významnou skupinu pak představují komplikace vaskulární, tj. trombembolie a krvácení. Mezi pozdními pooperačními komplikacemi je možno vymezit několik základních skupin, tj. urologické, intestinální, lymfovaskulární a komplikace spojené s hojením laparotomické sutury.

Prevence komplikací by měla vycházet z více základních předpokladů. Mezi ně patří adekvátní erudice

a složení operačního týmu, dokonalá znalost anatomických poměrů v oblasti retroperitonea pánve, v oblasti paraaortální, parakavální a krajiny třísel, provádění výkonů adekvátní radikality ve vztahu k rozsahu onemocnění a rozvíjení nových operačních technik (např. nerve sparing surgery). Naprostou nezbytností je rovněž možnost interdisciplinární spolupráce s dalšími chirurgickými obory, která je důležitá jak z hlediska předcházení komplikacím, tak i pro jejich event. následné řešení.

Klíčová slova: peroperační a pooperační komplikace, krevní ztráta, poranění močového měchýře a ureteru, močová píštěl, trombembolické komplikace, lymfedém, lymfocysta, hemangiom.

ÚVOD

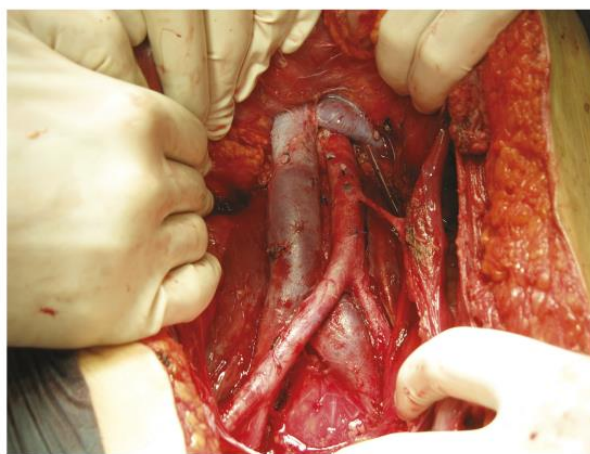
Komplikace operačních výkonů lze obecně rozdělit na komplikace peroperační a komplikace pooperační, které se dále dělí na časné a pozdní. Podle statistických údajů se výskyt peroperačních komplikací gynekologické operativy pohybuje v dosti širokém rozmezí 0,2-26 %. Laparoskopická chirurgie ve srovnání s klasickou laparotomickou operativou rovněž nevykazuje snížení rizika peroperačního poranění okolních pánevních orgánů [4, 31]. Radikální onkogynekologická operativa je pochopitelně spojena s nejvyšším rizikem operačních komplikací, a to jak peroperačních, tak i pooperačních, ve srovnání s klasickou gynekologickou operativou. Nejvyšší riziko se pak týká exenterační pánevní chirurgie vyžadující interdisciplinární spolupráci onkogynekologa, chirurga a urologa, kde se závažná morbidita pohybuje v rozmezí 60-70 %. Incidence těchto komplikací přitom závisí na celé řadě faktorů, mezi něž patří např. zkušenost a erudice operátora, indikace k operaci a rozsah operačního výkonu. K faktorům, které snižují riziko komplikací, patří zejména posun diagnózy do časnějších stadií (a s tím související nižší frekvence neoadjuvantní léčby, zejména radioterapie, která způsobuje fibrotizaci a obtížnější preparaci tkání) nebo zlepšení operačních technik [9].

PEROPERAČNÍ KOMPLIKACE

Nejčastější peroperační komplikací radikální onkogynekologické operativy je velká krevní ztráta vyžadující aplikaci krevních náhrad. Méně časté komplikace pak představují poranění močového měchýře, ureteru, vzácněji trávicí trubice nebo nervových struktur, zejména nervus obturatorius.

Větší **krevní ztráta** vznikající v průběhu radikální onkogynekologické operace je dána rozsahem radikality výkonu i vlastnostmi nádorově postižených tkání vyznačujících se většinou zvýšenou maligní neovaskularizací. V oblasti retroperitonea se onkogynekolog pohybuje v těsné blízkosti velkých cévních kmenů i drobných pletení. Obecně platí, že z hlediska event. iatrogenního poranění jsou rizikovější kmeny žilní. Je to jednak oblast dolní duté žíly, především nad její bifurkací, kde odstupují četné drobné větve, které

mohou být při preparaci vytrženy z cévní stěny. Laterodorzálně odstupuje z aorty a dolní duté žíly řada lumbálních větví, které jsou další rizikovou oblastí z hlediska poranění. Dále je to oblast vena iliaca externa směrem do tříselného kanálu s odstupem vena dorsalis clitoridis interna, která představuje spojku mezi zevní a vnitřní ilickou žílou a je lokalizována zpravidla na zadní stěně symfýzy. Další rizikovou oblastí je



Obr. 1. Paraaortální a parakavální oblast se skeletizovanou a. mesenterica inferior

obturatorní fossa, zejména část infraobturatorní pod průběhem stejnojmenného nervu s interindividuálně variabilním větvením vena iliaca interna na spodině fossy. V oblasti tepenných kmenů je pak nutné věnovat zvýšenou pozornost oblasti paraaortální s odstupem většinou poměrně gracilní a. mesenterica inferior, která zajišťuje adekvátní krevní zásobení klíček tenkého střeva (obr. 1).

Kromě poranění standardních cévních struktur však může operátora překvapit i náhodně se vyskytující koincidující léze, jejíž poranění může být rovněž příčinou život ohrožujícího krvácení v rámci operačního výkonu, jak bude prezentováno v níže uvedené kazuistice.

Poranění močového měchýře může vzniknout při tupém oddělování hrdla děložního od močového měchýře, kdy může dojít přímo i k perforaci stěny. Na poranění nás upozorní přítomnost čiré tekutiny v operačním poli, viditelná léze stěny měchýře, event. při laparoskopické operaci i distenze sběrného močového

sáčku plynem. Ze statistik vyplývá, že při laparoskopických výkonech je riziko iatrogenního poranění močového měchýře 2-10krát vyšší než při klasickém přístupu a tento trend roste v souvislosti se zvyšující se složitostí pánevní laparoskopické chirurgie.

Při podezření na poranění je nutné provést přímou inspekci stěn měchýře, při negativě naplnění např. roztokem metylenové modři ve fyziologického roztoku se sledováním případného úniku barviva, v krajním případě následuje již urologem provedená cystotomie a revize měchýře. Při poranění během výkonů z vaginálního přístupu je nejvhodnější metodou k detekci léze cystoskopie, kdy současně zjišťujeme vztah defektu k ureterálním ústím.

Častěji než s perforací se setkáváme s poraněním a následným oslabením detruzoru a vznikem hypotonie močového měchýře, v krajním případě dochází v oslabené, ztenčené stěně k ischemickým změnám s následnou extravazací a vznikem fistuly [9].

Nejčastější komplikací při radikální pánevní chirurgii je však zhoršení mikce na podkladě ztráty uterovaginální podpory měchýře a přerušení nervových pletení v oblasti parametrií. Nejrizikovější varianta radikální hysterektomie z tohoto pohledu je hysterektomie III. stupně radikality, při které jsou postranní parametria resekována kompletně až na dno pánevní a zadní parametria asi 2 cm od kosti křížové, což je spojeno s vysokým rizikem poranění hypogastrického nervového plexu, jehož vlákna podle současných znalostí anatomie nervového zásobení pánve probíhají v bázi zadních parametrií a částečně v kaudální části postranních parametrií [26]. Z tohoto pohledu je snaha o rozvoj operační techniky, která by umožnila zachování autonomní inervace pánevních orgánů při současném zachování adekvátní radikality operace, tzv. nerve sparing surgery.

Postup dosud nelze považovat za jednoznačně standardizovaný, dosud největší soubor výkonů publikoval v roce 2006 Raspagliesi, kdy srovnával parametry morbidit u výkonů rozdílné radikality u celkem 110 pacientek operovaných pro karcinom děložního hrdla. Při vlastním výkonu je nervový plexus poprvé identifikován v presakrální oblasti při pánevní lymfadenektomii, následně se nachází mediálně po obou stranách při otevření pararektálního prostoru. Postranní parametria se resekují do výše odstupu a. rectalis media, přední parametrium by mělo být po sesunutí močového měchýře a preparaci paravezikální fossy disekováno na dvě části - horní část asi v polovině nebo při stěně močového měchýře, dolní část s nervovým plexem je zachována. Rovněž tak by měla být provedena i disekce dvou částí zadních parametrií - mediální část obsahující sakrouterinní vazy může být resekována podle požadované radikality, část laterální s hypogastrickým plexem zůstává zachována, parakolpium je pak doresekováno směrem k pochvě rovněž nad úroveň nervové pleteně [19].

Poranění ureteru se udává asi u 0,5-2 % hysterektomií a neradikálních pánevních gynekologických operací a asi u 10 % radikálních hysterektomií. Ureter je

v průběhu radikálních hysterektomií preparován v různém rozsahu v závislosti na stupni radikality hysterektomie. U I. stupně, kdy je technika výkonu totožná s extrafasciální hysterektomií, ureter není mobilizován, ale pouze odsunut laterálně ve svém průběhu parametrii. U II. stupně je ureter uvolněn ve svém průběhu z postranních parametrií, ale ponechán na předních parametriích, která nejsou resekována, což je důležité pro zachování cévního zásobení distální části močovodu. U III. stupně radikality je pak ureter zcela mobilizován až ke vstupu do močového měchýře [17].

Preparaci ureteru při výkonu může komplikovat celá řada faktorů, jako jsou obezita, fibrotické změny tkání po předchozích výkonech, zánětlivé změny nebo nádorová infiltrace, ty mohou současně způsobovat i dislokaci ureteru. Naprostá většina lézí ureteru postihuje jeho distální část a vzniká při ošetřování obtížně stavitelného krvácení v oblasti postranních parametrií. Podstatně vzácnější je poranění ureteru proximálněji při nakládání stehů v oblasti infundibulopelvickeho vazy. K poranění ureteru může dojít při jeho preparaci i v rámci radikálního operování z přístupu vaginálního [22], s kterým však má zkušenost v našich podmínkách jen minorita onkogynekologických operátorů, a není tudíž příliš rozšířen a preferován. Při vaginálním přístupu může dojít k poranění ureteru i během rekonstrukce poševního pahýlu. Ureter může být peroperačně poraněn nastřížením nebo úplným přerušením, event. může být částečně excidován s přiléhající tkání. Rovněž může dojít k jeho zhmoždění při nasazení nástroje, většinou peánu, kdy dojde i bez ligatury k ischemizaci stěny a nekróze s následným vznikem defektu. Ureter může být poškozen i elektrokoagulací nebo ligaturou s následnou nekrózou stěny [15].

Všechny tyto situace jsou spojeny s extravazací moči. Z poranění terminálního ureteru může rezultovat i vznik vezikovaginální fistulace [16]. Devaskularizace ureteru se může v mírnější formě projevit i vznikem striktury, většinou až za několik dnů nebo týdnů jako komplikace pooperační. Zranitelné cévní zásobení má především střední třetina ureteru, dolní třetina a terminální část jsou zásobeny ze stěny pánevní, z větví vezikálních, rektálních i pudendálních.

V případech, že je poranění ureteru zjištěno peroperačně, je nutná pečlivá revize, samozřejmě pod vedením urologa, protože bezprostřední rekonstrukční výkony mají ve srovnání s odloženými výkony podstatně lepší výsledky (až 100 % vs. 67 %) a nižší počet komplikací. Možnosti řešení závisí na typu a rozsahu poranění, patří mezi ně zavedení ureterálního stentu, resekce postiženého úseku a provedení ureteroureteroanastomózy nebo reimplantace ureteru [6].

Poranění trávicí trubice mohou vzniknout při uvolňování adhezí střevních klíčků po předchozích operacích, kdy dochází k deserozaci nebo na základě nešetrné operační techniky ve smyslu termického poškození nebo přímé perforace. Poranění v oblasti žaludku a duodena při onkogynekologické operační léčbě je raritní. Častěji se setkáváme s poraněním střeva, frekventnější je výskyt těchto poranění u laparo-

skopických radikálních výkonů, kde se udává v rozmezí 0,1-0,6 %, s častějším postižením tenkého střeva. Příčinou bývá většinou elektrokoagulační poranění s nekrotizací a následným vytvořením nástěnného defektu [4, 31]. S poraněním rekta se setkáváme častěji u vaginálního operačního přístupu, kde se pohybuje do 2 %. Možnosti ošetření poranění, které jsou v kompetenci břišního chirurga, představují prostá sutura, resekce postižené části střeva s anastomózou, resekce poraněné části střeva a založení dvouhlavňové stomie nebo stomie orálního úseku a uzavření aborálního úseku střeva (tzv. resekce podle Hartmanna) [9].

Poranění nervus obturatorius ve formě přerušení se může rovněž raritně vyskytnout v rámci radikální pánevní chirurgie při provádění pánevní lymfadenektomie v souvislosti s nešetrnou operační technikou a nedostatečnou praktickou erudicí operátora. Řešení suturou je v těchto případech v kompetenci neurochirurga. Daleko častěji se setkáváme s různě silně vyjádřenými klinickými projevy iritace nervu (poruchy hybnosti, tj. addukce nebo čítí v oblasti příslušné dolní končetiny) na podkladě manipulací s následným edémem nervu při systematické pánevní lymfadenektomii v oblasti obturatorní fossy. Klinické potíže bývají přechodného rázu a různě rychle ustupují v souvislosti s adekvátní pooperační rehabilitační péčí.

POOPERAČNÍ KOMPLIKACE

Mezi **časnými pooperačními** komplikacemi radikální onkogynologické operativy dominují komplikace **urologické**, zejména hypotonie močového měchýře, další významnou skupinu pak představují komplikace **vaskulární**, tj. trombembolie a krvácení. K hypotonii močového měchýře disponuje tupé oddělování děložního hrdla od močového měchýře s oslabením detruzoru, v rámci radikálních výkonů pak zejména léze nervových vláken hypogastrického plexu v parametriích, kdy dochází k dysfunkci močového měchýře na pokladě poruchy kontraktility detruzoru v souvislosti s postižením autonomní inervace [19]. Zásadní je zajištění drenáže močového měchýře permanentním katétrem, epicystostomií, event. pravidelným cévkováním. Drenáž je možné odstranit až po obnovení spontánní mikce, v opačném případě hrozí ireverzibilní poškození detruzoru se vznikem atonického měchýře.

Mezi **pozdními pooperačními** komplikacemi je možno vymezit několik základních skupin, tj. urologické, intestinální, lymfovaskulární a komplikace spojené s hojením laparotomické sutyry.

Mezi **urologické** komplikace patří kromě přetrvávající **hypotonie močového měchýře** např. rozvoj **močové inkontinence** s výrazným zastoupením stresové složky na základě změny anatomických poměrů po kompletních výkonech se ztrátou uterovaginální podpory močového měchýře.

Závažnou skupinu urologických komplikací předsta-

vují **močové píštěle**. Vznikají při nerozpoznaném poranění vývodných cest močových, pokud dojde k ohraničení pasáže moči směrem k nezahojené ráně pochvy nebo vzácně do laparotomické rány. Fistula se zpravidla manifestuje mezi 4.-8. pooperačním dnem, nejpozději za 15 dnů po operaci. Nejčastější varianta je fistula vezikovaginální, vzácně se může objevit také ureterovaginální nebo uretrovaginální. K diagnostice a orientační lokalizaci píštěle se používá zkouška tří tamponů s plněním močového měchýře fyziologickým roztokem zbarveným metylénovou modří. Mezi další metody sloužící k diagnostice pak patří cystografie, uretrocystoskopie, která může být součástí retrogradní ureteropyelografie nebo intravenózní vylučovací urografie [9].

Řešení těchto komplikací je v kompetenci urologa. V oblasti ureteru se může jednat o zavedení stentu, resekční výkon s anastomózou, reimplantaci ureteru, v případě rozsáhlejšího poškození se provádí rekonstrukce interpozicí ilea nebo appendixu (v literatuře je zmiňována úspěšnost až v 80 % případů). Jednoduché vezikovaginální píštěle lze uzavřít sblížením zdravých okrajů jednotlivých vrstev obou orgánů, u komplikovanějších píštěl (po rozsáhlém poranění, infekčních komplikacích, následné radioterapii) je vhodné obě strany píštěle oddělit ještě další tkání, nejčastěji s využitím tkáně omenta. Větší úspěch rekonstrukce je u píštěl zjištěných během prvních dvou týdnů po primárním operačním výkonu, kdy jsou tkáně ještě poddajné a nezjizvené, výjimkou jsou píštěle uretrovaginální, zpravidla spojené s poškozením svěrače uretry, kdy se naopak rekonstrukční výkon odkládá do doby, kdy je zbylá tkáň sfinkteru pevná a provádí se rovněž plastika svěrače současně s uzavřením defektu [16].

Stenóza ureteru s následným rozvojem hydronefrózy může jako pozdní komplikace vzniknout na podkladě devaskularizace ureteru při jeho rozsáhlejší skletizaci, kdy dochází ke vzniku striktury většinou až za několik dnů nebo týdnů po operaci. V diagnostice je základní vyšetřovací metodou ultrazvuk doplněný intravenózní vylučovací urografií. Řešení může být endoskopické, pokud je stenóza do 2 cm a je zjištěna během prvních tří pooperačních měsíců, a sice provedením endoureterotomie a balonkové dilatace, v ostatních případech je indikovaná otevřená operace s provedením resekce a anastomózy nebo reimplantační výkony [15].

Mezi komplikace **intestinální** patří zvýšené riziko rozvoje střevní neprůchodnosti, většinou se v rámci pozdních komplikací jedná o **ileus mechanický**. Předispoňujícím faktorem je zejména zvýšené riziko adhezivního procesu v pávni při velké ranné ploše. Na základě poranění hypogastrického nervového plexu při radikální hysterektomii dochází i k ovlivnění funkčimu ve smyslu oslabení peristaltiky.

Mezi komplikace **lymfovaskulární** patří rozvoj **lymfedému dolních končetin**, který je možnou komplikací lymfadenektomie. Klinicky se projevuje jako otok jedné či obou končetin vznikající v průběhu 12 měsíců po operaci a má tendenci přecházet do chronic-

kého stadia. V etiopatogenezi se uplatňuje postižení lymfatické uzliny nádorem nebo přerušení lymfatické drenáže při lymfadenektomii odstraněním uzliny, a zároveň porucha nervového zásobení cév vedoucí k chronické vazodilataci [29]. Rozvoj lymfedému záleží na lokalizaci a stadiu nádorového onemocnění, radikálnosti provedeného operačního výkonu, provedení systematické lymfadenektomie nebo pouze biopsie sentinelové uzliny a na počtu a lokalizaci odstraněných lymfatických uzlin [24]. Nejvyšší prevalence lymfedému se udává po operacích pro karcinom vulvy, na druhém místě je karcinom děložního hrdla, těsně následovaný karcinomem endometria a nejméně často se lymfedém vyskytuje po radikálních operacích pro karcinom ovaria. Po operacích pro karcinom vulvy se udává výskyt lymfedému v rozmezí 36-69 % [1, 7, 23, 28]. Prevalence lymfedému u pacientek s karcinomem děložního hrdla, u kterých byla součástí radikálního chirurgického výkonu lymfadenektomie, se popisuje v rozmezí 17-27 % [12, 20, 28]. U pacientek po operaci pro karcinom endometria s pánevní lymfadenektomií se popisuje prevalence lymfedému 16-25 % [28, 30]. Nejméně často se lymfedém vyskytuje se po chirurgické léčbě karcinomu ovaria, v literatuře se uvádí prevalence 5-7 % [1, 28].

Pro detekci lymfedému se využívá několik vyšetřovacích metod. Základní orientační metodou je měření obvodů na předem určených místech postižené končetiny a jejich porovnávání s rozměry zdravé končetiny. Novou neinvazivní metodou k detekci lymfedémů je multifrekvenční bioelektrická impedanční analýza. Metoda měří specificky množství extracelulární vody, která odpovídá kompartmentu lymfedému, a to pomocí rezistence tkáně při průchodu elektrického proudu o různých frekvencích [10, 14]. Metodou, která je využívána převážně pro lymfoterapeutu k detailnějšímu popsání lokalizace poruch lymfatické drenáže, je lymfoscintigrafie. Využívá subkutánní aplikaci radioaktivního koloidu do postižené končetiny s následným sledováním transportu této látky lymfatickými cévami gama kamerou. Pro lymfedém je charakteristický chybějící nebo zpomalený transport aplikované látky. Metoda má poměrně vysokou senzitivitu (75-95 %) a 100% specifitu [18]. Mezi další pomocné diagnostické metody patří ultrasonografie, CT a magnetická rezonance. Komplexní terapie lymfedému zahrnuje péči o kůži, úpravu životního stylu, lymfatickou drenáž, zevní kompresi a podpurná cvičení [2, 18, 21]. Doplňkem léčby je farmakoterapie využívající léky s fibrinolytickými a proteolytickými účinky a mobilizující makrofágy, např. Detralex, Wobenzym.

Další lymfovaskulární komplikaci v souvislosti s radikální onkogynekologickou operativou a exenterací lymfatických uzlin představují **lymfocysty**. Vznikají při déletrvající secernaci lymfy z přerušovaných lymfatických kmenů, kdy dochází k hromadění lymfy především v pánevním retroperitoneálním prostoru pod novotvořeným nástěnným peritoneálním krytem. Přispívají k rozvoji rozsáhlejších lymfedémů, tlakem na cévní svazky mohou potencovat rozvoj **zánětlivých**

a trombotických komplikací žilního systému pánve a dolních končetin [25, 27]. Rovněž jsou predispozicí pro vznik pánevních zánětlivých komplikací včetně abscesových formací [11]. Prevencí tvorby lymfocyst je dlouhodobě akceptovaný konsensus týkající se neprovádění peritonealizace po lymfadenektomiích a adekvátní pooperační drenáž dutiny břišní.

Mezi **komplikace spojené s hojením laparotomické sutury** patří riziko ranné infekce a vznik herniace v jizvě. Výskyt infekčních komplikací ovlivňují lokální a celkové rizikové faktory. Mezi lokální patří primárně infikovaný operační terén, pooperační hematoma nebo ponechaná nekrotická tkáň, k celkovým faktorům pak patří diabetes mellitus, imunosuprese nebo malnutrice.

VLASTNÍ POZOROVÁNÍ

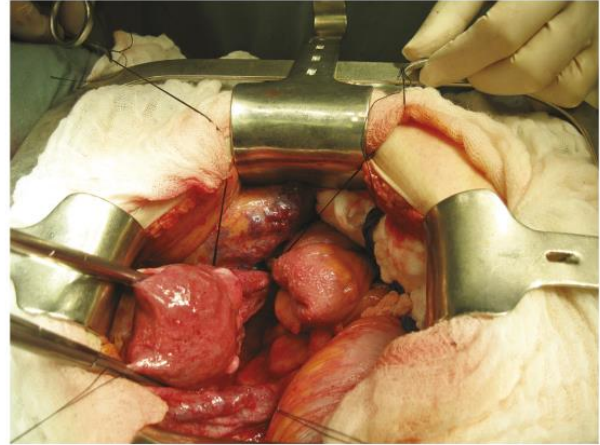
Prezentujeme život ohrožující komplikaci způsobenou nadměrnou krevní ztrátou v průběhu radikální onkogynekologické operace. Šlo o ženu ve věku 66 let, důchodkyni, s negativní rodinnou onkologickou anamnézou. Anamnesticky byla pacientka od dětství sledována pro poměrně rozsáhlý kavernózní hemangiom pravého boku (obr. 2) přecházející do oblasti vulvy a na vnitřní stranu pravého stehna (obr. 3). V této souvislosti podstoupila celkem 6 operačních výkonů na pracovištích plastické chirurgie, avšak jen s minimálním efektem. Vzhledem k opakovaným tromboflebitidám v oblasti kavernózní pleteně hlavně v oblasti pravé dolní končetiny měla chronickou perorální antikoagulační terapii.

V červenci 2009 podstoupila na našem pracovišti z indikace postmenopauzální metroragie a suspektní hyperplazie endometria frakcionovanou kyretáž s histologickým nálezem špatně diferencovaného endometroidního adenokarcinomu těla dělohy, event. invazi myometria nebylo možné z dodaného materiálu určit. Na základě stagingových vyšetření bylo vysloveno podezření na invazi myometria nepřesahující polovinu síly děložní stěny na její zadní stěně, bez pravděpodobného postižení cervixu, další vyšetření byla negativní. Vedlejším nálezem byla podle UZ a CT vyšetření voštinovitá struktura lokalizovaná v břišní stěně v oblasti pravého boku nad průběhem zevních ilických cév, její popisovaná velikost byla 15 x 7 x 6 cm a odpovídala nálezu kavernózního hemangiomu. Pacientka byla indikována k operačnímu výkonu, vzhledem ke koincidujícímu nálezu hemangiomu byl indikován laparotomický přístup.

Při otevření dutiny břišní byl při revizi pánve a dutiny břišní detekován subperitoneálně plošný hemangiom masivně vyklenující nástěnné peritoneum nad průběhem zevních ilických cév (obr. 4, 5). V rámci výkonu byla standardně provedena laváž, extrafasciální hysterektomie s oboustrannou adnexektomií, z freez histologie potvrzen nález předoperačního UZ vyšetření, tj. invaze nepřesahující polovinu síly myometria a rovněž špatně diferencovaný grading tumoru.



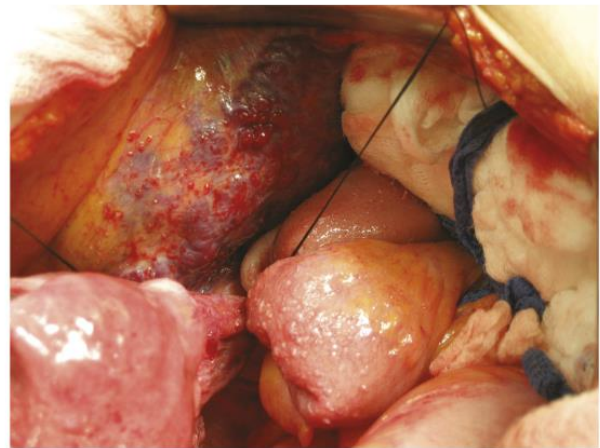
Obr. 2. Kožní projev hemangiomu v oblasti pravého boku



Obr. 4. Pánevní oblast se subperitoneálně prominujícím hemangiomem



Obr. 3. Kožní projev hemangiomu v oblasti vulvy a vnitřní strany stehna



Obr. 5. Detail kavernózního hemangiomu

Na základě histologie se pokračovalo ve výkonu v rozsahu pánevní lymfadenektomie. Levostranná byla provedena standardním způsobem, v pravostranné lokalizaci bylo vzhledem k přítomnosti hemangiomu postupováno atypicky po preparaci ureteru exenterací nejdříve oblasti obturatorní fossy a interních ilických cév. Zevní ilické cévy byly ozřejmeny z kaudálního pohledu, kraniálně již na ně naléhaly kaverny hemangiomu. Při tupé palpaci suprailické krajiny směrem do inguinálního kanálu, kde již nástěnné peritoneum nebylo vyklenuto hemangiomem, však došlo k profuznímu zakrvácení venózní krví a při následném odklopení peritonea bylo detekováno krvácení z perforované marginální kaverny hemangiomu. Oblast byla tamponována a k výkonu přivolán cévní chirurg. Vzhledem k nálezům s rizikem exsanguinace se v první fázi postupovalo z oblasti pravého třísla, kde byly postupně přerušeny zdroje hemangiomu z oblasti saphenofemorální junkce, po odpojení hemangiomu v třísle pokračováno revizí z dutiny břišní, kde byly přerušeny další žilní spojky odstupující z vena iliaca externa a interna k hemangiomu. Následně byla pánev tamponována, provedena adaptační sutura stěny břišní. Celková krev-

ní ztráta při výkonu dosáhla 3500 ml a byla v jeho průběhu adekvátně hrazena.

Týž den byla ještě doplněna digitální subtrakční angiografie, při které nebyla nalezena jednoznačná extravazace, aplikováno bylo menší množství spongostanového materiálu do descendentního řečiště arteria iliaca externa l.dx. Za necelých 48 hodin po výkonu byla provedena extrakce břišní tamponády, oblast hemangiomu byla již bez známek event. krvácení. Definitivní histologie potvrdila nález z peroperační biopsie, následná brachyradioterapie již byla radioterapeutem kontraindikována a pacientka byla převedena do standardní dispenzární péče, v níž se nyní nachází bez známek recidivy základního onemocnění.

ZÁVĚR

Radikální onkogynekologické operace jsou vzhledem ke svému rozsahu pochopitelně spojeny s vyšší morbiditou ve srovnání s klasickou gynekologickou operativou. V literatuře se uvádějí parametry morbidu-

ty v rozmezí 25-45 % v závislosti na erudici centra a spektru prováděných výkonů. Prevence komplikací by měla vycházet z více základních předpokladů. Mezi ně patří adekvátní erudice a složení operačního týmu, dokonalá znalost anatomických poměrů v oblasti retroperitonea pánve, v oblasti paraaortální, parakavální a krajiny třísel, provádění výkonů adekvátní radikality ve vztahu k rozsahu onemocnění a rozvíjení nových operačních technik (např. nerve sparing surgery) [8, 19]. Naprostou nezbytností je rovněž možnost interdisciplinární spolupráce s dalšími chirurgickými obory, která je důležitá jak z hlediska předcházení komplikacím, tak i pro jejich event. následné řešení. Aby byly splněny tyto předpoklady, je zřejmé, že léčba musí být centralizována a prováděna v onkogynekologických centrech na základě mezioborové spolupráce [3, 5].

LITERATURA

1. Beesley, V., Janda, M., Eakin, E., et al. Lymphedema after gynecological cancer treatment. *Cancer* 2007, 109 (12), p. 2607-2614.
2. Benda, K. Lymfédém končetin v ordinaci praktického lékaře. *Med pro praxi* 2006, 6, s. 276-279.
3. Benedetti-Panici, P., Angioli, R. Gynecologic oncology specialty. *Eur J Gynaecol Oncol* 2004, 25 (1), p. 25-26.
4. Bishoff, JT., et al. Laparoscopy bowel injury: incidence and clinical presentation. *J Urol* 1999, 161(3), p. 887-890.
5. Bouda, J., Rokyta, Z., Mleziva, J. Onkogynekologický operátor - subspecializace. *Čes Gynek* 1999, 64(2 Suppl), s. 31-32.
6. Brandes, S., Coburn, M., Armenakas, N., et al. Diagnosis and management of ureteric injury: an evidence-based analysis. *Brit J Urol Internat* 2004, 94(3), p. 277-289.
7. Brouns, E., Donceel, P., Stas, M. Quality of life and disability after ilio-inguinal lymphadenectomy. *Acta Chir. Belg* 2008, 108(6), p. 685-690.
8. Cibula, D., Kesic, V. Surgical education and training in gynecologic oncology I: European perspective. *Gynecol Oncol* 2009, 114(2 Suppl), p.52-55.
9. Cibula, D., Petruželka, L., et al. Onkogynekologie. Praha: Grada 2009, s. 171-186.
10. Cornish, BH., Thomas, BJ., Ward, LC. Improved prediction of extracellular and total body water using impedance loci generated by multiple frequency bioelectrical impedance analysis. *Phys Med Biol* 1993, 38, p. 337-346.
11. Franchi, M., Ghezzi, F., Riva, C., et al. Postoperative complications after pelvic lymphadenectomy for the surgical staging of endometrial cancer. *J Surg Oncol* 2001, 78(4), p. 232-237.
12. Füller, J., Guderian, D., Köhler, C., et al. Lymphedema of the lower extremities after lymphadenectomy and radiotherapy for cervical cancer. *Strahlenther Onkol* 2008, 184 (4), p. 206-211.
13. Goff, BA. Surgical education for gynecologic oncologists. *Gynecol Oncol*, 2009, 114(2 Suppl), p. 46.
14. Halaška, M.J., Komárek, V., Malá, I., et al. A method for the detection of post-operative lymphoedema after operation for breast cancer: multifrequency bioelectrical impedance analysis. *J Appl Biomed* 2006, 4, p. 179-185.
15. Hanuš, T., Jarolím, L., Petřík, R. et al. Iatrogenní léze močového u žen. *Rozhl Chir* 1997, 76(6), s. 302-305.
16. Hanuš, T., Jarolím, L., Petřík, R., et al. Vesikovaginální a uretrovaginální píštěle. *Rozhl Chir* 1997, 76(6), s. 306-309.
17. Hoffman, MS. Extent of radical hysterectomy: evolving emphasis. *Gynec Oncol* 2004, 94, p. 1.
18. Horning, KM., Guhde, J. Lymphedema: an under-treated problem. *Medsurg Nurs* 2007, 16 (4), p. 221-227.
19. Ju, XZ., Li, ZT., Yang, HJ., et al. Nerve-sparing radical hysterectomy and radical hysterectomy: a retrospective study. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 2009, 44(8), p. 605-609.
20. Kim, JH., Kim, HJ., Hong, S., et al. Post-hysterectomy radiotherapy in FIGO stage IB-IBB uterine cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* 2005, 96, p. 407-414.
21. Kim, SJ., Park, YD. Effects of complex decongestive physiotherapy on the oedema and the quality of live of lower unilateral lymphoedema following treatment for gynaecological cancer. *Eur J Cancer Care* 2008, 17(5), p. 463-468.
22. Mehra, G., Weekes, A., Vantrappen, P., et al. Laparoscopic assisted radical vaginal hysterectomy for cervical carcinoma: Morbidity and long-term follow-up. *Eur J Surg Oncol* 2010, 36(3), p. 304-308.
23. Moore, RG., Robison, K., Brown, AK., et al. Isolated sentinel node dissection with conservative management in patients with squamous cell carcinoma of the vulva: A prospective trial. *Gynecol Oncol* 2008, 109 (1), p. 65-70.
24. Nováčková, M., Halaška, M., Chmel, R., et al. Lymfédémy dolních končetin po chirurgické léčbě gynekologických nádorů. *Gynekolog* 2009, 18(6), s. 208-211.
25. Ogawa, D., Shikata, K., Matsuda, M., et al. Pelvic lymphocyst infection associated with maternally inherited diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2003, 61(2), p. 137-141.
26. Piver, MS., et al. Five classes of extended hysterectomy for women with cervical cancer. *Obstet Gynec* 1974, 44, p. 265.
27. Recio, F., Ghamande, S., Hempling, R., et al. Effective management of pelvic lymphocysts by laparoscopic marsupialization. *JSL* 1999, 3(2), p. 97-102.
28. Ryan, M., Stainton, MC., Slaytor, EK., et al. Aetiology and prevalence of lower limb lymphoedema following treatment for gynaecological cancer. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2003, 43, p. 148-151.
29. Sadmani, S., Lachmann, E., Nagler, W. Unilateral extremity swelling in female patients with cancer. *J Womens Health Gend Based Med* 2001, 10 (4), p. 319-326.
30. Tada, H., Teramukai, S., Fukushima, M., Sasaki, H. Risk factors for lower limb lymphedema after lymph node dissection in patients with ovarian and uterine carcinoma. *BMC Cancer* 2009, 9, p. 47.
31. Yan, X., Li, G., Slang, H., et al. Complications of laparoscopic radical hysterectomy and pelvic lymphadenectomy-experience of 117 patients. *Int J Gynecol Cancer* 2009, 19(5), p. 963-967.

MUDr. Luboš Minář
Gynekologicko-porodnická klinika
LF MU a FN Brno
Obilní trh 11
625 00 Brno
e-mail: lubosminar@seznam.cz

5.3.2. Felsingarová Z, Minář L, Weinberger V. Incidence a terapie lymfocyst po provedené pánevní a paraaortální lymfadenektomii - vlastní soubor. (2014). Česká Gynekologie, 79(5), pp. 388-392.

Incidence a terapie lymfocyst po provedené systematické pánevní a paraaortální lymfadenektomii – vlastní soubor

Incidence and therapy of lymphoceles after pelvic and paraaortic lymph node dissection – our file

Felsingerová Z., Minář L., Weinberger V.

Gynekologicko-porodnická klinika LF MU a FN, Brno, přednosta prof. MUDr. P. Ventruba, DrSc., MBA

ABSTRACT

Objective: Analysis of lymphocele's incidence and therapy among the patients, who underwent systematic pelvic and paraaortic lymphadenectomy during the years 2010–2012 in Oncogynecological centre of Department of Gynecology and Obstetrics in Brno.

Design: Retrospective study.

Setting: Department of Gynecology and Obstetrics, Masaryk University Hospital Brno.

Methods: We retrospectively evaluated the file of 111 patients, who underwent pelvic and/or paraaortic lymphadenectomy during the years 2010–2012 in our clinic. These patients were observed for the incidence of lymphoceles proved by ultrasonography. We focused on the incidence of symptomatic lymphoceles from all detected lymphoceles in the file of patients and we searched for relation between their presence and the type of systematic lymphadenectomy (pelvic or paraaortic) and the type of gynecological tumor and we report their management.

Results: During the years 2010–2012 we provided 111 lymphadenectomies consisting of: 78 pelvic and 33 pelvic and paraaortic lymphadenectomies in our clinic. These patients were rewied for retrospective study. We reported 37 cases of lymphoceles (33.3%) detected by vaginal or transabdominal ultrasonography. Among all patients with lymphoceles, we observed 24 asymptomatic patients and 13 patients with clinical features. There were 11.7% symptomatic lymphoceles from overall count.

Only these symptomatic patients underwent therapy including simple puncture or surgery management.

Among all patients with lymphoceles, we reported the presence of lymphoceles by 19 patients with ovarian cancer (51.4%), 12 patients with cancer of cervix (32.4%), 4 patients with cancer of uterus (10.8%), one patient with cancer of salpinx and one patient with cancer of peritoneum (both 2.7%). We did not register statistically important dependence of lymphocele's incidence on the type of lymphadenectomy (pelvic and/or paraaortic) – difference of 4.31%.

Conclusion: Asymptomatic lymphoceles do not represent such a risk for patients after lymphadenectomy such as lymphoceles with clinical symptoms, which need to be followed by therapy. We proved incidence of lymphoceles 33.3%. There were 11.7% symptomatic lymphoceles among all patients after systematic lymphadenectomy.

In the future, it is necessary to standardize the conditions, used to indicate systematic lymphadenectomy to ensure safety of the oncological procedure and at the same time not to increase postoperative morbidity of patients. Going forward the topic of lymphocele's prevention and detection of their valid risk and protective factors requires further prospective studies divided into single types of gynecological malignant tumors.

KEYWORDS

pelvic and paraaortic lymphadenectomy, lymphoceles, incidence

SOUHRN

Cíl studie: Analýza incidence a terapie lymfocyst v souboru pacientek, které podstoupily systematickou pánevní a paraaortální lymfadenektomii v Onkogynekologickém

centru Gynekologicko-porodnické kliniky v Brně v letech 2010–2012.

Typ studie: Retrospektivní studie.

Název a sídlo pracoviště: Onkogynekologické centrum, Gynekologicko-porodnická klinika LF MU a FN Brno.

Metodika a soubor: Hodnotíme retrospektivně soubor 111 operovaných pacientek, u kterých byla v letech 2010–2012 na naší Gynekologicko-porodnické klinice provedena pánevní a paraaortální lymfadenektomie. Zjišťujeme celkovou incidenci lymfocyst, které byly diagnostikovány na základě ultrazvukového vyšetření. Z celkového počtu lymfocyst pátráme po incidenci symptomatických lymfocyst a zjišťujeme, zda jejich incidence byla závislá na typu provedení systematické lymfadenektomie (pánevní a/nebo paraaortální), na typu gynekologického tumoru a jakým způsobem byly tyto symptomatické lymfocysty řešeny.

Výsledky: V letech 2010–2012 jsme provedli u 111 onkologických pacientek 78 pánevních a 33 pánevních a paraaortálních systematických lymfadenektomií. V souboru těchto pacientek jsme retrospektivně pátrali po incidenci lymfocyst. Lymfocysty byly detekovány pooperačně vaginálním či transabdominálním ultrazvukem (UZ) u 37 pacientek (33,3 %). Z celkového počtu 37 detekovaných lymfocyst bylo 24 lymfocyst klinicky asymptomatických a 13 symptomatických. Incidence symptomatické lymfocysty v našem souboru je 11,7 %. Prostou punkcí pod UZ kontrolou či chirurgicky jsme řešili pouze symptomatické lymfocysty. Z celkového počtu 37 lymfocyst jsme je pooperačně detekovali u 19 pacientek s karcinomem ovaria (51,4 %), u 12 pacientek s karcinomem hrdla dělo-

hy (32,4 %), u čtyř pacientek s karcinomem těla dělohy (10,8 %), u jedné pacientky s karcinomem vejcovodu a u jedné pacientky s karcinomem peritonea (obě 2,7 %). V našem souboru jsme nezaznamenali statisticky významnou závislost incidence lymfocysty na typu provedené (pánevní a/nebo paraaortální) lymfadenektomie.

Závěr: Asymptomatické lymfocysty po provedené lymfadenektomii nepředstavují pro pacientky takové riziko jako lymfocysty symptomatické, které vyžadují řešení. V našem souboru se pooperačně lymfocysta vyskytla s incidencí 33,3 %. Na celkový počet 111 pacientek, které podstoupily lymfadenektomii, jsme pozorovali 11,7 % symptomatických lymfocyst.

Do budoucna je zcela nutné standardizovat podmínky, za kterých je indikováno provedení systematické lymfadenektomie, abychom zachovali onkologickou bezpečnost chirurgického výkonu a zároveň dále zbytečně nezvyšovali pooperační morbiditu pacientek. Problematika prevence vzniku lymfocyst a detekce validních rizikových a protektivních faktorů jejich vzniku vyžaduje do budoucna prospektivní studie, které budou rozdělené dle jednotlivých typů gynekologických zhoubných nádorů.

KLÍČOVÁ SLOVA

pánevní a paraaortální lymfadenektomie, lymfocysty, incidence

Čes. Gynek., 2014, 79, č. 5, s. 388–392

ÚVOD

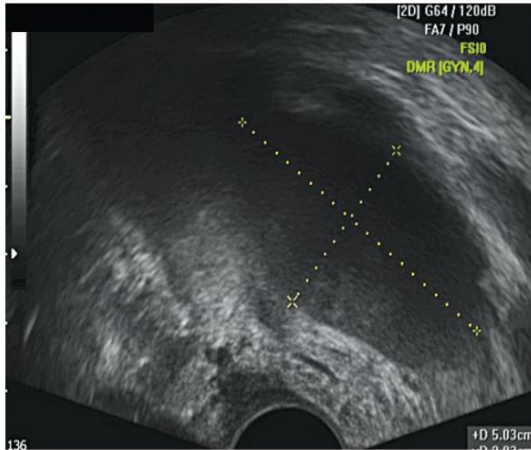
Lymfocysta či lymfokéla je cystická rezistence vznikající v retroperitoneu po provedené systematické pánevní a/nebo paraaortální lymfadenektomii. Lymfocysta je kolekce lymfy se silnou fibrotickou stěnou bez epiteliální výstelky. Patofyziologickým podkladem jejího vzniku je nekompletní lymfostáza s pooperačním únikem lymfy v tak velkém množství, že není možná její zpětná resorpce peritoneem. V lymfatických cévách není dostatek buněk hladké svaloviny, což brání jejich vazokonstrikci a lymfa obsahuje jen minimální množství trombocytů a koagulačních faktorů. Díky kombinaci těchto faktorů se lymfa hromadí v retroperitoneálním prostoru a může dojít ke zformování lymfocysty [15]. Většina lymfocyst je asymptomatických a jsou náhodným nálezem při pooperační kontrole (obr. 1, obr. 2).

Incidence lymfocyst po onkogynekologických výkonech s lymfadenektomií se pohybuje v širokém rozmezí 1–58 % [2, 9]. Medián jejich výskytu je zhruba 3 až 8 týdnů po operaci, někdy se mohou objevit až za jeden rok po operaci. Symptomatické lymfocysty vykazují incidenci

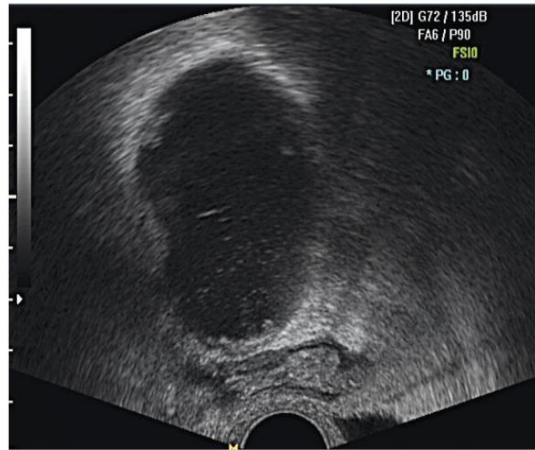
5–34,5 % [6]. Symptomy závisí na velikosti a útlaku okolních anatomických struktur. Lymfocysty mohou nejčastěji způsobovat bolest, sekundárně se infikovat, vést k tvorbě otoků dolních končetin, vzniku hluboké žilní trombózy, utlačovat močový měchýř a způsobovat obstrukci ureterů [7, 14].

METODIKA

Do této retrospektivní studie bylo konsekutivně zařazeno celkem 111 pacientek s pooperačním nálezem lymfocysty, které v letech 2010–2012 podstoupily v rámci radikálního onkogynekologického operačního výkonu systematickou pánevní či aortopelvickou lymfadenektomii bez uzavření peritonea nad operovanou oblastí. V souboru zjišťujeme incidenci symptomatických i asymptomatických lymfocyst, které byly diagnostikovány pomocí ultrazvuku. Ve skupině symptomatických lymfocyst sledujeme způsob a efektivitu jejich terapie. Popisujeme incidenci lymfocyst pooperačně v závislosti na typu gynekologického zhoubného nádoru a hodnotíme, zda přidání paraaortální lymfadenektomie statisticky významně zvyšuje



Obr. 1 UZ obraz unilokulární „ground glas“ lymfocysty v oblasti levé fossa obturatoria



Obr. 2 UZ obraz unilokulární hypoechogenní lymfocysty s debrisi

incidenci pooperační lymfocysty oproti samostatně provedené pánevní lymfadenektomii. Analýza byla prováděna na hladině významnosti 0,05.

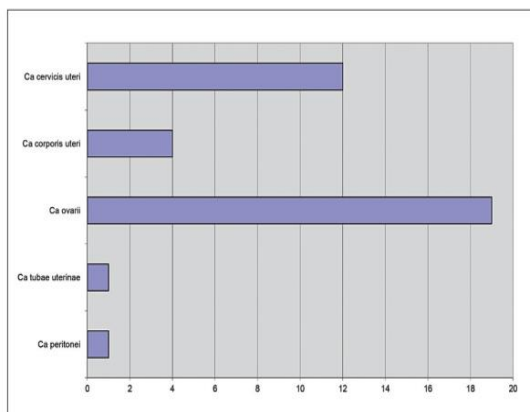
VÝSLEDKY

V letech 2010–2012 jsme provedli celkem 78 pánevních a 33 aortopelvických lymfadenektomií. V souboru 111 pacientek s provedenou pánevní a/ nebo paraaortální lymfadenektomií jsme diagnostikovali pomocí UZ 37 lymfocyst, což odpovídá incidenci 33,3 %. Ze souboru 37 lymfocyst bylo 24 asymptomatických a 13 symptomatických. Incidence symptomatické lymfocysty je v našem souboru 11,7 %. Z celkového počtu 37 pacientek byl nejvyšší počet lymfocyst pooperačně pozorován u pacientek s karcinomem ovaria – celkem 19 (51,4 %), dále jsme lymfocystu detekovali u 12 pacientek s karcinomem hrdla dělohy (32,4 %), u čtyř pacientek s karcinomem dělohy (10,8 %), u jedné pacientky

s karcinomem peritonea a jedné pacientky s karcinomem vejcovodu (obě 2,7 %), (graf 1).

Zajímalo nás, jestli incidence lymfocyst je závislá na typu provedené systematické lymfadenektomie (pánevní a/ nebo paraaortální). U 78 pacientek po provedené samostatné pánevní lymfadenektomii jsme detekovali 25 lymfocyst (36,36 %), u 33 pacientek s provedenou aortopelvickou lymfadenektomií jsme diagnostikovali 12 lymfocyst (32,05 %). Podle statistického vyhodnocení je tento rozdíl 4,31 % signifikantně nevýznamný, $p = 0,6657$ (tab. 2).

Téměř všechny lymfocysty byly diagnostikovány do šesti měsíců po operaci (tab. 1). Jejich detekce byla buď náhodná při dispenzarizační kontrole, nebo při kontrole z důvodů potíží pacientky. V našem souboru jsme přistoupili k operačnímu řešení jen v případě symptomatické lymfocysty. U celkem 13 symptomatických pacientek jsme provedli 10 punkcí pod UZ kontrolou (77 %), ve dvou případech (15 %) jsme marsupializovali lymfocystu laparoskopicky a v jednom případě (8 %) laparotomicky. Zjistili jsme, že u 10 lymfocyst (10 pacientek) řešených jednoduchou punkcí, došlo v průběhu 4 týdnů v šesti případech k recidivě. V jednom případě recidivy byla nutná laparotomická marsupializaci lymfocysty, u ostatních pěti recidiv byl zvolen



Graf 1 Zastoupení jednotlivých malignit v souboru pacientek s detekovanou lymfocystou po provedené systematické lymfadenektomii

Tab. 1 Doba od operace, kdy byla lymfocysta poprvé detekována u všech pacientek po lymfadenektomii v našem souboru

	N	%
2 týdny	6	16,2
6 týdnů	4	10,8
3 měsíce	8	21,7
6 měsíců	16	43,2
9 měsíců	3	8,1
12 měsíců	0	0

Tab. 2 Rozdělení lymfocyst podle typu provedené lymfadenektomie

	pánevní		pánevní + paraaortální		celkem	P value
	N	%	N	%		
LYMFADENEKTOMIE	78	NS	33	NS	111	NS
Lymfocysta	25	32,05%	12	36,36%	37	0,6657

Rozdíl je 4,31 %, což dle Fisher exact test: $p=0.6657$

konzervativní postup a lymfocysta v průběhu tří měsíců vymizela.

DISKUSE

V poslední době jsou zkoumány jak rizikové, tak protektivní faktory vzniku lymfocyst. Jako potenciálně rizikový faktor vzniku lymfocyst je zvažován počet a pozitivita odstraněných lymfatických uzlin s předpokladem růstu incidence lymfocyst s růstem počtu a pozitivitu uzlin [11]. Mezi dalšími rizikovými faktory vzniku lymfocyst se zmiňují neoadjuvantní a adjuvantní chemoterapie a radiotherapie [8]. Některé studie zaznamenaly nejvyšší incidenci lymfocyst po operacích u zhoubných nádorů hrdla dělohy, nižší u ovariálních nádorů a nejnižší u nádorů těla děložního [8]. V našem souboru bylo nejvíce lymfocyst detekováno u pacientek po operaci pro karcinom ovaria.

Dalším diskutovaným rizikovým faktorem je vliv laparoskopického či laparotomického operačního přístupu. V dosud největším publikovaném souboru srovnávajícím oba operační přístupy je popsána signifikantně nižší incidence lymfocyst ve skupině operované laparoskopicky [5]. Na druhou stranu v recentní retrospektivní Achouriho práci nebyl shledán rozdíl v incidenci vzniku lymfocyst mezi laparoskopickým a laparotomickým přístupem (z celkového počtu 31 pacientek s lymfocystou bylo 11 operováno laparoskopicky a 20 laparotomicky; OR 0,61; 95% CI 0,25–1,52). Dále se diskutuje o vlivu BMI a miniheparinizace na vznik lymfocyst [1]. Žádný z výše uvedených rizikových faktorů ale nebyl dosud jednoznačně akceptován a potvrzen v dosud publikovaných studiích.

Prokázaným protektivním faktorem je operační technika, při které je ponecháno otevřené peritoneum nad operovanou oblastí retroperitonea při onkochirurgickém výkonu. Za další protektivní faktor se považuje ponechání otevřeného poševního pahýlu, omentoplastika nebo využití nových metod, jako je ultracision a ligaclip. Ligaclip může uzavřít lymfatické cévy selektivně, a zabránit tak lymforee v pooperačním období. Podle výsledků studie Galotta a kolektivu byla zjištěna nižší incidence lymfocyst ve skupině pacientek operovaných pomocí ligaclipu než ve skupině s bipolární koagulací [4]. Z farmakoterapie je zmiňována jako slibná

metoda pooperační aplikace oktreetidu. Preventivní drenáž za účelem snížení incidence lymfocyst po operaci se ukázala jako zcela neúčinná. Ve studii z let 1998–2000, která zkoumala vliv pooperační drenáže na tvorbu lymfocyst, se po 12 měsících od operace ukázala incidence symptomatické lymfocysty v rameni bez drénu 0,9 % a v rameni s drémem 5,9 %, což téměř dosáhlo statistické významnosti pro hypotézu, že drenáž retroperitonea naopak zvyšuje incidenci tvorby lymfocysty [3].

Zobrazovací metodou první volby v diagnostice lymfocyst je ultrazvuk. I v našem souboru jsme s výhodou kombinovali vaginální i abdominální přístup pro detailní zhodnocení retroperitonea. Lymfocysty nejčastěji obklopují externí ilické cévy nebo se nacházejí ve fossa obturatoria. Méně často jsou detekovány podél společných ilických cév a výše paraaortálně. V UZ obraze má lymfocysta (obr. 1, 2) tenkou stěnu a tekutý obsah různé echogenity. V případě zánětlivě změněné lymfocysty je patrný její nehomogenní nebo smíšený obsah a při zatlačení ultrazvukovou sondou bývá bolestivá. Další metodou zobrazení lymfocysty je CT vyšetření nebo magnetická rezonance malé pánve. Diferenciální diagnostika zahrnuje vyloučení urinomu, seromu, hematomu, abscesu a cystické recidivující neoplazie [6].

Lymfocysty bez klinických symptomů nevyžadují léčbu. U symptomatických lymfocyst jsme v našem souboru přistoupili aktivně k léčbě. Vždy se snažíme o co nejméně invazivní přístup. Perkutánní punkce a drenáž pod kontrolou UZ nebo CT je jednoduchá metoda, kterou lze kombinovat s aplikací sklerotizující látky, nejčastěji etanolu nebo betadine. Pouhá aspirace obsahu lymfocysty jehlou vykazuje nízkou úspěšnost, recidiva lymfocysty se uvádí v 80–90 %. I v našem souboru jsme zaznamenali recidivu lymfocysty po prosté punkci a odsátí v šesti případech z deseti, což znamená recidivu v 60 % případů. Klasickým chirurgickým řešením je otevřená břišní operace s marsupializací lymfocysty. Laparoskopicky provedená marsupializace lymfocysty má výhodu miniinvazivního výkonu, ale není ve všech případech technicky proveditelná vzhledem k adhezím v dutině břišní po předchozím radikálním onkochirurgickém výkonu. Podle velké retrospektivní studie Lucewicze a kol. byla zaznamenána mnohem menší recidiva po

laparoskopické intervenci v porovnání s otevřenou břišní operací nebo jednoduchou aspirací (8 % vs. 16 % vs. 59 %) [10]. Chirurgická léčba symptomatické lymfocysty v poslední době ustupuje do pozadí na úkor metod intervenční radiologie. V současnosti se klade důraz na včasnou prevenci lymfocyst.

Podle posledních pilotních studií jsou vyvíjeny nové metody, tzv. chirurgické zátky. Začíná se zkoušet kolagenová zátka připravená z koagulačních faktorů, která se jeví jako užitečná doplňková metoda redukce pooperační lymforey a prevence tvorby lymfocyst po systematické lymfadenektomii [12, 13].

ZÁVĚR

V našem souboru dosáhla celková incidence lymfocyst 33,3 %, což koresponduje s průměrnou incidencí popisovanou v literatuře. Nejvyšší výskyt lymfocyst jsme pozorovali pooperačně ve skupině pacientek s nádorem vaječníku. Rozšíření systematické pánevní lymfadenektomie o paraaortální oblast statisticky významně nezvyšovalo incidenci lymfocysty (tab. 2). Asymptomatické lymfocysty nepředstavují větší zdravotní riziko pro pacientky. Klinicky významné jsou především symptomatické lymfocysty, které vyžadují řešení. V předložené práci jsme pozorovali 11,7 % symptomatických lymfocyst na celkový počet 111 pacientek, které podstoupily lymfadenektomii. Do budoucna je nutné standardizovat podmínky, za kterých je indikováno provedení systematické lymfadenektomie, abychom zachovali onkologickou bezpečnost chirurgického výkonu a zároveň dále zbytečně nezvyšovali pooperační morbiditu pacientek. Problematika prevence vzniku lymfocyst a detekce validních rizikových a protektivních faktorů jejich vzniku vyžaduje do budoucna prospektivní studie rozdělené dle jednotlivých typů gynekologických zhoubných nádorů.

Práce vznikla za podpory MZ ČR – RVO (FNBr, 65269705).

LITERATURA

1. Achouri, A., Huchon, C., Bats, AS., et al. Complications of lymphadenectomy for gynecological cancer. *Eur J Surg Oncol*, 2013, 39(1), p. 81–88.
2. Benedetti-Panici, P., Maneschi, F., Cutillo, G., et al. A randomized study comparing retroperitoneal drainage with no drainage after lymphadenectomy in gynecologic malignancies. *Gynecol Oncol*, 1997, 65(3), p. 478–482.
3. Franchi, M., Trimbo, JB., Zanaboni, F., et al. Randomised trial of drains versus no drains following radical hysterectomy and pelvic lymph node dissection: A European Organisation for Research and Treatment of Cancer Group (EORTCC- GCG) study in 234 patients. *Eur J Cancer*, 2007, 43(8), p. 1265–1268.

4. Gallotta, V., Fanfani, F., Rossitto, C., et al. A randomized study comparing the use of the Ligaclip with bipolar energy to prevent lymphocele during laparoscopic pelvic lymphadenectomy for gynecologic cancer. *Am J Obstet Gynecol*, 2010, 203(5), 483, e481–e486
5. Ghezzi, F., Uccella, S., Cromi, A., et al. Lymphocele, lymphorrhoea, and lymphedema after laparoscopic and open endometrial cancer staging. *Ann Surg Oncol*, 2012, 19(1), p. 259–267.
6. Kim, HY., Kim, JW., Kim, SH., et al. An analysis of the risk factors and management of lymphocele after pelvic lymphadenectomy in patients with gynecologic malignancies. *Cancer Res Treatment*, 2004, 36(6), p. 377–383.
7. Ilancheran, A., Monaghan, JM. Pelvic lymphocyst – a 10 year experience. *Gynecol Oncol*, 1988, 29, p. 333–336.
8. Kim, HY., Kim, JW., Kim, SH., et al. An analysis of the risk factors and management of lymphocele after pelvic lymphadenectomy in patients with gynecologic malignancies. *Cancer Res Treatment: official journal of Korean Cancer Association* 2004, 36(6), p. 377–383.
9. Logmans, A., Kruyt, RH., De Bruin, HG., et al. Lymphedema and lymphocysts following lymphadenectomy may be prevented by omentoplasty: A pilot study. *Gynecol Oncol*, 1999, 75(3), p. 323–327.
10. Lucewicz, A., Wong, G., Lam, VW., et al. Management of primary symptomatic lymphocele after kidney transplantation: a systematic review. *Transplantation*, 2011, 92(6), p. 663–673.
11. Petru, E., Tamussino, K., Lahousen, M., et al. Pelvic and paraaortic lymphocysts after radical surgery because of cervical and ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol*, 1989, 161(4), p. 937–941.
12. Simonato [HYPERLINK „http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Simonato%20A%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=19762048“](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Simonato%20A%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=19762048) A, Varca V, Esposito M, Venzano F, Carmignani G. The use of a surgical patch in the prevention of lymphocele after extraperitoneal pelvic lymphadenectomy for prostate cancer: a randomized prospective pilot study. [HYPERLINK „http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19762048“](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19762048) *Urol* 2009, 182(5), p. 2285–2290.
13. Tinelli, A., Mynbaev, OA., Tsin, DA., et al. Lymphocele prevention after pelvic laparoscopic lymphadenectomy by a collagen patch coated with human coagulation factors: a matched case-control study. *Int J Gynecol Cancer*, 2013, 23(5), p. 956–963.
14. Varga, Z., Hegele, A., Olbert, P., et al. Laparoscopic peritoneal drainage of symptomatic lymphocele after pelvic lymph node dissection using methylene blue installation. *Urol Int*, 2006, 76, p. 335–338.
15. Weinberger, V., Zikán, M., Cibula, D. Lymphocele: prevalence and management in gynecological malignancies: Expert Rev Anticancer Ther, 2014, 3, p. 307–317.

korespondující autor
as. MUDr. Vít Weinberger
Onkogynekologické centrum
Gynekologicko-porodnická klinika FN a LF MUN
Obilní trh 11
602 00 Brno
e-mail: v.weinberger@email.cz

6. Závěry

Habilitační práce je tématicky rozdělena do tří základních kapitol. V první kapitole **“Nové sérové a molekulárně biologické nádorové markery a možnosti jejich využití v klinické praxi”** se autor zaměřil na potenciální přínos nových markerů (HE4, mikroRNA) v souvislosti s diagnózou a prognózou karcinomu endometria a vaječníku. V případě využití sérové hladiny HE4 v diferenciální diagnostice biologické povahy endometrálních lézí srovnává 150 benigních nálezů se 150 případy endometroidního histotypu karcinomu endometria a při srovnávací analýze s konvenčním markerem CA125 konstatuje statisticky signifikantní rozdíl ($p < 0,05$) pouze v případě HE4. Při cut-off 48,5 pmol/l byly při využití modelu dosažení maxima součtu senzitivity a specifity získány následující parametry - senzitivita 87,8%, specifita 56,6% a AUC 0,773. Při analýze využití HE4 ve stratifikaci low a high risk subtypu endometroidního histotypu karcinomu endometria prokazuje na souboru 115 pacientek HE4 lepší diferenciační schopnost ve srovnání s CA125. U modelu dosažení maxima součtu senzitivity a specifity vykazuje HE4 při cut-off 76,5 pmol/l pro diferenciaci těchto dvou skupin senzitivitu 72,4%, specifitu 75,4% a AUC 0,77 (v případě CA125 je senzitivita 62,7%, specifita 69,6% a AUC 0,701 při cut-off 24,0 IU/ml). Z tohoto pohledu představuje analýza sérové hladiny HE4 jednoduchý nástroj, který na základě doposud publikovaných studií může podpořit nález zobrazovacích metod a být nápomocný v rozhodování v souvislosti s individualizací diagnostického a léčebného plánu pacientek s patologií endometria. Na druhé straně dosud získané výsledky v současné době ještě nepredikují možnost zavedení HE4 jako zcela samostatného markeru do rutinní klinické praxe v této problematice.

V případě využití HE4 v diferenciální diagnostice biologické povahy ovariálních rezistencí se autor zaměřil na analýzu nového nádorového indexu, tzv. CPH-I. Ten představuje perspektivní alternativu k ROMA indexu již etablovanému v klinické praxi. Přínos této alternativy spočívá

v její jednodušší konstrukci na podkladě využití jednoduše dosažitelné proměnné, kterou je věk pacientky. Autorova práce byla ve spektru dosud publikovaných studií analyzujících možný klinický přínos tohoto nového indexu teprve třetí a její originalita spočívá v zařazení nejen epiteliálních karcinomů, ale i borderline tumorů a neepiteliálních ovariálních malignit. Analýza rezultovala v podobnou diskriminační schopnost obou indexů bez statisticky signifikantní difference ($p > 0,05$) v souboru celkem 267 pacientek. V diferenciaci benigních ovariálních tumorů od všech stádií borderline tumorů a ovariálních malignit (epiteliálních i neepiteliálních) vykázal ROMA senzitivitu 71% při specificitě 88% a CPH-I senzitivitu 69% při specificitě 85%. Při potvrzení těchto výsledků v dalších studiích je CPH-I jistě potenciálně využitelný jako jednodušší alternativa k ROMA, a to s výhodou zejména na základní úrovni lékařské péče.

Poslední část první kapitoly je věnována základnímu výzkumu týkajícímu se diagnostického a prognostického využití mikroRNA u karcinomu endometria a vaječníku, a to na podkladě detekce deregulace exprese mikroRNA v moči a ascitu. Při analýze mikroRNA v moči byla zjištěna signifikantně zvýšená exprese miR-92a v kombinaci se signifikantním snížením exprese miR-106b u ovariálního karcinomu, zatímco u karcinomu endometria byla kromě signifikantní down-regulace miR-106b detekována signifikantní up-regulace miR-21. Tyto typy mikroRNA by mohly být dobrými kandidáty inovativní diagnostiky určenými k dalším studiovým hodnocením. V souvislosti s užitím moče jako biologického materiálu pro analýzu exprese mikroRNA však vyvstávají další okolnosti generované publikačním výstupem, např. rozdíl v signifikanci výstupu deregulace exprese, která je vyjádřena pouze u supernatantu a nikoliv u exosomální močové frakce mikroRNA.

Při analýze několika stovek mikroRNA v ascitu, resp. peritoneální laváži od 26 pacientek s ovariálním karcinomem byla zjištěna signifikantně rozdílná exprese při srovnání s kontrolními vzorky plazmy od 34 zdravých postmenopauzálních žen u 153 subtypů mikroRNA. Další hodnocení se týkalo sedmi nápadně exprimovaných mikroRNA, kde diskriminační schopnost

vyjádřená pomocí AUC dosahovala parametrů 1,0 (miR-200a, miR-200c, miR-141, miR-429, miR-1290), 0,996 pro miR-200b a 0,885 pro miR-30a-5p. Analýza přežití rezultovala v závěry, že nízká exprese miR-200b je signifikantně spojena s delším celkovým přežitím (HR: 0,25, mean survival 44 months) ve srovnání s vysokou expresí miR-200b (HR: 4,04, mean survival 24 months). Z těchto závěrů vyplývá další potenciál zkoumání ascitem derivovaných mikroRNA jako diagnostického a prognostického markeru ovariálního karcinomu.

V druhé kapitole **“Radikální primární operační léčba vybraných gynekologických malignit (karcinom vaječníku a vulvy) a sekundární cytoredukční chirurgie karcinomu vaječníku”** věnuje autor pozornost profitu adekvátně radikálních operací u vybraných onkogynekologických diagnóz na podkladě analýz vlastních souborů pacientek operovaných v Onkogynekologickém centru FN Brno. Publikace věnovaná radikální operační léčbě spojené s provedením zadní modifikované supralevátorové exenterace u 35 primárně pokročilých karcinomů vaječníku s konkomitantní rektální invazí odráží learning curve autorova týmu a současně dokumentuje profit tohoto přístupu u adekvátně selektované kohorty pacientek. Autor dokumentuje přínos tohoto přístupu při dosažení makroskopicky nulového rezidua na konci operačního výkonu statisticky signifikantní diferencí v DFI ($p = 0,023$) mezi skupinami pacientek bez rezidua a s makroskopickým reziduem. V případě optimálního debulkingu (R0) je konstatován DFI 33,6 měsíců, v případě makroskopického rezidua do 0,25 cm (R1) je DFI 19,6 měsíců a u R2 (makroskopické reziduum 0,25 - 2,5 cm) dosahuje DFI pouze 14,3 měsíců.

Další směr zájmu autora se týká hodnocení benefitu sekundární cytoredukční operační léčby u pacientek s platina-senzitivní recidivou ovariálního karcinomu. Na souboru 62 recidivujících žen je dokladována životaschopnost tohoto přístupu při citlivé selekci pacientek vhodných ke kombinaci operační cytoredukce (s cílem optimálního debulkingu) a chemoterapie. Analýza výsledků přinesla statisticky signifikantní rozdíly mezi oběma skupinami týkající se jak DFS ($p = 0,010$), tak OS ($p = 0,007$). Ve skupině pacientek s kombinací léčebných modalit bylo

dosaženo DFS 49,8 měsíců a OS 54,0 měsíců, ve skupině nemocných léčených pouze chemoterapií byly parametry DFS a OS 16,6, resp. 26,2 měsíců.

Poslední část této kapitoly je věnována chirurgickému stagingu pacientek s invazivním dlaždicobuněčným karcinomem vulvy a zhodnocení prognostických faktorů lokální recidivy při volném resekcčním okraji při primární operaci. Hlavní důraz v analýze je koncován právě na vliv rozsahu volného resekcčního okraje při primárním výkonu, což je prognostický faktor zásadně ovlivnitelný onkogynekologem-operátorem. Zhodnocením souboru 47 pacientek byla konstatována statisticky signifikantní diference z hlediska rizika lokální rekurence mezi skupinami s volným resekcčním okrajem < 8 mm a ≥ 8 mm (HR: 4,91, $p = 0,003$).

Třetí kapitola **“Specifika a komplikace radikální operační léčby malignit gynekologických pánevních orgánů”** je členěna do tří částí. První část věnovaná výskytu malignit v reprodukčním období života ženy se zabývá možnostmi fertilitu zachovávající operační léčby u vybraných gynekologických malignit. Kromě souhrnné práce s kazuistickým sdělením věnované raritní, ale velice citlivé problematice ovariálních epiteliálních malignit v adolescentní populační skupině, je hlavní pozornost autora zaměřena na analýzu vlastního souboru pacientek. Je přiložen publikační výstup hodnotící onkologické, případně reprodukční a perinatologické výsledky 13 pacientek (9 s karcinomem ovaria a 4 s karcinomem děložního hrdla) léčených v období 2009-2013 a následně minimálně dva roky dispenzarizovaných v Onkogynekologickém centru FN Brno. V remisi zůstalo 12 pacientek, rekurencí byla postižena jedna žena s neepiteliální ovariální malignitou. Snahu o graviditu deklarovaly v tomto omezeném časovém období celkem 4 pacientky a bylo dosaženo šesti gravidit (u dvou pacientek s ovariálním a u čtyř s cervikálním karcinomem v anamnéze). Čtyři pacientky porodily, z nich jedna v termínu po operaci pro ovariální karcinom. V souladu s riziky pacientek po trachelektomii se v těchto třech případech jednalo dvakrát o předčasný porod ve 34., resp. 37. týdnu těhotenství a jednou o porod císařským řezem vzhledem k rigidnímu, projizvenému

děložnímu hrdlu. Prezentovaný soubor týkající se časově omezeného období je sice početně nevelký, nicméně jeho výsledky prokazují oprávněnost fertilitu zachovávajícího přístupu při splnění daných indikačních kritérií.

Další část kapitoly věnuje autor specifické problematice radikální onkogynekologické operativy, kterou je systematická retroperitoneální lymfadenektomie. Její rutinní zvládnutí v rozsahu pánve a dolního břicha je nezbytnou součástí praktické erudice nutné pro provedení kompletního chirurgického stagingu u většiny gynekologických malignit (s výjimkou karcinomů vulvy a distální části pochvy drénovaných do inguinofemorální oblasti). Svoje klinické zkušenosti doplněné vlastní obrazovou dokumentací prezentuje autor v souhrnné práci v českojazyčném recenzovaném časopise. Zaměřuje se na fyziologii cévní anatomie těchto oblastí, podává přehled nejčastějších abnormit a elementární nástin řešení poranění cévních struktur z pohledu onkogynekologa-operatéra.

Poslední část kapitoly je věnována operačním komplikacím radikálních onkogynekologických výkonů. Součástí publikačních aktivit věnovaných této problematice jsou kromě souhrnné práce publikované v českojazyčném recenzovaném časopise popisující základní dělení komplikací doplněné vlastní kazuistikou další dvě sdělení. První je součástí analýzy benefitu 35 primárních extendovaných cytoredukcí spojených se zadní modifikovanou supralevátorovou exenterací u pokročilých ovariálních karcinomů. Tento typ exenterace je vysoce efektivní metodou k dosažení optimálního debulkingu u lokálně pokročilých ovariálních karcinomů s přímou invazí rektosigmatu, na druhé straně však není možné opomíjet morbiditu asociovanou s tímto typem výkonu. Autor na základě Clavien-Dindo klasifikace konstatuje přítomnost operačních komplikací u 83% pacientek. Nejčastějším typem komplikací byly časné pooperační komplikace postihující 65,7% pacientek, mezi nimi dominoval klinicky vyjádřený anemický syndrom vyžadující aplikaci krevní transfuze. Mezi peroperačními komplikacemi postihujícími 31,4% pacientek dominovala závažná hemoragie definovaná krevní ztrátou přesahující 1500 ml.

Nejméně časté byly pozdní pooperační komplikace postihující 25% pacientek, mezi nimi byla dominantní přítomnost symptomatické lymfocysty. Závažné komplikace (III.-IV. stupně) se vyskytly u 37,7% pacientek, nebyl však zaznamenán žádný případ mortality asociované s operačním výkonem. Přestože výsledky reprezentují iniciální learning curve s jednoznačnou tendencí k redukci komplikací s počtem odoperovaných případů, je vzhledem k extrémní invazivitě tohoto přístupu nezbytné zdůraznit myšlenku individualizace léčebného plánu u každého z jednotlivých případů pokročilého ovariálního karcinomu s pravděpodobnou invazí rektosigmatu.

Druhé sdělení věnované problematice operačních komplikací radikální onkogynekologické operativy se týká specifické problematiky lymfatického ascitu a lymfocyst, která je vázána na provádění systematických retroperitoneálních lymfadenektomií. Autor je součástí týmu, který provedl analýzu 111 pacientek léčených v Onkogynekologickém centru FN Brno, které podstoupily v průběhu tří let v rámci chirurgického stagingu systematickou pelvickou nebo aortopelvickou lymfadenektomií v souvislosti s karcinomem děložního hrdla, endometria a vaječníku (vejcovodu, peritonea). Lymfocysta byla přítomna u třetiny, tedy u 37 pacientek. Procentuální zastoupení symptomatických lymfocyst v celém souboru bylo 11,7%, což odpovídá 13 pacientkám. Při statistickém zpracování nebyla zjištěna statisticky významná signifikance incidence lymfocysty ve vztahu k rozsahu provedené lymfadenektomie (pelvická vs. aortopelvická). Zásadní prevencí vzniku lymfocyst je ze současného pohledu ponechání otevřeného peritonea nad operovanou oblastí retroperitonea a klipování lymfatických kmenů.

7. Souhrn

Obsah habilitační práce je odrazem dlouhodobé systematické klinické praxe autora v oblasti onkogynekologie. Jeho zájem se dělí dvěma základními směry. Prvním je samotný počátek péče o pacientku s potenciálně zhoubným gynekologickým nádorem, a sice, jak přispět k přesnější stratifikaci pacientek vykazujících podezření na malignitu, a to už na základní úrovni lékařské péče; případně poskytnout informaci o prognóze pacientky s již diagnostikovanou malignitou při využití jednoduchého, dostatečně citlivého a ekonomicky efektivního nástroje. Tento nástroj představují např. biochemické nebo molekulárně biologické markery stanovitelné ze snadno dostupného biologického materiálu (např. z moče nebo krevního séra). Klinický význam nádorových markerů je jednou z nejdiskutovanějších otázek odborníků, kteří se touto problematikou zabývají. Jejich stanoviska jsou nekonsenzuální od úplného zatracení až k naprosto zásadnímu významu. Závěry, které poskytují původní práce autora, nekorespondují se žádnou z výše uvedených “extrémních” variant, ale potvrzují potenciální životaschopnost nových biochemických nádorových markerů a indexů pro klinickou praxi v rámci komplexního diagnostického algoritmu u analyzovaných typů malignit, tj. vaječníku a děložního těla. Pokračování ve výzkumu této problematiky se jeví racionální v souvislosti s novými skutečnostmi a možnostmi, které se objevují, např. v podobě využití mikroRNA v onkogynekologickém výzkumu. Výsledky a komparace dalších studií musí teprve prokázat jejich skutečný diagnostický potenciál s možností posunu ze základního výzkumu do aplikace v klinické praxi.

Druhý směr autorova zájmu podložený vlastní dlouhodobou klinickou praxí je radikální operační léčba vybraných gynekologických malignit a analýza jejího benefitu pro prognózu pacientek. Samotná kompetence v operačním managementu gynekologických zhoubných nádorů, který se vyznačuje řadou specifíků, prezentuje naprosto esenciální dovednost, kterou musí onkogynekolog

disponovat. Závěry původních prací autora týkající se primárních a platina-senzitivních recidivujících malignit vaječníku a primárních karcinomů zevních rodidel dokladují, že adekvátní radikalita operace je vysoce účinným nástrojem, který umožňuje zlepšení prognózy nemocných, a to i přes současný multimodální pohled na onkologickou problematiku a dynamický rozvoj cílené léčby. Na druhou stranu však nelze opomíjet s radikalitou asociovanou morbiditu. I tato skutečnost je autorem respektována a v analyzovaných souborech je kladen důraz na myšlenku racionální selekce pacientek pro tyto typy operačních výkonů s respektováním trendu individualizace přístupu, tj. stanovení optimálního rozsahu a radikality operace u každé pacientky na základě zhodnocení souboru prognostických faktorů. Žádoucím výsledkem je maximalizace efektu dlouhodobého přežívání pacientek při zachování dostatečné kvality života.

8. Summary

The content of the habilitation thesis reflects author's long-term systematic clinical practice in the field of oncogynecology. His interest is divided into two basic aims. The first one is the beginning of the care of a patient with a potentially malignant gynecological tumor, namely, how to contribute to more precise stratification of patients with suspected malignancy at the basic level of medical care; or to provide information about the prognosis of a patient with already diagnosed malignancy using a simple, sufficiently sensitive and cost-effective tool. This tool can be presented, for example, by a biochemical or molecular biology marker determined from readily available biological material (e.g., from urine or blood serum). The clinical significance of tumor markers is one of the most discussed questions of experts dealing with these issues. Their opinions are non-consensual, from total damnation to absolutely essential support of this tool. Conclusions which are provided by the author's original works do not correspond to any of the above-mentioned "extreme" variants but confirm the potential viability of new biochemical tumor markers and indexes for clinical practice within the comprehensive diagnostic algorithm for the analyzed types of malignancies, ie. ovarian and endometrial cancer. The continuation in researching this issue seems to be rational in the context of new facts and opportunities that are emerging, e.g. in the form of using microRNA in oncogynecological research. The results and comparisons of other studies will have to demonstrate their real diagnostic potential, with the possibility of shifting from basic research into clinical practice.

The second aim of the author's interest, supported by his own long-term clinical practice, is the radical surgical treatment of selected gynecological malignancies and the analysis of its benefit for the prognosis of patients. The competence itself in surgical management of gynecological malignancies, which is characterized by a number of specifics, presents

the absolutely essential skill the oncogynecologist has to possess. The findings of the author's original works related to primary and platinum-sensitive recurrent ovarian malignancies and primary vulvar cancer show that the adequate radical surgery is a highly effective tool for improving patient prognosis, even with a current multimodal view of oncology and dynamic development of targeted treatment. On the other hand, it is not possible to ignore the morbidity associated with radical surgery. This fact is respected by the author and the emphasis is placed on the idea of rational selection of patients for these types of surgical procedures, while respecting the trend of individualization of the approach, i.e. the determination of the optimal extent of the radical surgery in each patient based on the evaluation of the set of prognostic factors. The desired result is to maximize the long-term survival effect of patients while maintaining adequate quality of life.

9. Seznam zkratek

CA125 - Cancer (Carbohydrate) Antigen 125

HE4 - Human Epididymis Protein 4

miRNA - malé, proteiny nekódující regulační molekuly RNA

ROMA - Risk of Ovarian Malignancy Algorithm

CPH-I - Copenhagen Index

FIGO - International Federation of Gynecology and Obstetrics

PET - Positron Emission Tomography

MR - Magnetic Resonance Imaging

CT - Computer Tomography

PDS - Primary Debulking Surgery

IDS - Interval Debulking Surgery

DFI - Disease Free Interval

OS - Overall Survival


PFI - Platinum Free Interval

AUC - Area under Curve

HR - Hazard Ratio

R - Residual Disease

10. Práce autora zařazené do textu

1. **Minar L**, Klabenesova I, Jandakova E, Zlamal F, Bienertova-Vasku J. Prognostic value of human epididymis protein 4 in endometrial cancer and its utility for surgical staging. (2015). *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 41(10), pp. 1644-1652.
2. **Minar L**, Klabenesova I, Jandakova E, Zlamal F, Bienertova-Vasku J. Is human epididymis protein 4 an effective tool for the differential diagnosis of benign and malignant endometrial tumours? (2016). *European Journal of Gynaecological Oncology*, 37(5), pp. 617-622.
3. **Minar L**, Felsinger M, Cermakova Z, Zlamal F, Bienertova-Vasku J. Comparison of the Copenhagen Index vs ROMA for the preoperative assessment of women with ovarian tumors. (2018). *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 140(2), pp. 241-246.
4. Zavesky L, Jandakova E, Turyna R, Langmeierova L, Weinberger V, **Minar L**. Supernatant versus exosomal urinary microRNAs. Two fractions with different outcomes in gynaecological cancers. (2016). *Neoplasma*, 63(1), pp. 621-632.
5. Zavesky L, Jandakova E, Weinberger V, **Minar L**, Hanzikova V, Duskova D, Zaveska Drabkova L, Svobodova I, Horinek A. Ascites-derived extracellular microRNAs as potential biomarkers for ovarian cancer. *Reproductive Sciences*, 2018. <http://doi:10.1177/1933719118776808>.
6. **Minar L**, Felsinger M, Rovny I, Zlamal F, Bienertova-Vasku J, Jandakova E. Modified posterior pelvic exenteration for advanced ovarian malignancies: a single-institution study of 35 cases. (2017). *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 96 (9), pp. 1136-1143.
7. Felsinger M, **Minar L** , Weinberger V, Rovny I, Zlamal F, Bienertova-Vasku J. Secondary cytoreductive surgery - viable treatment option in the management of platinum-sensitive recurrent ovarian cancer. (2018). *European Journal of Obstetrics, Gynecology & Reproductive Biology*, 228, pp. 154-160.

8. **Minar L**, Felsing M, Cihalova M, Zlamal F, Bienertova-Vasku J. Vulvar cancer recurrence- an analysis of prognostic factors in tumor-free pathological margins patients group. (2018). *Ginekologia Polska*, 89(8), pp. 351-358.
9. Felsing M, **Minář L**, Weinberger V, Hudeček R. Radikální fertilitu zachovávající operační výkony u gynekologických malignit - pětiletý soubor. (2015). *Česká Gynekologie*, 80(5), pp. 339-344.
10. **Minář L**, Felsingrová Z, Jandáková E. Ovariální epiteliální malignity v adolescentním věku. (2014). *Česká Gynekologie*, 79(2), pp. 98-102.
11. **Minář L**, Weinberger V, Felsing M. Cévní anatomie aortopelvického retroperitonea a její abnormality v souvislosti s radikální onkogynekologickou operativou - vlastní zkušenosti. (2017). *Česká Gynekologie*, 82(2), pp. 100-107.
12. **Minář L**, Weinberger V, Kysela P. Komplikace radikálních onkogynekologických operací. (2010). *Česká Gynekologie*, 75(4), pp. 346-352.
13. Felsingrová Z, **Minář L**, Weinberger V. Incidence a terapie lymfocyst po provedené pánevní a paraaortální lymfadenektomii - vlastní soubor. (2014). *Česká Gynekologie*, 79(5), pp. 388-392.

11. Literatura

(v komentářích k publikovaným pracím autora)

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018 Sep 12. doi: 10.3322/caac.21492. [Epub ahead of print].
2. Dušek L, Mužík J, Kubásek M, Koptíková J, Žaloudík J, Vyzula R. *Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice* [online]. Masarykova univerzita, [2005], [cit. 2018-10-20]. Dostupný z www: <http://www.svod.cz>.
3. Masák L. Sérové nádorové markery In: Cibula D, Petruželka L, et al. *Onkogynekologie*. Praha, Czechia: Grada Publishing; 2009: 132-141.
4. Adam Z, Vorlíček J, Vaniček J, et al. *Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob*. Praha, Czechia: Grada Publishing; 2004: 231-235.
5. Bouchard D, Morriset D, Bourbonnais Y, Tremblay GM. Proteins with whey-acidic-protein motifs and cancer. *Lancet Oncol* 2006; 7(2): 167-174.
6. Kirchoff C, Habben I, Ivell R, Krull N. A major human epididymis-specific cDNA encodes a protein with sequence homology to extracellular proteinase inhibitors. *Biol Reprod* 1991; 45(2): 350-357.
7. Kirchoff C. Molecular characterization of epididymal proteins. *Rev Reprod* 1998; 3(2): 86-95.
8. Drapkin R, von Horsten HH, Lin Y, et al. Human epididymis protein 4 (HE4) is a secreted glycoprotein that is overexpressed by serous and endometrioid ovarian carcinomas. *Cancer Res* 2005; 65(6): 2162-2169.
9. Bignotti E, Ragnoli M, Zanotti L, et al. Diagnostic et prognostic impact of serum HE4 detection in endometrial carcinoma patients. *Br J Cancer* 2011; 104(9): 1418-1425.

10. Galgano MT, Hampton GM, Frierson HF jr. Comprehensive analysis of HE4 expression in normal and malignant human tissues. *Mod Pathol* 2006; 19(6): 847-853.
11. Záveský L, Jandáková E, Turyna R, Langmeierová L, Weinberger V, Minář L. Cirkulující a extracelulární mikroRNA jako nové potenciální diagnostické markery pro gynekologické malignity. *Prakt Gyn* 2014; 18(4): 275-280.
12. Iorio M, Croce C. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol Med* 2012; 4(3): 143-159.
13. Weber JA, Baxter DH, Zhang SL, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem* 2010; 56(11): 1733-1741.
14. Sladkevicius P, Opolskiene G, Valentin L. Prospective temporal validation of mathematical models to calculate risk of endometrial malignancy in patients with postmenopausal bleeding. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2017; 49(5): 649-656.
15. Dueholm M, Möller C, Rydbjerg S, Hansen ES, Örtoft G. An ultrasound algorithm for identification of endometrial cancer. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2014; 43(5): 557-568.
16. Sladkevicius P, Installé A, Van den Bosch T, et al. International Endometrial Tumor Analysis (IETA) terminology in women with postmenopausal bleeding and sonographic endometrial thickness ≥ 4.5 mm: agreement and reliability study. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2017; 51(2): 259-268.
17. Desouki MM, Li Z, Hameed O, Fadare O. Intraoperative pathologic consultation on hysterectomy specimens for endometrial cancer: An assessment of the accuracy of frozen sections, "gross-only" evaluations, and obtaining random sections of a grossly "normal" endometrium. *Am J Clin Pathol* 2017; 148(4): 345-353.
18. Wang X, Li L, Cragun JM, Chambers SK, Hatch KD, Zheng W. Assessment of the role of intraoperative frozen section in guiding surgical staging for endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2016; 26(5): 918-923.

19. Stephan JM, Hansen J, Samuelson M, et al. Intra-operative frozen section results reliably predict final pathology in endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2014; 133(3): 499-505.
20. Savelli L, Testa AC, Mabrouk M, et al. A prospective blinded comparison of the accuracy of transvaginal sonography and frozen section in the assessment of myometrial invasion in endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2012; 124(3): 549-552.
21. Epstein E, Fischerova D, Valentin L, et al. Ultrasound characteristics of endometrial cancer as defined by International Endometrial Tumor Analysis (IETA) consensus nomenclature: prospective multicenter study. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2018; 51(6): 818-828.
22. Frühauf F, Zikan M, Semeradova I, et al. The diagnostic accuracy of ultrasound in assessment of myometrial invasion in endometrial cancer: subjective assessment versus objective techniques. *Biomed Res Int* 2017. doi: 10.1155/2017/1318203. [Epub 2017 Jul 24].
23. Epstein E, Blomqvist L. Imaging in endometrial cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2014; 28(5): 721-739.
24. Timmerman D, Van Calster B, Testa A, et al. Predicting the risk of malignancy in adnexal masses based on the simple rules from the International Ovarian Tumor Analysis group. *Am J Obstet Gynecol* 2016; 214(4): 424-437.
25. Daemen A, Valentin L, Fruscio R, et al. Improving the preoperative classification of adnexal masses as benign or malignant by second-stage tests. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2011; 37(1): 100-106.
26. Sayasneh A, Kaijser J, Preisler J, et al. Accuracy of ultrasonography performed by examiners with varied training and experience in predicting specific pathology of adnexal masses. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2015; 45(5): 605-612.
27. Montagnana M, Benati M, Danese E. Circulating biomarkers in epithelial ovarian cancer diagnosis: from present to future perspective. *Ann Transl Med* 2017; 5(13): 276.

28. Duffy MJ, Bonfrer JM, Kulpa J, et al. CA 125 in ovarian cancer: European Group on Tumour Markers guidelines for clinical use. *Int J Gynecol Cancer* 2005; 15(5): 679-691.
29. Moore RG, McMeekin DS, Brown AK, et al. A novel multiple marker bioassay utilizing HE4 and CA 125 for the prediction of ovarian cancer in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol* 2009; 112(1): 40-46.
30. Escudero JM, Auge JM, Filella X, Torne A, Pahisa F, Molina R. Comparison of serum human epididymis protein 4 with cancer antigen 125 as a tumor marker in patients with malignant and nonmalignant diseases. *Clin Chem* 2011; 57(11): 1534-1544.
31. Scaletta G, Plotti F, Luvero D, et al. The role of novel biomarker HE4 in the diagnosis, prognosis and follow-up of ovarian cancer: a systematic review. *Expert Rev Anticancer Ther* 2017; 17(9): 827-839.
32. McKinnon B, Mueller MD, Nirgianakis K, Bersinger NA. Comparison of ovarian cancer markers in endometriosis favours HE4 over CA125. *Mol Med Rep* 2015; 12(4): 5179-5184.
33. Nagy B Jr, Krasznai ZT, Balla H, et al. Elevated human epididymis protein 4 concentrations in chronic kidney disease. *Ann Clin Biochem* 2012; 49(4): 377-380.
34. Moore RG, Jabre-Raughley M, Brown AK, et al. Comparison of a novel multiple marker assay vs the Risk of Malignancy Index for the prediction of epithelial ovarian cancer in patients with a pelvic mass. *Am J Obstet Gynecol* 2010; 203(3): 228.e1-6.
35. Yanaranop M, Anakrat V, Siricharoenthai S, Nakrangsee S, Thinkhamrop B. Is the Risk of Ovarian Malignancy Algorithm better than other tests for predicting ovarian malignancy in women with pelvic masses? *Gynecol Obstet Invest* 2017; 82(1): 47-53.
36. Dayyani F, Uhlig S, Colson B, et al. Diagnostic performance of Risk of Ovarian Malignancy Algorithm against CA125 and HE4 in connection with ovarian cancer: A meta-analysis. *Int J Gynecol Cancer* 2016; 26(9): 1586-1593.

37. Karlsen MA, Högdall EV, Christensen IJ, et al. A novel diagnostic index combining HE4, CA125 and age may improve triage of women with suspected ovarian cancer - An international multicenter study in women with an ovarian mass. *Gynecol Oncol* 2015; 138(3): 640-646.
38. Hausler SFM, Keller A, Chandran PA, et al. Whole blood-derived miRNA profiles as potential new tools for ovarian cancer screening. *Br J Cancer* 2010; 103(5): 693-700.
39. Halvorsen AR, Kristensen G, Embleton A, et al. Evaluation of prognostic and predictive significance of circulating microRNAs in ovarian cancer patients. *Dis Markers* 2017: 3098542. doi: 10.1155/2017/3098542. [Epub 2017 Feb 15].
40. Turchinovich A, Weiz L, Burwinkel B. Extracellular miRNAs: The mystery of their origin and function. *Trends Biochem Sci* 2012; 37(11): 460-465.
41. Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2008; 110(1): 13-21.
42. Pospichalova V, Svoboda J, Zankruti D, et al. Simplified protocol for flow cytometry analysis of fluorescently labeled exosomes using dedicated flow cytometer. *Journal of Extracellular Vesicles* 2015, 4(4): 1-15.
43. Zavesky L, Jandakova E, Turyna R, et al. Evaluation of cell-free urine microRNAs expression for the use in diagnosis of ovarian and endometrial cancers. A pilot study. *Pathology & Oncology Research*, 2015, 21(4): 1027-1035.
44. Zavesky L, Jandakova E, Turyna R, et al. Cell-Free Urinary microRNAs expression in small-scale experiments. In: Dalmay T. (eds) *MicroRNA Detection and Target Identification. Methods in Molecular Biology*. New York: Humana Press; 2017, 1580: 99-106.
45. Gasparri ML, Casorelli A, Bardhi E, et al. Beyond circulating microRNA biomarkers: Urinary microRNAs in ovarian and breast cancer. *Tumour Biol* 2017; 39(5): 1-13.
46. Wei W, Li N, Sun Y, Li B, Xu L, Wu L. Clinical outcome and prognostic factors of patients with early stage epithelial ovarian cancer. *Oncotarget* 2017; 8(14): 23862-23870.

47. Puls LE, Duniho T, Hunter JE, Kryscio R, Blackhurst D, Gallion H. The prognostic implication of ascites in advanced-stage ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1996; 61(1): 109-112.
48. Cress RD, Bauer K, O'Malley CD, et al. Surgical staging of early stage epithelial ovarian cancer: results from the CDC-NPCR ovarian patterns of care study. *Gynecol Oncol* 2011; 121(1): 94-99.
49. Kommos S, Harter P, Traut A, et al. Compliance to consensus recommendations, surgeon's experience, and introduction of a quality assurance and management program: influence on therapy of early-stage ovarian carcinoma. *Int J Gynecol Cancer* 2009; 19(4): 787-793.
50. Chi DS, Eisenhauer EL, Zivanovic O, et al. Improved progression-free and overall survival in advanced ovarian cancer as a result of a change in surgical paradigm. *Gynecol Oncol* 2009; 114(1): 26-31.
51. Shroff R, Brooks RA, Zigelboim I, et al. The utility of peritoneal biopsy and omentectomy in the upstaging of apparent early ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2011; 21(7): 1208-1212.
52. Vergote I, Amant F, Kristensen G, Ehlen T, Reed NS, Casado A. Primary surgery or neoadjuvant chemotherapy followed by interval debulking surgery in advanced ovarian cancer. *Eur J Cancer* 2011; 47(Suppl 3): S88-92.
53. Oonk MHM, Planchamp F, Baldwin P, et al. European Society of Gynaecological Oncology guidelines for the management of patients with vulvar cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2017; 27(4): 832-837.
54. Cordeiro Vidal G, Babin G, Querleu D, Guyon F. Primary debulking surgery of the upper abdomen and the diaphragm, with a plasma device surgery system, for advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2017; 144(1): 223-224.
55. Butler-Manuel S, Lippiatt J, Madhuri TK. Interval debulking surgery following neoadjuvant chemotherapy for stage IVB ovarian cancer using neutral argon plasma (PlasmaJet™). *Gynecol Oncol* 2014; 135(3): 622-623.

56. Fagö-Olsen CL, Hogdall C, Kehlet H, Christensen IJ, Ottesen B. Centralized treatment of advanced stages of ovarian cancer improves survival: a nationwide Danish survey. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2011; 90(3): 273-279.
57. Carter J, Pather S, Nascimento M. Current status of ovarian cancer surgical management. Argument for centralisation of care in Australia. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2018; 58(4): 474-477.
58. Sinno AK, Li X, Thompson RE, Tanner EJ, et al. Trends and factors associated with radical cytoreductive surgery in the United States: A case for centralized care. *Gynecol Oncol* 2017; 145(3): 493-499.
59. Cibula D. Nádory ovaria In: Cibula D, Petruželka L, et al. *Onkogynekologie*. Praha, Czechia: Grada Publishing; 2009: 534-544.
60. Raspagliesi F, Bogani G, Ditto A, et al. Implementation of extensive cytoreduction resulted in improved survival outcomes for patients with newly diagnosed advanced-stage ovarian, tubal, and peritoneal cancers. *Ann Surg Oncol* 2017; 24(11): 3396-3405.
61. Angarita AM, Stone R, Temkin SM, Levinson K, Fader AN, Tanner EJ. The use of "optimal cytoreduction" nomenclature in ovarian cancer literature: Can we move toward a more optimal classification system? *Int J Gynecol Cancer* 2016; 26(8): 1421-1427.
62. Turnbull HL, Akrivos N, Wemyss-Holden S, et al. The impact of ultra-radical surgery in the management of patients with stage IIIC and IV epithelial ovarian, fallopian tube, and peritoneal cancer. *Arch Gynecol Obstet* 2017; 295(3): 681-687.
63. Eisenhauer EL, Abu-Rustum NR, Sonoda Y, et al. The addition of extensive upper abdominal surgery to achieve optimal cytoreduction improves survival in patients with stages IIIC–IV epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2006, 103(3): 1083-1090.

64. Elstrand MB, Sandstad B, Oksefjell H, Davidson B, Tropé CG. Prognostic significance of residual tumor in patients with epithelial ovarian carcinoma stage IV in a 20 year perspective. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2012; 91(3): 308-317.
65. Eng OS, Raoof M, Blakely AM, et al. A collaborative surgical approach to upper and lower abdominal cytoreductive surgery in ovarian cancer. *J Surg Oncol* 2018; 118(1): 121-126.
66. Queiroz MA, Kubik-Huch RA, Hauser N, et al. PET/MRI and PET/CT in advanced gynaecological tumours: initial experience and comparison. *Eur Radiol* 2015; 25(8): 2222-2230.
67. Khiewvan B, Torigian DA, Emamzadehfard S, et al. An update on the role of PET/CT and PET/MRI in ovarian cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2017; 44(6): 1079-1091.
68. Kasper SM, Dueholm M, Marinovskij E, Blaakær J. Imaging diagnostics in ovarian cancer: magnetic resonance imaging and a scoring system guiding choice of primary treatment. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2017Mar; 210: 83-89.
69. El-Agwany AS. Laparoscopy and computed tomography imaging in advanced ovarian tumors: a roadmap for prediction of optimal cytoreductive surgery. *Gynecol Minim Invasive Ther* 2018; 7(2): 66-69.
70. Fagotti A, Ferrandina G, Fanfani F, et al. A laparoscopy-based score to predict surgical outcome in patients with advanced ovarian carcinoma: a pilot study. *Ann Surg Oncol* 2006; 13(8): 1156-1161.
71. Gómez-Hidalgo NR, Martinez-Cannon BA, Nick AM, et al. Predictors of optimal cytoreduction in patients with newly diagnosed advanced-stage epithelial ovarian cancer: Time to incorporate laparoscopic assessment into the standard of care. *Gynecol Oncol* 2015; 137(3): 553-558.
72. Vergote I, Tropé CG, Amant F, et al. Neoadjuvant chemotherapy or primary surgery in stage IIIc or IV ovarian cancer. *N Engl J Med* 2010; 363(10): 943-953.

73. Lee YJ, Chung YS, Lee JY, et al. Impact of increased utilization of neoadjuvant chemotherapy on survival in patients with advanced ovarian cancer: experience from a comprehensive cancer center. *J Gynecol Oncol* 2018; 29(4): e63.
74. Sioulas VD, Schiavone MB, Kadouri D, et al. Optimal primary management of bulky stage IIIC ovarian, fallopian tube and peritoneal carcinoma: Are the only options complete gross resection at primary debulking surgery or neoadjuvant chemotherapy? *Gynecol Oncol* 2017; 145(1): 15-20.
75. Singh K, Balega J, Chan KK. A statement for extensive primary cytoreductive surgery in advanced ovarian cancer. *BJOG* 2009; 116(6): 865.
76. Fotopoulou C, Jones BP, Savvatis K, et al. Maximal effort cytoreductive surgery for disseminated ovarian cancer in a UK setting: challenges and possibilities. *Arch Gynecol Obstet* 2016; 294(3): 607-614.
77. Chang SJ, Bristow RE. Surgical technique of en bloc pelvic resection for advanced ovarian cancer. *J Gynecol Oncol* 2015; 26(2): e155.
78. Ren Y, Jiang R, Yin S, et al. Radical surgery versus standard surgery for primary cytoreduction of bulky stage IIIC and IV ovarian cancer: an observational study. *BMC Cancer* 2015; 15: 583.
79. Lim MC, Yoo HJ, Song YJ, et al. Survival outcomes after extensive cytoreductive surgery and selective neoadjuvant chemotherapy according to institutional criteria in bulky stage IIIC and IV epithelial ovarian cancer. *J Gynecol Oncol* 2017; 28(4): e48.
80. Ferlay J, Soerjomataram I, Globocan Ervik M. 2012 v1.0, cancer incidence and mortality worldwide: IARC cancerBase No.11 [internet]. Available from: Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. (accessed October 20, 2018) <http://globocan.iarc.fr>.

81. Aghajanian C, Goff B, Nycum LR, Wang YV, Husain A, Blank SV. Final overall survival and safety analysis of OCEANS, a phase 3 trial of chemotherapy with or without bevacizumab in patients with platinum-sensitive recurrent ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2015; 139(1): 10-16.
82. Al Rawahi T, Lopes AD, Bristow RE, et al. Surgical cytoreduction for recurrent epithelial ovarian cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; 28: CD008765.
83. Giudice MT, D'Indinosante M, Cappuccio S, et al. Secondary cytoreduction in ovarian cancer: who really benefits? *Arch Gynecol Obstet*. 2018 Sep 25. doi: 10.1007/s00404-018-4915-1. [Epub ahead of print].
84. Amit A, Hodes A, Lavie O, Keidar Z, Matanes E, Lowenstein L. The role of F18-FDG PET/CT in predicting secondary optimal de-bulking in patients with recurrent ovarian cancer. *Surg Oncol* 2017; 26(4): 347-351.
85. Lee YJ, Kim YM, Jung PS, et al. Diagnostic value of integrated ¹⁸F-fluoro-2-deoxyglucose positron emission tomography/computed tomography in recurrent epithelial ovarian cancer: accuracy of patient selection for secondary cytoreduction in 134 patients. *J Gynecol Oncol* 2018; 29(3): e36.
86. Sawicki LM, Kirchner J, Grueneisen J, et al. Comparison of ¹⁸F-FDG PET/MRI and MRI alone for whole-body staging and potential impact on therapeutic management of women with suspected recurrent pelvic cancer: a follow-up study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2018; 45(4): 622-629.
87. Yang W, Cheng Z, Dai H, Long C, Liu H. Laparoscopic-based score assessment combined with a multiple disciplinary team in management of recurrent ovarian cancer: A single-center prospective study for personalized surgical therapy. *Medicine (Baltimore)* 2017; 96(30): e7440.
88. Fanfani F, Monterossi G, Fagotti A, et al. Positron emission tomography-laparoscopy based method in the prediction of complete cytoreduction in platinum-sensitive recurrent ovarian cancer. *Ann Surg Oncol* 2015; 22(2): 649-654.

89. Katsnelson M, Hwang WT, Tahirovic E, Rubin SC, Tanyi JL. Preoperative predictors that impact the survival and outcome of patients undergoing secondary cytoreduction for ovarian cancer. *J Obstet Gynaecol* 2018; 38(3): 395-401.
90. Bogani G, Tagliabue E, Signorelli M, et al. A score system for complete cytoreduction in selected recurrent ovarian cancer patients undergoing secondary cytoreductive surgery: predictors- and nomogram-based analyses. *J Gynecol Oncol* 2018; 29(3): e40.
91. Harter P, Beutel B, Alesina PF, et al. Prognostic and predictive value of the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie (AGO) score in surgery for recurrent ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2014; 132(3): 537-541.
92. Bommert M, Harter P, Heitz F, du Bois A. When should surgery be used for recurrent ovarian carcinoma? *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2018; 30(8): 493-497.
93. Sehouli J, Richter R, Braicu EI, et al. Role of secondary cytoreductive surgery in ovarian cancer relapse: who will benefit? A systematic analysis of 240 consecutive patients. *J Surg Oncol* 2010; 102(6): 656-662.
94. Bickell NA, Egorova N, Prasad-Hayes M, et al. Secondary surgery versus chemotherapy for recurrent ovarian cancer. *Am J Clin Oncol* 2018; 41(5): 458-464.
95. Plotti F, Scaletta G, Aloisi A, et al. Quality of life in platinum-sensitive recurrent ovarian cancer: chemotherapy versus surgery plus chemotherapy. *Ann Surg Oncol* 2015; 22(7): 2387-2394.
96. Brincat MR, Muscat Baron Y. Sentinel lymph node biopsy in the management of vulvar carcinoma: an evidence-based insight. *Int J Gynecol Cancer* 2017; 27(8): 1769-1773.
97. Rodríguez-Trujillo A, Fusté P, et al. Long-term oncological outcomes of patients with negative sentinel lymph node in vulvar cancer. Comparative study with conventional lymphadenectomy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2018 Jul 31. doi: 10.1111/aogs.13431. [Epub ahead of print].

98. Cham S, Chen L, Burke WM, et al. Utilization and outcomes of sentinel lymph node biopsy for vulvar cancer. *Obstet Gynecol* 2016; 128(4): 754-760.
99. Morely GW. Radical vulvectomy and bilateral superficial and deep groin and pelvic lymphadenectomy. Critique. *Clin Obstet Gynecol* 1975; 18(1): 29-30.
100. Hacker NF, Leuchter RS, Berek JS, Castaldo TW, Lagasse LD. Radical vulvectomy and bilateral inguinal lymphadenectomy through separate groin incisions. *Obstet Gynecol* 1981; 58(5): 574-579.
101. Rottmann M, Beck T, Burges A, et al. Trends in surgery and outcomes of squamous cell vulvar cancer patients over a 16-year period (1998-2013): a population-based analysis. *J Cancer Res Clin Oncol* 2016; 142(6): 1331-1341.
102. Vitale SG, Valenti G, Biondi A, Rossetti D, Frigerio L. Recent trends in surgical and reconstructive management of vulvar cancer: review of literature. *Updates Surg* 2015; 67(4): 367-371.
103. Micheletti L, Preti M, Cintolesi V, et al. Prognostic impact of reduced tumor-free margin distance on long-term survival in FIGO stage IB/II vulvar squamous cell carcinoma. *J Gynecol Oncol* 2018; 29(5): e61.
104. Dellinger TH, Hakim AA, Lee SJ, Wakabayashi MT, Morgan RJ, Han ES. Surgical management of vulvar cancer. *J Natl Compr Canc Netw* 2017; 15(1): 121-128.
105. Di Donato V, Bracchi C, Cigna E, et al. Vulvo-vaginal reconstruction after radical excision for treatment of vulvar cancer: Evaluation of feasibility and morbidity of different surgical techniques. *Surg Oncol* 2017; 26(4): 511-521.
106. Gentileschi S, Servillo M, Garganese G, et al. Surgical therapy of vulvar cancer: how to choose the correct reconstruction? *J Gynecol Oncol* 2016; 27(6): e60.

107. Aviki EM, Esselen KM, Barcia SM, et al. Does plastic surgical consultation improve the outcome of patients undergoing radical vulvectomy for squamous cell carcinoma of the vulva? *Gynecol Oncol* 2015; 137(1): 60-65.
108. Rockall AG, Qureshi M, Papadopoulou I, et al. Role of imaging in fertility-sparing treatment of gynecologic malignancies. *Radiographics* 2016; 36(7): 2214-2233.
109. Fruscio R, Ceppi L, Corso S, et al. Long-term results of fertility-sparing treatment compared with standard radical surgery for early-stage epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer* 2016; 115(6): 641-648.
110. Slama J, Cerny A, Dusek L, et al. Results of less radical fertility-sparing procedures with omitted parametrectomy for cervical cancer: 5years of experience. *Gynecol Oncol* 2016; 142(3): 401-404.
111. Ghezzi F, Cromi A, Fanfani F, et al. Laparoscopic fertility-sparing surgery for early ovarian epithelial cancer: A multi-institutional experience. *Gynecol Oncol* 2016; 141(3): 461-465.
112. Fastrez M, Houba C, Vandromme J, Rozenberg S. Fertility-sparing management of gynecological cancers. *Maturitas* 2015; 82(2): 141-145.
113. Ditto A, Martinelli F, Bogani G, et al. Long-term safety of fertility sparing surgery in early stage ovarian cancer: comparison to standard radical surgical procedures. *Gynecol Oncol* 2015; 138(1): 78-82.
114. Robova H, Rob L, Halaska MJ, Pluta M, Skapa P. Review of neoadjuvant chemotherapy and trachelectomy: which cervical cancer patients would be suitable for neoadjuvant chemotherapy followed by fertility-sparing surgery? *Curr Oncol Rep* 2015; 17(5): 446.
115. Tamauchi S, Kajiyama H, Sakata J, et al. Oncologic and obstetric outcomes of early stage cervical cancer with abdominal radical trachelectomy: Single-institution experience. *J Obstet Gynaecol Res* 2016; 42(12): 1796-1801.

116. Johansen G, Lönnerfors C, Falconer H, Persson J. Reproductive and oncologic outcome following robot-assisted laparoscopic radical trachelectomy for early stage cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2016; 141(1): 160-165.
117. Robova H, Halaska MJ, Pluta M, et al. Oncological and pregnancy outcomes after high-dose density neoadjuvant chemotherapy and fertility-sparing surgery in cervical cancer. *Gynecol Oncol* 2014; 135(2): 213-216.
118. Okugawa K, Kobayashi H, Sonoda K, et al. Oncologic and obstetric outcomes and complications during pregnancy after fertility-sparing abdominal trachelectomy for cervical cancer: a retrospective review. *Int J Clin Oncol* 2017; 22(2): 340-346.
119. Zivanovic O, Sheinfeld J, Abu-Rustum NR. Retroperitoneal lymph node dissection. *Gynecol Oncol* 2008; 111(2 Suppl): S66-69.
120. Ferraioli D, Chopin N, Beurrier F, Carrabin N, Buenerd A, Mathevet P. The incidence and clinical significance of the micrometastases in the sentinel lymph nodes during surgical staging for early endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2015; 25(4): 673-680.
121. Li X, Yin Y, Sheng X, Han X, Sun L, Lu C, Wang X. Distribution pattern of lymph node metastases and its implication in individualized radiotherapeutic clinical target volume delineation of regional lymph nodes in patients with stage IA to IIA cervical cancer. *Radiat Oncol* 2015; 10: 40.
122. Matsuo K, Machida H, Mariani A, et al. Adequate pelvic lymphadenectomy and survival of women with early-stage epithelial ovarian cancer. *J Gynecol Oncol* 2018; 29(5): e69.
123. Takei Y, Takahashi S, Machida S, et al. Impact of the number of removed lymph nodes on recurrence-free survival in stage I ovarian clear cell carcinoma. *Int J Clin Oncol* 2018; 23(5): 930-935.

124. Zhou J, Zhang WW, Zhang QH, et al. The effect of lymphadenectomy in advanced ovarian cancer according to residual tumor status: A population-based study. *Int J Surg* 2018; 52Apr: 11-15.
125. Eoh KJ, Yoon JW, Lee I, et al. The efficacy of systematic lymph node dissection in advanced epithelial ovarian cancer during interval debulking surgery performed after neoadjuvant chemotherapy. *J Surg Oncol* 2017; 116(3): 329-336.
126. Klemm P, Fröber R, Köhler C, Schneider A. Vascular anomalies in the paraaortic region diagnosed by laparoscopy in patients with gynaecologic malignancies. *Gynecol Oncol* 2005; 96(2): 278-282.
127. Kose MF, Turan T, Karasu Y, et al. Anomalies of major retroperitoneal vascular structure. *Int J Gynecol Cancer* 2011; 21(7): 1312-1319.
128. Lee YS, Lee JH, Choi JS, et al. Accessory polar renal artery encountered in transperitoneal systemic laparoscopic paraaortic lymphadenectomy. *Eur J Gynaecol Oncol* 2011; 32(1): 87-90.
129. Shindo S, Kubota K, Kojima A, et al. Anomalies of inferior vena cava and left renal vein: risks in aortic surgery. *Ann Vasc Surg* 2000; 14(4): 393-396.
130. Cibula D, Kesic V. Surgical education and training in gynecologic oncology I: European perspective. *Gynecol Oncol* 2009; 114(2 Suppl): S52-55.
131. Arora V, Somashekhar SP. Essential surgical skills for a gynecologic oncologist. *Int J Gynaecol Obstet* 2018; 143(Suppl 2):118-130.
132. Chiva LM, Mínguez J, Querleu D, Cibula D, du Bois A. European surgical education and training in gynecologic oncology: The impact of an accredited fellowship. *Int J Gynecol Cancer* 2017; 27(4): 819-825.
133. Swailes AL, Gockley A, Phaëton R, Kesterson JP. The Wertheim hysterectomy: Development, modifications, and impact in the present day. *Gynecol Oncol* 2017; 145(1): 3-8.

134. Vetter MH, Palettas M, Hade E, Fowler J, Salani R. Time to consider integration of a formal robotic-assisted surgical training program into obstetrics/gynecology residency curricula. *J Robot Surg* 2018; 12(3): 517-521.
135. Kyo S, Kato T, Nakayama K. Current concepts and practical techniques of nerve-sparing laparoscopic radical hysterectomy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2016Dec; 207: 80-88.
136. Bogani G, Rossetti DO, Ditto A, et al. Nerve-sparing approach improves outcomes of patients undergoing minimally invasive radical hysterectomy: A systematic review and meta-analysis. *J Minim Invasive Gynecol* 2018; 25(3): 402-410.
137. Raspagliesi F, Bogani G, Martinelli F, et al. Incorporating 3D laparoscopy for the management of locally advanced cervical cancer: a comparison with open surgery. *Tumori* 2016; 102(4): 393-397.
138. Kato K, Tate S, Nishikimi K, Shozu M. Bladder function after modified posterior exenteration for primary gynecological cancer. *Gynecol Oncol* 2013; 129(1): 229-233.
139. Ceccaroni M, Clarizia R, Roviglione G, Ruffo G. Neuro-anatomy of the posterior parametrium and surgical considerations for a nerve-sparing approach in radical pelvic surgery. *Surg Endosc* 2013; 27(11): 4386-4394.
140. Stewart KI, Fader AN. New developments in minimally invasive gynecologic oncology surgery. *Clin Obstet Gynecol* 2017; 60(2): 330-348.
141. Bogani G, Borghi C, Ditto A, et al. Impact of surgical route in influencing the risk of lymphatic complications after ovarian cancer staging. *J Minim Invasive Gynecol* 2017; 24(5): 739-746.
142. Park NY, Seong WJ, Chong GO, et al. The effect of nonperitonization and laparoscopic lymphadenectomy for minimizing the incidence of lymphocyst formation after radical hysterectomy for cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2010; 20(3): 443-448.

143. Neagoe OC, Ionica M, Mazilu O. The role of pelvic lymphocele in the development of early postoperative complications. *Medicine (Baltimore)* 2018; 97(37): e12353.
144. Stukan M, Leśniewski-Kmak K, Wróblewska M, Dudziak M. Management of symptomatic ascites and post-operative lymphocysts with an easy-to-use, patient-controlled, vascular catheter. *Gynecol Oncol* 2015; 136(3): 466-471.
145. Ma X, Wang Y, Fan A, et al. Risk factors, microbiology and management of infected lymphocyst after lymphadenectomy for gynecologic malignancies. *Arch Gynecol Obstet* 2018 Sep 29. doi: 10.1007/s00404-018-4914-2. [Epub ahead of print].