

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

**KATEDRA I KLINIKA GINEKOLOGII,
GINEKOLOGII ONKOLOGICZNEJ
I ENDOKRYNOLOGII GINEKOLOGICZNEJ**



Histokliniczna ocena częstości występowania mikroprzerzutów
w pozawartowniczych węzłach chłonnych w raku szyjki macicy w stopniu
zaawansowania klinicznego FIGO 1A2-1B1

Marcin Śniadecki

Promotor: dr hab. med. Dariusz Grzegorz Wydra

GDAŃSK 2017

Mojej Rodzinie, której tak wiele zawdzięczam

Spis treści

Spis treści.....	3
Wykaz skrótów	5
1. Streszczenie	6
Summary	11
2. Wprowadzenie	17
2.1. Epidemiologia raka szyjki macicy	17
2.2. Przebieg naturalny raka szyjki macicy	18
2.3. Zarys rozwoju koncepcji wykrywania wartowniczego węzła chłonnego w onkologii.....	19
2.4. Wartość biopsji wartowniczego węzła chłonnego w raku szyjki macicy	21
2.5. Rola mikroprzerzutów w węzłach chłonnych w raku szyjki macicy.....	23
2.6. <i>Ultrastaging</i> i jego kontekst kliniczny.....	25
2.7. Uzasadnienie podjęcia badań.....	27
3. Hipotezy badawcze	32
4. Uwagi anatomiczne i trudności związane z koncepcją wartowniczego węzła chłonnego.....	33
4.1. Drogi szerzenia się raka szyjki macicy	33
4.2. Spływ chłonny z szyjki macicy i nazewnictwo węzłów chłonnych	33
4.3. Przerzuty do regionalnych węzłów chłonnych	34
4.4. Przerzuty odległe	35
4.5. Metody znakowania węzłów chłonnych	36
5. Cele badań	38
6. Materiały i metody.....	39
6.1. Sposób doboru próby (grupa badana)	39
6.2. Technika wykrywania węzła chłonnego wartowniczego	40
6.3. Procedura opracowywania preparatów tkankowych	40
6.4. Analiza statystyczna.....	41
6.5. Sposób opisywania wyników w <i>ultrastagingu</i>	42
7. Wyniki	43
7.1. Charakterystyka ogólna pacjentek zakwalifikowanych do badania	43
7.2. Klasyfikacja przypadków klinicznych	44
7.3. Statystyka usuniętych węzłów chłonnych	46
7.4. Statystyka „zdarzeń” w węzłach chłonnych (makroprzerzuty, mikroprzerzuty, wyizolowane komórki nowotworu)	46
7.5. Analiza zależności przerzutów w węzłach chłonnych od czynników związanych z nowotworem.....	51

7.5.1.	Typ histologiczny nowotworu	51
7.5.2.	Stopień złośliwości histologicznej nowotworu (<i>grade</i>)	52
7.5.3.	Wielkość guza pierwotnego	53
7.5.4.	Głębokość naciekania raka	55
7.5.5.	Naciekanie okołonaczyniowej przestrzeni limfatycznej (<i>L/VI</i>)	58
7.6.	Analiza liczebności wykrytych węzłów chłonnych przy zastosowaniu koncepcji wartowniczego węzła chłonnego.....	59
7.7.	Analizy liczebności wykrytych węzłów chłonnych za pomocą różnych technik histopatologicznych.....	61
7.8.	Zmiany w ocenie zaawansowania choroby po zastosowaniu <i>ultrastagingu</i>	61
7.9.	Przewidywanie obecności przerzutów (makro i mikroprzerzutów) oraz wyizolowanych komórek nowotworu w węzłach chłonnych pozawartowniczych na podstawie informacji uzyskanych z badania węzłów chłonnych wartowniczych	63
7.10.	Synopsis raportowania wyników w <i>ultrastagingu</i>	64
8.	Dyskusja	67
9.	Wnioski.....	75
10.	Podziękowania	76
11.	Piśmiennictwo.....	77
12.	Wykaz tabel, rycin, wykresów i fotografii	84
	Wykaz tabel	84
	Wykaz rycin.....	86
	Wykaz wykresów.....	86
	Wykaz fotografii.....	87
Załącznik 1. Klasyfikacje zaawansowania raka szyjki macicy wg systemu <i>TNM</i> oraz <i>FIGO</i>		88

Wykaz skrótów

AGO	Niemiecka Grupa Robocza Onkologii Ginekologicznej (z niem. <i>Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie</i>)
AJCC/UICC	Amerykański Połączony Komitet ds. Raka / Międzynarodowa Unia do Zwalczenia Raka (z ang. <i>American Joint Committee on Cancer</i> / z fr. <i>Union Internationale Contre le Cancer</i>)
AUC	Pole pod krzywą <i>ROC</i> (z ang. <i>area under the curve</i>)
CIN	wewnątrznaślónkowe nowotworzenie szyjki macicy (z ang. <i>cervical intraepithelial neoplasia</i>)
CK	cytokeratyna
CK19	cytokeratyna 19 - transkrypty (<i>mRNA</i>)
CPD	choroba przedinwazyjna szyjki macicy (z ang. <i>cervical preinvasive disease</i>)
EBM	medycyna oparta na wiarygodnych dowodach naukowych (z ang. <i>evidence based medicine</i>)
FIGO	Międzynarodowa Federacja Ginekologii i Położnictwa (z fr. <i>Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique</i>)
HDI	indeks rozwoju ludzkiego (z ang. <i>human development index</i>)
HPV	wirus brodawczaka ludzkiego (z ang. <i>human papillomavirus</i>)
IHC	barwienie technikami immunohistochemicznymi (z ang. <i>immunohistochemistry</i>)
ITC	wyzolowane komórki nowotworu (z ang. <i>isolated tumor cells</i>)
KRN	Krajowy Rejestr Nowotworów
LVSI	naciekanie okołonaczyniowej przestrzeni limfatycznej (z ang. <i>lymphovascular space invasion</i>)
LVLND	choroba węzłowa o małej objętości (z ang. <i>low volume lymph node disease</i>)
MAC	makroprzerzut (z ang. <i>macrometastasis</i>)
MIC	mikroprzerzut (z ang. <i>micrometastasis</i>)
MLND	mikroprzerzutowa choroba węzłowa (z ang. <i>micrometastatic lymph node disease</i>)
NACT	neoadjuwantowa chemioterapia (z ang. <i>neoadjuvant chemotherapy</i>)
nSLN	pozawartowniczy węzeł chłónny (z ang. <i>non-sentinel lymph node</i>)
PET-FDG	pozytonowa emisyjna tomografia z fluorodeoksyglukozą
PRS	operacja według klasyfikacji Pivera-Rutledge-Smitha
puN0	stwierdzony za pomocą oceny histopatologicznej i w <i>ultrastagingu</i> brak przerzutów w węzłach chłónnych
puN1	stwierdzona za pomocą oceny histopatologicznej i w <i>ultrastagingu</i> obecność przerzutów w węzłach chłónnych
ROC	krzywa charakterystyczno-operacyjna odbiornika, krzywa <i>ROC</i> (z ang. <i>Receiver Operating Characteristic</i>)
RM	rezonans magnetyczny
RSZM	rak szyjki macicy
RT-PCR	Reakcja łańcuchowej polimerazy z odwrotną transkryptazą (z ang. <i>reverse transcriptase PCR</i>)
SCC-Ag	antygen raka płaskonabłónkowego szyjki macicy (z ang. <i>squamous cell carcinoma antigen</i>)
SIL	zmiana śródplaskonabłónkowa (z ang. <i>squamous intraepithelial lesion</i>)
SLN	węzeł chłónny wartowniczy (z ang. <i>sentinel lymph node</i>)
SLND	wykrywanie SLN (z ang. <i>sentinel lymph node detection</i>)
TK	tomografia komputerowa

1. Streszczenie

Wprowadzenie

Rak szyjki macicy (RSZM) jest drugim co do częstości nowotworem złośliwym u kobiet na świecie (po raku gruczołu piersiowego) i trzecim nowotworem złośliwym żeńskich narządów płciowych w Polsce wg danych Krajowego Rejestru Nowotworów (KRN). Na podstawie danych pochodzących z KRN można stwierdzić, że w ostatnich latach względna częstość rozpoznawania RSZM zmniejszyła się. Udział w tym należy przypisać Narodowemu Programowi Zwalczenia Chorób Nowotworowych, działającemu od 2005 r. Z powodu zwiększenia częstości zgłaszania do KRN stanów przedrakowych i wczesnego RSZM (ograniczonego do szyjki macicy) można przypuszczać, że w niedalekiej przyszłości u znacznie większej niż obecnie liczby kobiet będzie dochodzić do decyzji leczniczych, odnoszących się do zachowania płodności. Takie postępowanie opiera się o operacje oszczędzające, które wpływają na poprawę jakości życia przy zachowaniu zdrowia. „Oszczędność” dotyczy zarówno kwestii prokreacyjnych (zachowanie trzonu macicy lub także górnej części szyjki macicy), jak i zakresu operacji, nie wykraczającego poza minimum onkologiczne. Znaczna część tych decyzji leczniczych dotyczy węzłów chłonnych.

Często stosowane badania, obrazujące stan onkologiczny chorej, takie jak tomografia komputerowa (TK), rezonans magnetyczny (RM) czy (rzadziej) pozytonowa emisyjna tomografia z fluorodeoksyglukozą (PET-FDG) wykazują się dużą dokładnością w ocenie powiększonych węzłów chłonnych pod kątem obecności w nich przerzutów (rzędu 70-80% w zależności od rodzaju badania), ale mają ograniczoną przydatność w odniesieniu do węzłów chłonnych, które nie są powiększone. Te ostatnie mogą zawierać mikroprzerzuty (ogniska nowotworu do 2 mm) lub niewielkie makroprzerzuty (do 5 mm), które nie zostaną stwierdzone w badaniu obrazującym, a stanowią istotne zagrożenie dla chorej w przypadku ich pozostawienia bez adekwatnego leczenia.

Zagadnienie zakresu postępowania klinicznego ma duże znaczenie w odniesieniu do wczesnego RSZM (stadia zaawansowania IA2-IB1 wg klasyfikacji Międzynarodowej Federacji Ginekologii i Położnictwa, *Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique, FIGO*), w którym ryzyko przerzutów dla konkretnej chorej jest często trudne do oszacowania. Przerzuty mogą być wykrywane różnymi metodami histopatologicznymi, a wynik badania śródoperacyjnego usuwanych węzłów chłonnych może być fałszywie ujemny. Żaden z markerów histologicznych guza nie wskazuje również na to, w których węzłach chłonnych są przerzuty. Nie można także ich zbadać przedoperacyjnie za pomocą obecnie powszechnie dostępnych metod radiologicznych ani śród- czy pooperacyjnie używając rutynowych metod histopatologicznych.

Koncepcja węzła chłonnego wartowniczego (*SLN – sentinel lymph node*) w onkologii polega na wykrywaniu najbardziej prawdopodobnej drogi szerzenia się procesu chorobowego z pierwotnego guza nowotworowego, którego pierwszym

i najważniejszym etapem jest zajęcie węzła chłonnego wartowniczego i podążanie za związaną z nim drogą chłonną. Koncepcja ta została po raz pierwszy opisana przez Ernesta Goulda, który badał zagadnienie spływu chłonki w raku ślinianki. Wprowadzenie koncepcji *SLN* do powszechnego stosowania było oparte na dwóch założeniach: 1) wnikanie komórek nowotworowych do *SLN*, należącego do pierwszej „stacji” spływu chłonki, określa stan całego spływu węzłowego, 2) w przypadku braku zajęcia *SLN* przez komórki nowotworowe – rokowanie wiążące się z usunięciem *SLN* (jednego lub kilku węzłów chłonnych określonych tym mianem) nie różni się w sposób istotny od tego, które wiąże się z radykalnym usunięciem wszystkich regionalnych węzłów chłonnych.

Powodzenie koncepcji *SLN* uzyskano w przypadku nowotworów, w których dochodzi do przerzutów przede wszystkim drogą naczyń chłonnych. Wprowadzono ją do praktyki klinicznej w przypadkach czerniaka skóry, raka piersi i raka Merkla. Metoda wykrywania węzła chłonnego wartowniczego (*SLND*) znalazła uzasadnienie kliniczne również w innych chorobach nowotworowych (m.in. w raku sromu, RSZM, raku błony śluzowej trzonu macicy). Można uznać, że cechuje się ona ugruntowanymi korzyściami w przypadku RSZM (określa to klasa zaleceń IIa lub IIb według zasad *Evidence Based Medicine, EBM*, medycyny opartej na wiarygodnych dowodach naukowych). Zasadność stosowania koncepcji *SLN* w RSZM ma więc solidne podstawy naukowe i kliniczne.

W RSZM korzyści z realizacji tej koncepcji (bez względu na stadium zaawansowania) mogą płynąć ze zwiększenia dokładności oceny węzłów chłonnych (poprawienie dokładności wyniku klasyfikacji nowotworu pod względem rokowniczym – *staging*). Wynikają one z możliwości wykrycia najistotniejszych dróg chłonnych i następnie zbadania węzłów chłonnych w tych drogach. Kolejną zaletą takiego postępowania jest to, że daje ono precyzyjność postępowania – pozwala na bardziej właściwe zakwalifikowanie chorej do odpowiednich, dostępnych metod leczniczych. Trzecią istotną kwestią związaną z koncepcją *SLN* jest przeprowadzanie badań u kobiet, które w znacznym odsetku znajdują się w wieku reprodukcyjnym w czasie rozpoznania choroby nowotworowej. Niektóre z nich planują zajście w ciążę. Ustalenie stanu onkologicznego pacjentki z największą możliwą dokładnością oraz uniknięcie niepotrzebnego leczenia lub niewłaściwego zakresu leczenia są dwoma głównymi elementami opieki nad chorą z RSZM, którą daje koncepcja *SLN*.

Znaczący wkład w rozwój koncepcji *SLN* na polu ginekologii onkologicznej wnieśli polscy naukowcy. Głównymi celami badań były: ocena wykonalności wykrywania *SLN* i określenie potencjalnego zastosowania koncepcji *SLN* w RSZM i raku błony śluzowej trzonu macicy oraz operacji selektywnego usunięcia węzłów chłonnych w raku sromu. Badanie przeprowadzone w polskim ośrodku dotyczące RSZM, z którego również pochodzi niniejsza praca doktorska, wykazało znaczną czułość w wykrywaniu przerzutowych węzłów chłonnych, i po raz pierwszy wskazało na utrudnienie w przeprowadzeniu *SLND*, a tym samym realizacji koncepcji *SLN* w przypadku guza szyjki macicy większego niż 2 cm. Dwa lata później potwierdzono tą sugestią, publikując wyniki wieloośrodkowego badania niemieckiej grupy *Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie* (Grupa Robocza Onkologii

Ginekologicznej, *AGO*). Zaproponowano, że pacjentki mogą odnieść korzyść z biopsji *SLN* do stadium zaawansowania IB1 ≤ 2 cm wg klasyfikacji *FIGO*. Obecnie zagadnienie to jest przedmiotem wielośrodkowego badania, w którym jako polski uczestnik bierze udział Katedra i Klinika Ginekologii, Ginekologii Onkologicznej i Endokrynologii Ginekologicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Wyłaniającym się problemem jest fakt niepełnego zrozumienia celowości koncepcji *SLN*, co może wiązać się z brakiem jednolitych standardów postępowania z użyciem tej metody, a także istnienia różnych czynników, często nie branych pod uwagę, a utrudniających bądź uniemożliwiających interpretację wyników badań. Należą do nich na przykład: wielkość (czy też umiejscowienie w obrębie szyjki macicy) guza pierwotnego, obecność przerzutów omijających przewidywany szlak rozprzestrzeniania się choroby oraz trudności związane z wymaganiami stawianymi metodzie – m.in. zalecenie wykrycia i usunięcia *SLN* po obu stronach miednicy, pewna (choć nie określona wytycznymi) najmniejsza liczba węzłów chłonnych konieczna, aby wiarygodnie określić status choroby w węzłach chłonnych, powiększone węzły chłonne (stanowiące trudność w interpretacji śródoperacyjnego obrazu zaawansowania), możliwość wykonania *ultrastagingu* (ultracienkie skrawanie preparatu histopatologicznego), czy szczegółowa znajomość historii medycznej chorej (m.in. wywiad stanów zapalnych miednicy, wcześniejsze operacje w jej obrębie).

W największym do tej pory badaniu klinicznym pod kierunkiem Prof. Davida Cibuli określono wartość stwierdzanych mikroprzerzutów w *SLN* dla rokowania chorych na RSZM, ale nie określono jej w *nSLNs*. Istnieje wiele prac naukowych badających mniejsze grupy chorych, w których oceniano ryzyko wystąpienia mikroprzerzutów w pozawartowniczych węzłach chłonnych i odnoszono je do bezpieczeństwa ograniczania zakresu operacji w obrębie układu chłonnego. Porównania te są jednak trudne z tego powodu, że różni autorzy stosują nieco inne metody na każdym z etapów realizacji koncepcji węzła wartowniczego. Liczne publikacje nie dały odpowiedzi na pytanie o rzeczywistą wartość *ultra* szczegółowego badania usuwanych *nSLNs* (*ultrastaging*) w przypadku ujemnego *sSLN* (nie zawierającego zmian przerzutowych). Uzyskanie informacji o całym sploty chłonnym (w szczególności o „krytycznych” dla układu węzłach chłonnych), w zależności od stadium raka i ewentualnie informacji o czynnikach modyfikujących przerzutowanie, może dopiero dać wiarygodną odpowiedź na pytanie o potencjał przerzutowania RSZM i znaczeniu „mikroprzerzutowej choroby węzłowej” (na którą składają się mikroprzerzuty, *MICs* – zmiany w węzłach chłonnych nie przekraczające 2 mm oraz *ITC* wyizolowane komórki nowotworu – *isolated tumor cells*, tj. zmiany mniejsze niż 0,2 mm).

Cele pracy doktorskiej

1. Określenie częstości występowania i czynników związanych z występowaniem mikroprzerzutów w węzłach chłonnych pozawartowniczych w stadiach klinicznego zaawansowania raka szyjki macicy IA2 – IB1 wg klasyfikacji *FIGO* (*micrometastatic lymph node disease staging*).

2. Opisanie procedur wykonania i protokołu oceny węzłów chłonnych wartowniczych i pozawartowniczych poprzez ultracienkie skrawanie preparatów węzłów chłonnych i ich ocenę immunohistochemiczną (*ultrastaging synopsis*) za pomocą przeciwciał AE1/AE3.

Material i metody

Material

Sto dwadzieścia dwie kolejne chore z RSZM zostały przyjęte do Kliniki Ginekologii, Ginekologii Onkologicznej i Endokrynologii Ginekologicznej Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego – szpitala Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego celem leczenia operacyjnego w okresie od stycznia 2010 do kwietnia 2014 r. Osiemdziesiąt dwie chore wykluczono z uwagi na niespełnianie kryteriów włączenia. Kolejne 13 kobiet wyłączono z badania pomimo zastosowania koncepcji węzła chłonnego wartowniczego z powodu nieskutecznej jego detekcji. Ostatecznie zakwalifikowano do badania grupę 27 chorych, u których RSZM był w stadiach IA2 (1 chora) i IB1 (26 chorych) według klasyfikacji *FIGO* i udało się zidentyfikować przynajmniej jeden *SLN*. W tej grupie wszystkie pacjentki przeszły operację polegającą na usunięciu regionalnych węzłów chłonnych oraz rozszerzonym wycięciu macicy. Wszystkie węzły chłonne zostały poddane procesowi obróbki histologicznej preparatów węzłów chłonnych w *ultrastagingu*.

Metody

Przed operacją podano po 1 ml błękitu metylenowego w każde z czterech wkłuc tarczy części pochwowej szyjki macicy. Usunięto węzły chłonne oddzielając wyznakowane (wartownicze) od niewyznakowanych (pozawartowniczych). Próbkę węzłów chłonnych zatopione w bloczkach parafinowych zostały zbadane metodą seryjnego skrawania co 150 μm i ocenione w metodzie *ultrastagingu* przy użyciu przeciwciał monoklonalnych przeciw cytokeratynie (CK) AE1/AE3. W skrócie metoda ta polega na warstwowym skrawaniu preparatów na skrawki o grubości 4 mikrometrów w równych odległościach (co 150 μm). Wycinki umieszczano na silanizowanych szkiełkach podstawowych, dwa skrawki z danego poziomu: jeden w celu wybarwienia hematoksyliną i eozyną (HE), drugi w celu wywołania reakcji z przeciwciałem CK AE1/AE3.

Analizy statystyczne

W pracy wykorzystano test niezależności chi-kwadrat (do badania związku między zmiennymi dychotomicznymi); testy t-Studenta dla dwóch średnich oraz test U-Manna Whitney'a dla predyktorów ilościowych. Dla wszystkich testów sprawdzono spełnienie założeń ich stosowania. Wyznaczono ponadto krzywe *ROC* (*Receiver Operating Characteristic*) i obliczono *AUC* (pole pod krzywą *ROC*) dla określenia

mocy dyskryminacyjnej zmiennych. We wszystkich testach przyjęto poziom istotności 0,05. Analizy statystyczne zostały przeprowadzone za pomocą pakietu Statistica w wersji 10 (StatSoft Inc., Polska).

Hipotezy badawcze

1. Choroba mikroprzerzutowa w węzłach chłonnych pozawartowniczych w raku szyjki macicy w stadiach IA2-IB1 według klasyfikacji *FIGO* jest stwierdzana częściej niż w węzłach chłonnych wartowniczych.
2. Stan węzła chłonnego wartowniczego nie determinuje stanu pozostałych węzłów chłonnych.
3. Rozszerzenie badania preparatu węzłów chłonnych o jego ultracienkie skrawanie i techniki immunohistochemiczne według określonego protokołu nie jest wskazane w przypadku raka szyjki macicy w stadiach IA2-IB1 według klasyfikacji *FIGO*.

Wyniki

Zmiany wtórne w węzłach chłonnych zidentyfikowano w 11 z 27 przypadków RSZM (*MAC* – 5, *MIC* – 2, *ITC* – 4) – wszystkie w stadium IB1 wg klasyfikacji *FIGO*. U 3 chorych zmiany wtórne znaleziono tylko w *SLN*, w 3 innych tylko w *nSLN*, u 5 chorych – zmiany wystąpiły zarówno w *SLN*, jak i *nSLN*.

Spośród 516 usuniętych i zbadanych węzłów chłonnych było 66 *SLN* (12,8%). Pięćdziesiąt sześć węzłów chłonnych zawierało wtórne zmiany (10,9%). W 22 przypadkach węzły chłonne ze zmianami stanowiły te zawierające *MAC*, podobnie 22 – *MIC*, a 12 *ITC*. Mikroprzerzuty stwierdzono w 6/66 *SLN* (9,1%) oraz w 16/450 *nSLN* (3,6%). W 7 *SLNs* znaleziono *MAC*, a *ITC* w trzech. W przypadku *nSLNs* było odpowiednio 15 zawierających *MAC*, a 9 *ITC*.

W 88,8% (24/27) stan *SLN* odzwierciedlał w sposób prawidłowy status pozostałych usuniętych węzłów chłonnych. U 3 chorych (11,2%) z jednostronną identyfikacją *SLN* znaleziono zmiany w *nSLN* przy ich braku w *SLN*. U pierwszej chorej stwierdzono *MAC* po stronie przeciwnej do wybarwionego *SLN*, u drugiej chorej, po stronie *SLN* stwierdzono *MIC*, a po stronie przeciwnej – *MAC* i *MIC*. W tym przypadku guz pierwotny przekraczał 4 cm (pT1b2). W trzecim przypadku stwierdzono obecność *ITC* w *nSLN* przy ujemnym *SLN*.

Zmiany w *nSLN* statystycznie częściej występowały w przypadku guza pierwotnego > 2cm w stosunku do guza =< 2 cm (73% vs 27%, p=0,01068) oraz w przypadku *LVI* (+) (p=0,04285). Typ histologiczny nowotworu, stopień jego złośliwości oraz głębokość naciekania raka nie wykazały istotnego statystycznie związku z *MAC*, *MIC* oraz z *ITC* we wszystkich węzłach chłonnych oraz osobno w *nSLN*. Ustalono wartość decyzyjną punktu odcięcia głębokości naciekania ≥ 8 mm dla ryzyka występowania zmian w węzłach chłonnych mierzoną współczynnikiem Youdena.

Koncepcja *SLN* oparta o rozszerzenie badania węzłów chłonnych o ocenę cienkich skrawków pozwoliła na detekcję większej liczby węzłów chłonnych

w porównaniu do rutynowego postępowania (średnio o 4 więcej, $p=0,046$). Po zastosowaniu *ultrastagingu* stopień cechy N uległ zmianie w 1 (3,7%) przypadku (wykryto *MIC*), a w innym – wykryto dodatkowy mikroprzerzut w pozawartowniczym węzle paraaortalnym, który zmienił cechę M nowotworu. W grupie z dodatnimi *SLNs* pod względem *MACs* znamienne częściej były stwierdzane *MICs* w *nSLNs* ($p=0,00721$). Dodatkowo *SLNs* sprzyjają stwierdzeniu zmiany wtórnej w *nSLNs* w postaci *MAC* lub *MIC*, ale nie *ITC* ($p=0,0142$).

Wnioski

1. Najczęściej mikroprzerzuty są obserwowane w węzłach chłonnych wartowniczych (9,1%), rzadziej dotyczą pozostałych węzłów chłonnych (3,6%). Czynnikiem zwiększającym ryzyko mikroprzerzutów do węzłów chłonnych pozawartowniczych są: wielkość guza $>2\text{cm}$ oraz naciekanie przestrzeni okołonaczyniowej limfatycznej.
2. Stan *SLN* determinuje stan pozostałych węzłów chłonnych pod warunkiem obustronnej identyfikacji. W przypadku braku wykrycia *SLN* nie można wiarygodnie wnioskować o stanie węzłów chłonnych po tej stronie, gdyż występuje wówczas ryzyko uzyskania fałszywego wyniku diagnostycznego i niedoszacowania stadium zaawansowania. Najlepszymi kandydatkami do zastosowania procedury *SLND* w raku szyjki macicy są chore ze zmianą pierwotną do 2 cm i ujemną cechą *LVI*.
3. Rozszerzenie badania preparatów węzłów chłonnych o ich ultracienkie skrawanie i techniki immunohistochemiczne według określonego protokołu umożliwia uzyskanie informacji o rzeczywistym zaawansowaniu klinicznym w przypadku raka szyjki macicy w stadium IA2-IB1 wg klasyfikacji *FIGO*.

Summary

Introduction

Cervical cancer (CC) is the second most common malignant female genital tract tumor (after breast cancer) in the world, and the third most common malignant female genital tract cancer in Poland, according to National Cancer Registry data. According to those data, in the previous years the relative frequency in the recognition of CC decreased. It may be a result of the National Program for Fighting Cancer, which started in year 2005. Due to higher number of precancerous and early CC stage (limited to the cervix) reports, it may be anticipated that more women will proceed with treatment involving preservation of fertility. Such procedure bases on sparing surgeries, which improve the quality of life while maintaining health. The “saving” refers both to the reproductive function (preservation of the uterus and upper part of the cervix), and the surgery scope, within the oncological minimum. Most of such decisions refer to lymph nodes.

Methods for depicting the state of oncological patients are mainly computed tomography (CT), magnetic resonance (MR) or, less often, positron emission tomography with fluorodesoxyglucose (FDG-PET), which show a high degree of

accuracy in evaluation of enlarged lymph nodes regarding the presence of metastases (70-80% depending on the method), however their usefulness is limited in normal-sized lymph nodes. Lymph nodes which are not enlarged may contain micrometastases (foci < 2mm) or small macrometastases (< 5mm), that may be invisible in the imaging study, but present a significant threat when left without treatment.

The issue of the scope of clinical treatment is very important regarding early CC (stages IA2-IB1, according to *Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique, FIGO*), in which the risk of metastasis in single case is difficult to predict, the metastasis may be detected with different histopathological methods, and the intraoperative result of lymph nodes removal may be false negative. None of histopathological tumor markers indicate in which lymph nodes the metastases may locate. There is no method for preoperative examination of such lymph nodes, using both currently available radiologic methods and intra- or postoperative histopathological ones.

In oncology, the concept of a “sentinel” lymph node refers to detection of the probable route of primary tumor spreading, which firstly occupies the sentinel lymph node, and secondly follows its invasion route. The concept was described for the first time by Ernest Gould, who developed the lymph drainage in parotid cancer. Introduction of SLN concept to the common use was based on two statements: 1) penetration of cancer cells into SLN, which is the first “target” of lymph runoff, determines the stage of the overall lymph node runoff, 2) when SLN is not occupied by cancer cells – the prognosis concerning SLN removal (one or more LNs) does not differ significantly from the one concerning radical removal of all regional lymph nodes.

The success of SLN concept was obtained in case of tumors in which the disease spread proceeds via lymphatic vessels. The first to be included to this group were melanoma, breast cancer and Merkel cell carcinoma. The method finds clinical justification in the case of the three mentioned tumors, but also in vulvar, cervical and endometrial cancers. Application of this method may be considered to bring certain benefits for cervical cancer (defined by recommendation classes IIa or IIb according to the principles of Evidence Based Medicine, EBM, which bases on reliable scientific evidence). Therefore, application of SLNC method is scientifically and clinically motivated.

In cervical cancer, the benefits of using this concept (regardless the stage of tumor) result from better assessment of lymph nodes (better precision in tumor classification in terms of prognosis – *staging*), due to possible detection of major lymphatic routes and therefore examination lymph nodes within those routes. Another advantage of this method is the precision of proceeding – it allows appropriate classification of the patient towards adequate, available treatment methods. The next important issue relating sentinel lymph node concept is carrying out the tests in women which are mostly in the reproductive age at the time of diagnosis, and some of them are planning to become pregnant. Determination of the oncological stage of the patients with the highest possible accuracy and avoiding unnecessary or inappropriate treatment are two main elements of care in women with CC, which gives sentinel lymph node

concept. A significant contribution to the development of sentinel lymph node concept in the field of gynecological oncology is brought by Polish scientists.

The main objectives of these studies were: to assess the feasibility of sentinel lymph node detection and determination of the potential use of SLN in cervical and endometrial cancers, and operations of selective removal of lymph nodes in vulvar cancer. The study on the cervical cancer conducted at Polish center, from which this thesis comes from, showed considerable sensitivity in the detection of metastatic lymph nodes, and for the first time indicated the difficulty in carrying out SLN dissection, and thus implementation of SLN concept in a case of cervical tumor larger than 2 cm. Two years later this theory was confirmed with a publication of the results of a multicenter study of the German group Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie (Working Group of Gynecologic Oncology, AGO), suggesting that patients may benefit from SLN biopsy to stage IB1 \leq 2 cm by FIGO. Currently, this issue is the subject of a multicenter study in which the Polish participant is the Department and Clinic of Gynecology, Gynecologic Oncology, and Gynecological Endocrinology, of Medical University of Gdansk and the University Clinical Centre in Gdansk.

There is a problem arising from incomplete understanding of SLN expediency, what may result in the lack of uniform standards for SLN procedures, but also existence of various factors, often not taken under consideration, which may impede or prevent interpretation of the results. Within the factors we may list: size (or localization in the cervix) of the primary tumor, existence of metastases outside the predicted route of disease spreading, difficulties with meeting method requirements – such as detection and removal of sentinel lymph node from the both sides of the pelvis, some minimum number of lymph nodes (even not specified with guidelines) necessary to reliably determine the disease status in the enlarged lymph nodes (which are difficult to interpret via intraoperative inspection of disease stages), possibility of ultrastaging (ultra-thin cutting of histopathology specimen), and detailed knowledge of the medical history of the patient (inflammation of the pelvis or former operations).

To this date, the broadest clinical study performed under supervision of prof. David Cibula, included determination micrometastases values in SLN and their influence on the prognosis, however such relationship was not studied including nSLN. There are many scientific studies concerning examination of smaller groups, which evaluated risk of micrometastases in nSLN, linking them with the safety of limiting operation scope within the lymphatic system. Nevertheless, such comparison is difficult, due to the fact that the authors use slightly different methods on each of SLN concept stages. Numerous publications have not confirmed the actual value of ultra-specific examination of resected nSLN (ultrastaging) in case of negative nSLNs. Obtaining information about the total lymph drainage (in particular critical for the lymphatic system), depending on the cancer stage and additional factors affecting metastases, may finally give a reliable information about the cervical cancer metastatic potential, and micrometastatic lymph node disease, or low volume lymph node disease, including also isolated tumor cells (deposits <0.2 mm).

Aims of the doctoral thesis

1. Determination of frequency and factors associated with the presence of micrometastases in non-sentinel lymph nodes in the clinical cervical cancer stages IA2 – IB1 according to FIGO (micrometastatic lymph node disease staging).
2. Description of procedures and protocol of evaluating sentinel and non-sentinel lymph nodes by means of ultra-thin sectioning of lymph nodes preparations and immunohistochemical evaluation (ultrastaging synopsis) with AE1/AE3 staining.

Materials and Methods

Materials

The group included 122 patients of the Clinic of Gynecology, Gynecologic Oncology and Gynecological Endocrinology of the University Clinical Center – the hospital of the Medical University of Gdańsk. The patients were admitted to the center due to operative primary cervical cancer, in the period of January 2010 and April 2014. Due to not meeting the including criteria 82 of the patients were excluded from the study. Despite including SLNC the following 13 patients we excluded due to ineffective SLN detection. Finally, the study group included 27 patients with cervical cancer stage IA2 and IB1 (FIGO criteria) in which at least one SLN was detected. All the patients underwent operation including removal of regional lymph nodes and total or radical hysterectomy. All the lymph nodes were subjected to histological preparation by means of ultrastaging.

Methods

Before the surgery, a volume of 1 ml of methylene blue was injected in each of four punctures of the vaginal part of the cervix. Lymph nodes were removed with separating the labeled (sentinel) from the non-labeled ones (nonsentinel). Lymph node samples were embedded in paraffin blocks and subjected to serial cutting every 150 μm , and evaluated by ultrastaging with cytokeratin (CK) monoclonal antibodies AE1/AE3. In brief, the method bases on layered cutting of the tissue paraffin blocks in 4 μm scraps in even distances (150 μm). The microcuts are placed on silanized glass slides, two samples of each level, the first was stained with hematoxylin and eosin (HE), and the second was subjected to CK AE1/AE3 antibody.

Statistical analysis

The study involved independence chi-square test (to study the relationship between dichotomous variables), t-Student test for two mean values and U-Mann Whitney test for quantitative predictors. All the test were verified for meeting application conditions. Moreover, ROC (Receiver Operating Characteristic) curves were determined and AUC (area under ROC) was calculated to obtain the power of the

discriminant variables. The level of significance in all the tests was 0.05. Statistical analysis was run using Statistica 10 (StatSoft Inc., Polska).

Study hypothesis

1. Micrometastatic disease in non-sentinel lymph nodes in cervical cancer stages IA2-IB1 (FIGO) is diagnosed more often than on sentinel lymph nodes.
2. The condition of sentinel lymph node does not determine the condition of other lymph nodes.
3. Extension of lymph node preparation examination with its ultra-thin cutting and immunohistochemical techniques according to adequate protocol is not advised in cervical cancer stages IA2-IB1 (FIGO).

Results

Secondary lesions in lymph nodes were detected in 11 out of 27 patients (*MAC* – 5, *MIC* – 2, *ITC* – 4) – all IB1 stage according to FIGO. In 3 patients the secondary lesions were found only in SLN(s), in 3 other only in nSLN(s), in 5 patients in both SLN(s) and nSLN(s).

Within 516 removed and examined lymph nodes, 66 (12.8%) were SLN, and 56 (10.9%) contained secondary lesions. In 22 cases the positive lymph nodes contained *MAC*, 22 – *MIC*, and 12 – *ITC* as major (dominant) lesion. Micrometastases were found in 6/66 (9.1%) of SLNs and in 16/450 (3.6%) of nSLNs. Macrometastases were found in 7 SLNs, and *ITC* in 3 SLNs, whereas 15 nSLNs contained *MAC* and 9 nSLN contained *ITC*.

In 88.8% of patients (24/27) SLN condition correctly reflected condition of the remaining removed lymph nodes. In 3 (11.2%) cases with unilateral SLN identification lesions in nSLN were found, with the absence of lesions in SLN. In the first case *MAC* was detected in the opposite side from the stained SLN. In the second patient, *MIC* was detected on the side of SLN, and on the opposite side – *MAC* and *MIC*, and the size of the primary tumor exceeded 4 cm (pT1b2). In the third patient, the presence of *ITC* in nSLN was stated together with negative SLN.

Lesions in nSLN appear statistically more frequently in case of the primary tumor > 2cm, comparing to tumor ≤ 2 cm (73% vs 27%, p=0.01068), and in case of *LVI* (+) (p=0,04285). Histological type, grade and infiltration depth of the tumor did not show statistically important correlation with the presence of *MAC*, *MIC* and *ITC* in all lymph nodes or separately in nSLN. In the assessment of lesions risk in the lymph nodes, the infiltration depth cutoff point, measured with Youden index, was stated to be ≥8 mm.

SLN concept allowed to detect higher number of lymph nodes, than in routine examination (an average of 4 more, p=0.046). Application of ultrastaging changed N feature stage in 1 (3.7%) case (*MIC* detection), and in another case another micrometastasis in nSLN paraaortic node, changing the M feature of the tumor. In the group of positive sSLN in terms of *MAC*s, much often *MIC*s were found in nSLN

($p=0.00721$). Positive SLN(s) help in finding secondary lesions in nSLN(s) in the form of MAC and MIC, but not ITC ($p=0.0142$).

Conclusions

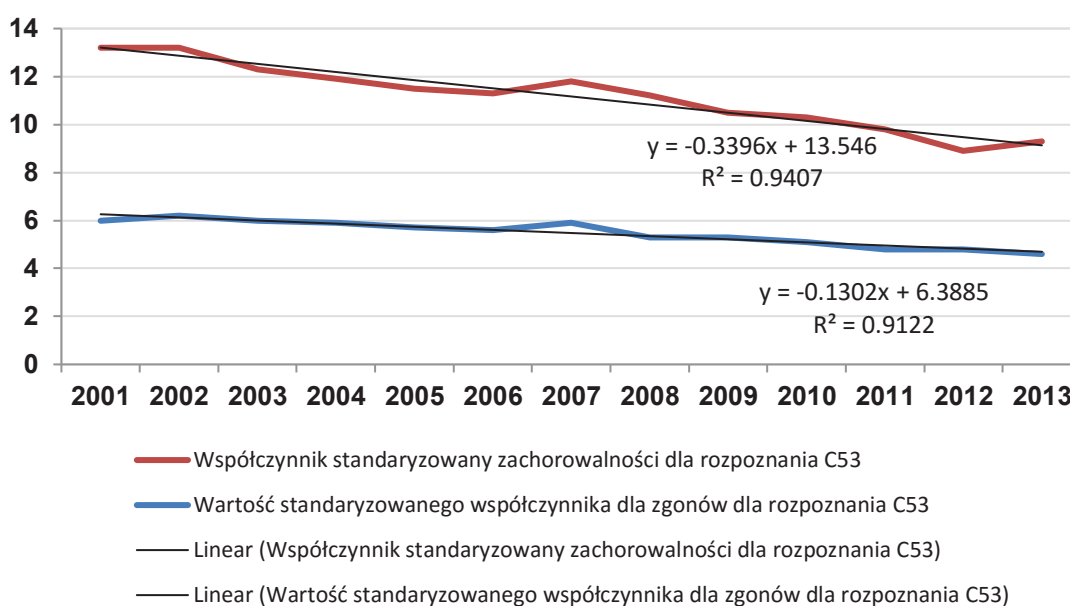
1. Micrometastases are most often observed in sentinel lymph nodes (9.1%), in fewer cases in the remaining lymph nodes (3.6%). Factors increasing the risk of micrometastases in nonsentinel lymph nodes are: tumor size $> 2\text{cm}$ and infiltration of blood and lymph vessels area.
2. Condition of SLN determines the condition of remaining lymph nodes when identified bilaterally. In the case of lack of SLN identification you cannot reliably state on the condition of lymph nodes on given side due to the risk of false diagnostic result and underestimation of the stage. The best candidates for implementing SLND procedure in cervical cancer are patients with preliminary lesion up to 2 cm and negative LVSI.
3. Extension of the examination of lymph nodes preparations with ultrathin cutting and immunohistochemical techniques according to given protocol enables to obtain information on the actual clinical stage of cervical cancer stage IA2-IB1 according to FIGO.

2. Wprowadzenie

2.1. Epidemiologia raka szyjki macicy

Obciążenie społeczeństw rakiem szyjki macicy (RSZM) jest odwrotnie proporcjonalne do poziomu zaplecza medycznego (wyrażanego jako indeks rozwoju ludzkiego – *human development index, HDI*) danego kraju lub analizowanego regionu – u kobiet na świecie RSZM jest głównym nowotworem złośliwym obok raka piersi [1]. W krajach o średnim *HDI* takim jak Polska, RSZM jest trzecim co do częstości występowania nowotworem złośliwym żeńskich narządów płciowych po raku błony śluzowej trzonu macicy i raku jajnika [1, 2]. W ciągu ostatnich 10 lat sprawozdawczości do Krajowego Rejestru Nowotworów, względna częstość rejestrowania przypadków inwazyjnego RSZM zmniejsza się. W 2005 roku wdrożono Narodowy Program Zwalczania Chorób Nowotworowych, obejmujący bezpłatną cytologię raz na 3 lata dla kobiet od 25. do 59. r.ż. Zmiana ta dla współczynnika standaryzowanego względem populacji świata dla zachorowań na RSZM wynosiła 3,9 (13.2 w 2001 r. i 9.3 w 2013 r.) [2]. Wprowadzenie programu nie wpłynęło jednak na zwiększenie tempa spadku wartości współczynnika zachorowalności i umieralności.

Dane epidemiologiczne dotyczące zachorowań i zgonów z powodu inwazyjnego RSZM w ciągu ostatnich 10 lat, pochodzące z KRN przy Centrum Onkologii im. M. Skłodowskiej-Curie w Warszawie, przedstawia Wykres 1 [2].



Wykres 1. Współczynnik standaryzowany dla zachorowań na nowotwór złośliwy szyjki macicy (którego głównym przedstawicielem jest rak szyjki macicy, kod rozpoznania C53 wg Międzynarodowej Klasyfikacji Chorób ICD10) w ciągu 13 lat analizowanego okresu (od 2001r. do 2013r.) oraz współczynnik standaryzowany dla zgonów dla rozpoznania C53 w Polsce w ciągu 13 lat (od 2001r. do 2013r.). Legenda: Skośne linie – linie trendu liniowego, gdzie współczynnik R² jest bardzo wysoki, co dobrze świadczy o dopasowaniu modelu do danego szeregu czasowego. Współczynnik „a” ($y = ax + b$) ma w obu przypadkach wartość minusową – w takiej sytuacji z każdym rokiem wartość obu wskaźników spada o odpowiednią wartość. Dane źródłowe dostępne na stronie internetowej KRN – raport dla współczynników standaryzowanych zachorowań i zgonów dla kobiet, każdego wieku, dla wszystkich województw (www.onkologia.org.pl).

Z powodu małej liczby prób (13), na podstawie Wykresu 1. można wysnuć jedynie ogólny wniosek, iż średnio współczynnik zachorowalności szybciej spada z roku na rok niż współczynnik zgonów.

Wiodącym czynnikiem ryzyka zachorowania na RSZM jest przetrwałe zakażenie wirusem brodawczaka ludzkiego (*human papillomavirus* – *HPV*) o typie onkogennym, do którego najczęściej dochodzi poprzez kontakt seksualny [3-5]. Około połowa przypadków raków zależnych od zakażenia różnymi drobnoustrojami u kobiet stanowi RSZM, wywołany przez onkogenne typy *HPV* [6]. Zakażenie wirusem *HPV* (które statystycznie najczęściej nie pozostawia po sobie następstw onkologicznych) jest – w pewnym uproszczeniu – prawdopodobnie najczęstszą chorobą przenoszoną drogą płciową na świecie, z częstością zakażenia wynoszącą nawet 75-80% w ciągu życia kobiety [5,7]. Najczęściej spotykanym typem wirusa *HPV* jest typ 16, jednak proporcje typów wirusa zakażającego organizm kobiety są zmienne – typ 18 częściej można stwierdzić w raku gruczołowym niż płaskonabłonkowym [8].

Podsumowanie epidemiologii RSZM znajduje się w Tabeli 1. poniżej.

Tabela 1. Charakterystyka epidemiologiczna raka szyjki macicy [2,9].

Charakterystyka
■ 3. pod względem częstości występowania nowotwór ginekologiczny (nie wliczając raka piersi) z ok. 2900 nowych zachorowań rocznie w Polsce ^[2]
■ 7. pod względem częstości występowania nowotwór złośliwy u kobiet w Polsce ^[2]
■ 6. pod względem częstości zgonów z powodu nowotworów złośliwych u kobiet w Polsce ^[2]
■ Stanowi ok. 6% nowotworów złośliwych u kobiet w Polsce* ^[2]
■ Najwięcej zachorowań występuje w 6. i 7. dekadzie życia (50-70 lat) w Polsce ^[2]
■ Najczęstszy typ histologiczny – rak płaskonabłonkowy (ok. 80%)
■ Wiodący czynnik wywołujący – przetrwałe zakażenie wirusem <i>HPV</i> 16 i <i>HPV</i> 18
■ Najczęstsze stadium – rak ograniczony do szyjki macicy (wg <i>FIGO</i> – stadia IA1-IB1) ^[9]
■ Śmiertelność związana z nowotworem wynosi rocznie ok. 57,4% (1669 zgonów na 2909 zachorowań w roku 2013) w Polsce ^[2]

* Wzięto pod uwagę 20 najczęstszych nowotworów złośliwych – opracowano na podstawie raportu dotyczącego współczynników standaryzowanych dla zachorowań i zgonów w podziale na rozpoznania, wygenerowanego dla kobiet od wieku 0 do wieku +∞ za rok 2013r. dla wszystkich województw w Polsce (www.onkologia.org).

2.2. Przebieg naturalny raka szyjki macicy

Rak szyjki macicy rozwija się z tzw. „strefy przemian”, stanowiącej pogranicze nabłonków płaskiego tarczy części pochwowej i gruczołowego kanału szyjki macicy. Wirus *HPV*, wnikając do komórek tego aktywnego mitotycznie obszaru, indukuje proces metaplastyki nabłonka walcowatego gruczołowego w kierunku nabłonka płaskiego, powodując miejscowe zmiany struktury tkankowej nazywane ogólnie „dysplazją”. Jest ona sklasyfikowana w trzech stopniach w zależności od zaawansowania przemian w strukturze nabłonka wyrażonej w jego grubości. Zmiany typu *CIN* (*CIN* – *cervical intraepithelial neoplasia*, wewnątrz nabłonkowe nowotworzenie szyjki macicy lub według nowszej nomenklatury – *SIL* – *squamous intraepithelial lesion* – zmiana śród płaskonabłonkowa, dzielona na duży stopień – *high grade* lub mały stopień – *low*

grade). Zmiany typu *CIN* (*I/LG SIL*, *II-III/HG SIL*) składają się na chorobę przedinwazyjną szyjki macicy (*cervical preinvasive disease, CPD*).

W trakcie rozwoju zmian nabłonkowych udział podtypów wirusa *HPV* zmienia się – dopiero w raku inwazyjnym do *HPV* typ 16 dołącza się typ 18, co świadczy o dynamicznym charakterze procesu zakażenia i przeobrażania nabłonka od niewielkich zmian architektonicznych błony śluzowej do nowotworu [10].

Mechanizm kancerogenezy polega na włączaniu się onkogenów wirusowych E6 i E7 do genomu komórki nabłonkowej gospodarza i ekspresji białek wirusowych z użyciem jego aparatu transkrypcyjnego. Białko E6 oddziałuje z białkiem p53 osłabiając mechanizmy naprawy genomu i hamując proces programowanej śmierci komórki (apoptozy), zaś białko E7 powoduje niekontrolowaną proliferację komórek poprzez łączenie się z białkiem regulatorowym pRb (*retinoblastoma protein*). Oprócz tego, białka E6 i E7 mogą zmieniać odpowiedź immunologiczną organizmu, co utrudnia mu zwalczanie wirusa.

Zmiany będące skutkiem przetrwałego zakażenia wirusem *HPV* typu onkogenego i wniknięcia jego genomu zachodzą przez kilka lat, doprowadzając do ich klinicznego ujawnienia się. Jeżeli zmiany te nie zostaną wykryte, rak ujawnia się dając objawy, których nasilenie jest zazwyczaj zależne od jego wielkości i głębokości naciekania. Rak szerzy się przez ciągłość w różnych kierunkach oraz poprzez sieć naczyń chłonnych, do których wykazuje powinowactwo typowe dla złośliwych nowotworów nabłonkowych.

Potwierdzono, że nawet 50% przypadków wczesnego RSZM daje rozsiew do układu chłonnego [11]. Stanowi to przesłankę do pogłębiania wiedzy nad aktywnością biologiczną choroby, mechanizmami jej rozprzestrzeniania się – w szczególności umiejscawiania się komórek RSZM w potencjalnie „uchwytnych leczniczo” miejscach, jakimi są węzły i naczynia chłonne.

2.3. Zarys rozwoju koncepcji wykrywania wartowniczego węzła chłonnego w onkologii

Przerzutowanie jako proces przemieszczania się komórek nowotworu do naczyń krwionośnych i umiejscawiania się w odległych narządach zostało po raz pierwszy opisane przez Josepha Claude’a Récamiera, zaś nazwisko Astleya Coopera jest związane z pierwszymi próbami nastrzykiwania naczyń i węzłów chłonnych [12].

Koncepcja węzła chłonnego wartowniczego w onkologii polega na wykryciu najbardziej prawdopodobnej drogi („stacji”) szerzenia się choroby nowotworowej z pierwotnego guza. Wykrywanie odbywa się w trakcie przedoperacyjnego badania obrazującego lub/i podczas przeprowadzanej operacji i usuwany jest jeden lub (częściej) kilka takich węzłów chłonnych. Koncepcja ta została po raz pierwszy opracowana przez chirurgów Leonarda R. Braithwaite’a w 1923 roku, który nadał określenie „węzeł wartowniczy”, oraz Ernesta Goulda w 1960 roku, który określił węzły chłonne wartownicze dla raka ślinianki przyusznej [13,14]. Wprowadzenie koncepcji *SLN* było oparte na założeniach, że inwazja nowotworu do węzła chłonnego, należącego do pierwszej stacji spływu chłonki, wskazuje na stan całego dorzecza węzłowego guza,

a rokowanie wiążące się z usunięciem jedynie *SLN* (w przypadku nieobecności w nim przerzutu) nie różni się w sposób statystycznie istotny od tego, które jest związane z radykalnym usunięciem węzłów chłonnych [14]. Wyniki prac poprzedników potwierdził niezależnie Ramon Cabañas w 1977 roku, któremu przypisuje się definicję węzła chłonnego wartowniczego (*Sentinel Lymph Node, SLN*) [15].

Możliwość zrealizowania koncepcji *SLN* została sprawdzona w tych nowotworach, w których do rozsiewu komórek dochodzi przede wszystkim drogą naczyń chłonnych. Do tej grupy zaliczają się m.in.: rak piersi, czerniak skóry, nowotwory żeńskich narządów płciowych, takie jak rak sromu, RSZM, rak błony śluzowej trzonu macicy [16-22] oraz nowotwory układu pokarmowego, m.in. rak jelita grubego i żołądka [23,24]. Koncepcja *SLN* stała się jednym z kroków milowych w chirurgii onkologicznej po tym jak Morton i wsp. w 1992r. wykazali korzyść postępowania oszczędzającego pozostałe węzły chłonne w czerniaku skóry przy ujemnych *SLNs* [17]. Doprowadziło to do rozszerzenia koncepcji *SLN* poza czerniaka. Veronesi i wsp. stwierdzili, że w odniesieniu do raka piersi, czułość metody radioizotopowej (z użyciem przedoperacyjnej scyntygrafii i śródoperacyjnego użycia ręcznego detektora promieniowania gamma [γ]) w wykrywaniu *SLN* wyniosła 97,5% [25]. Dało to podstawę do uznania wydzielenia i biopsji *SLN* (*sentinel lymph node dissection, SLND*) jako potrzebnego elementu oceny zaawansowania kliniczno-patologicznego w tej chorobie. W raku piersi metoda ta zaczęła być zalecana u chorych z wczesnym nowotworem w celu identyfikacji przypadków choroby bez przerzutów do węzłów chłonnych – kandydatek do leczenia oszczędzającego nie tylko piersi, ale także węzły chłonne dołu pachowego [26]. Oprócz bezpieczeństwa onkologicznego, także skrócenie przebiegu pobytu pooperacyjnego oraz poprawa jakości życia po operacji skłaniają do uznania korzyści płynących z zastosowania *SLND* [27]. Przydatność oceny *SLN* jest przedmiotem kontrolowanych badań klinicznych w raku regionu głowy i szyi, tarczycy, płuca, przełyku, raka jelita grubego i raka odbytnicy [28-33]. W wielu innych nowotworach, w tym dotyczących żeńskich narządów płciowych, trwają badania nad tym zagadnieniem i nie nadano mu jeszcze miejsca w optymalizacji postępowania leczniczego.

RSZM jest poważnym kandydatem do *SLND*, gdyż główną drogą przerzutowania tego nowotworu jest droga chłonna. Van Trappen i wsp. w 2001 roku wykazali, że największy „ciężar” mikroprzerzutów w RSZM znajduje się w węzłach chłonnych położonych najbliżej guza, co dało podwaliny koncepcji *SLN* w tym nowotworze [34]. Cytowani autorzy analizowali występowanie *MICs* w węzłach chłonnych za pomocą zliczania liczby kopii cytokeratyny 19 pochodzącej z komórek nowotworowych za pomocą reakcji łańcuchowej polimerazy (*RT-PCR*). Stwierdzili, że u 15 z 16 pacjentek z wykrytymi mikroprzerzutami w węzłach chłonnych, najwyższy poziom transkrypcji cytokeratyny 19 (CK19) znajduje się w pierwszym węzle chłonnym. Dargent i wsp. w 2000 r. przedstawili pierwsze doniesienie na temat zastosowania koncepcji *SLN* w RSZM. Oparli swoje wyniki na analizie 23 chorych z wczesnym zaawansowaniem raka, u których stwierdzili po jednym lub dwóch *SLNs*, używając niebieskiego barwnika podawanego do szyjki macicy. Wśród wszystkich

usuniętych węzłów chłonnych stwierdzono zajęcie od jednego do trzech z nich, a w każdym przypadku przerzut był obecny w co najmniej jednym *SLN* [35].

Pluta i wsp. dostrzegli, że poza stwierdzeniem wykonalności i skuteczności *SLND*, może ona mieć daleko bardziej idący skutek – wyselekcjonowanie pacjentek do mniej radykalnych procedur operacyjnych [36]. Zakres użyteczności onkologicznej jest również szerszy – koncepcja *SLN* implikuje decyzje śródoperacyjne, pooperacyjne oraz umożliwia najwyższy stopień oceny klinicznej i histopatologicznej pozostałych węzłów chłonnych. Może się to odbywać dzięki metodom szczegółowej analizy preparatów histologicznych pod kątem obecności w nich mikroprzerzutów.

2.4. Wartość biopsji wartowniczego węzła chłonnego w raku szyjki macicy

Jak już wspomniano w cytowanej pracy badawczej van Trappena i wsp., *SLN* stanowi pierwsze ogniwo łańcucha przerzutów w RSZM [34]. Znaczenie kliniczne koncepcji *SLN* najlepiej oddaje pytanie, zadane przez prof. T. Demkowa w publikacji książkowej poświęconej *SLN*: „Czy celowe jest narażenie znacznej liczby chorych na okaleczający zabieg limfadenektomii, gdy niewiele z nich mogło odnieść korzyść z zastosowanego leczenia?” [37]. W przypadku RSZM w grupie raków wczesnych (IA1-IB1 i miejscowo zaawansowanych IB2-IIB wg klasyfikacji *FIGO*), częstość występowania przerzutów do węzłów chłonnych wynosi odpowiednio 0,5-5% i 12-27% [38-42]. Niektórzy autorzy są zdania, że nie należy rutynowo usuwać węzłów chłonnych w raku IA2 wg klasyfikacji *FIGO* ze względu na niskie ryzyko przerzutów [38]. Wydaje się, że chore na RSZM w stopniach IB-IIA są lepszymi kandydatkami do *SLND* ze względu na duży odsetek przypadków, w których u chorych kwalifikowanych do *SLND* (cN0 wg klasyfikacji *Union Internationale Contr le Cancer, UICC*) nie stwierdza się dalszych przerzutów tak często jakby to mogło wynikać ze stadium kliniczno-chirurgicznego nowotworu [43].

Podobnie jest w przypadku raka głowy i szyi. Psychogios i wsp. zbadali odsetek ukrytych przerzutów w węzłach chłonnych u 636 chorych na raka głowy i szyi (jamy ustnej i wszystkich części gardła) przy węzłach chłonnych niezajętych klinicznie (cN0). Analizowano chorych poddanych operacji z elektywnym wycięciem węzłów chłonnych w ciągu 30 lat (1980 r.-2010 r.). Przerzuty stwierdzono w 158 przypadkach (24,8%) [44]. Wśród specjalistów zajmujących się leczeniem chorych na raki regionu głowy i szyi panuje pogląd, który głosi, że gdy ryzyko (mikro)przerzutów dla danego ogniska pierwotnego jest określone na $\geq 20\%$, należy podjąć elektywną operację węzłową [45]. W przypadku raka głowy i szyi nie dysponujemy do tej pory wynikiem chociaż jednego badania z randomizacją, które by stwierdzało, że można, z wysokim prawdopodobieństwem nie znaleźć przerzutów w węzłach chłonnych ani przy cN0, ani przy ujemnych pod względem przerzutów (mikroprzerzutów) wartowniczych węzłach chłonnych szyi. Dla RSZM Tax i wsp. opublikowali niedawno przegląd 47 badań, gromadzących 4130 chorych, w którym stwierdzili, że ryzyko ukrytych przerzutów do węzłów chłonnych w przypadku stadiów zaawansowania wg klasyfikacji *FIGO* IA2, IB1, IIA z guzem <4 cm z cN0 i po stwierdzeniu obustronnie ujemnych *SLNs* w *ultrastagingu*, wynosi 0,08% [43].

Rak regionu głowy i szyi może być dobrym punktem odniesienia dla RSZM ze względu na zbliżoną biologię tej grupy nowotworów i dającą się porównać lokalizację – często w linii pośrodkowej ciała, z wzajemną siecią powiązań węzłów chłonnych szyi, co zbliża te nowotwory do RSZM i jego pośrodkowego umiejscowienia w miednicy bogatej wraz ze skomplikowaną siecią naczyń i węzłów chłonnych. We wczesnym RSZM ryzyko to nie sięga 20%, dlatego – w przeciwieństwie do raków głowy i szyi – istnieją nadzieje na zastosowanie w nim koncepcji *SLN*.

Z powyższych dwóch podrozdziałów można wysnuć wniosek, że istnieją pewne przesłanki, aby uważać koncepcję *SLN* jako uniwersalną koncepcję, sprawdzalną w wielu nowotworach, a w dużej części przypadków przekładającą się na zysk diagnostyczny lub/i leczniczy.

Należy przy powyższych rozważaniach zwrócić uwagę, że znaczący wkład do rozwoju koncepcji *SLN* wnieśli również polscy badacze, wpisując się nurt zwolenników koncepcji *SLN* w nowotworach żeńskich narządów płciowych [19,36,46,47]. Głównymi celami polskich i zagranicznych badań dotyczących *SLN* w RSZM były: ocena wykonalności wykrywania *SLN* i określenie potencjalnego zastosowania badania *SLN* w RSZM u chorych operowanych z dostępu przezbrzusznego, a w raku sromu – zakresu operacji usunięcia węzłów chłonnych. Jako jedni z pierwszych badacze z ośrodka pracy doktorskiej wykazali m.in. znaczną czułość w wykrywaniu przerzutowych węzłów chłonnych z użyciem tej metody i po raz pierwszy wskazano na wyższy stopień trudności w zrealizowaniu tej procedury, gdy guz nowotworowy przekracza średnicę 2 cm [46]. Ta obserwacja została następnie potwierdzona w wielośrodkowym badaniu niemieckiej Grupy Roboczej Onkologii Ginekologicznej (*Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie, AGO*). Wynikiem polskich i niemieckich doświadczeń była sugestia, że chore na RSZM mogą odnieść największą korzyść z biopsji *SLN* do stadium zaawansowania IB1 wg klasyfikacji *FIGO* z wielkością guza ≤ 2 cm [48]. Obecnie kwestia granicy wielkości guza jest przedmiotem badań, które rozpoczął Prof. A. Schneider kierując Uniwersytecką Kliniką Ginekologii i Onkologii Ginekologicznej w Berlinie (*Klinik für Gynäkologie mit Schwerpunkt Gynäkologische Onkologie, Universitätsklinikum Berlin-Charité*). Szczególnym celem tego zespołu jest określenie technicznej wykonalności i praktycznej przydatności leczniczej *SLND* we wczesnych stadiach RSZM do raka ograniczonego do szyjki macicy do 2 cm włącznie. Jako polski uczestnik badania brał udział także ośrodek, z którego pochodzi niniejsza praca doktorska, a autor również uczestniczył w operacjach przeprowadzanych zgodnie z protokołem badania. Należy przy tym podkreślić, że 5 pacjentek z tego badania zostało ujętych w pierwotnym materiale do niniejszej pracy doktorskiej.

W kolejnych publikacjach, w których sprawdzano koncepcję *SLN* w RSZM, można było spotkać określenie „guz niskiego ryzyka”, co odnosi się do ryzyka przerzutów do węzłów chłonnych, jakie niesie ze sobą guz o określonych cechach morfologicznych i histologicznych. Niektórzy autorzy, tacy jak Devaja i wsp. zaprzeczali jednak znaczeniu niektórych właściwości pierwotnej zmiany nowotworowej [49]. W odniesieniu do znaczenia wielkości guza twierdzili oni, że nie jest to miarodajny czynnik – według nich węzły chłonne wartownicze przy większych guzach nie wybarwią się, albo wybarwią się nie te, które są prawdziwie wartownicze.

Dowodem przeciwnym na to twierdzenie są wyniki badania pod kierunkiem prof. Cibuli, które objęło dużą liczbę chorych [40]. Sugerują one, że mikroprzerzuty w *SLN* mają znaczenie rokownicze pod warunkiem, że procedurę *SLND* wykona się prawidłowo, a znaczenia nie miały stadium nowotworu czy jego wielkość. Spory o warunki i możliwe do uzyskania korzyści z koncepcji *SLN* w RSZM trwają. Kato i wsp. sugerują na przykład, że w stadium FIGO IB1 RSZM powinno się usunąć węzły chłonne z kilku miejsc anatomicznych, niezależnie od zastosowania procedury *SLND* [50]. Kwestie te są szerzej opracowane w dalszej części niniejszej rozprawy doktorskiej.

Jak można wywnioskować z powyższych rozważań, próby wykorzystania koncepcji *SLN* napotykały pewne problemy, a sama koncepcja – niesie z sobą pewne niejasności. Na dzisiaj nie jest możliwe powiedzenie, w jakich stanach zaawansowania RSZM należy zastosować procedurę *SLND*. Wydają się więc potrzebne dalsze próby testowania tej procedury w RSZM, aby sprawdzić jej przydatność, tak jak miało to miejsce w raku piersi. W Klinice, w której zebrano materiał do niniejszej pracy doktorskiej, rutynowym postępowaniem jest podawanie niebieskiego barwnika w każdym przypadku operacyjnego RSZM. Jest to bezpieczne i tanie postępowanie, a z doświadczenia Kliniki, także popartego wcześniejszymi rozważaniami i wynikami badań, można stwierdzić poprawę jakości (dokładności) operacji dzięki lepszemu uwidocznieniu istotnych węzłów chłonnych [51,52].

Podejście to znajduje również odzwierciedlenie w międzynarodowych programach badawczych, jakim jest np. badanie SENTICOL 2 (*Ganglion Sentinelle dans le Cancer du Col*). Zakłada ono porównanie techniki *SLND* łączonej z pełną limfadenektomią z użyciem tylko techniki *SLND* u pacjentek z RSZM.

2.5. Rola mikroprzerzutów w węzłach chłonnych w raku szyjki macicy

Według definicji *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* ustalonej dla raka piersi, mikroprzerzuty określa się mianem depozytów nowotworowych w węzłach chłonnych o wielkości większej niż 0,2 mm lecz nie większej niż 2 mm [53]. Rola mikroprzerzutów w węzłach chłonnych, a zwłaszcza *SLN* była przedmiotem wielu prac badawczych [54-57]. W tych badaniach skupiono się na: 1) możliwości przewidywania dalszych przerzutów w innych węzłach chłonnych, a więc ocenie bezpieczeństwa onkologicznego zastosowania tej procedury, 2) próbie wykazania, że węzły chłonne zawierające mikroprzerzuty mają znaczenie predykcyjne i rokownicze zbliżone do makroprzerzutów (> 2 mm) [54,58]. Oba te cele były dotychczas najlepiej określone i najpełniej zrealizowane w cytowanych badaniach Prof. D. Cibuli.

„Wyizolowane” lub „izolowane komórki nowotworu” (współistnieją dwie nazwy w literaturze przedmiotu, *ITC – isolated tumor cells*), definiowane są jako „zlewne” skupisko komórek o średnicy 0,2 mm lub mniejszej, lub pojedyncze komórki, nie powodujące „zagnieżdżenia się” komórek raka w węzle chłonnym, a tym samym powiększenia go. Powiększenie węzła chłonnego (> 10 mm w osi krótkiej) następuje dopiero wówczas, gdy rozwija się w nim makroprzerzut, definiowany jako obecność skupiska komórek nowotworowych mierzącego więcej niż 2 mm. W wielu przypadkach jednak makroprzerzuty (jak również mikroprzerzuty) nie powodują powiększenia

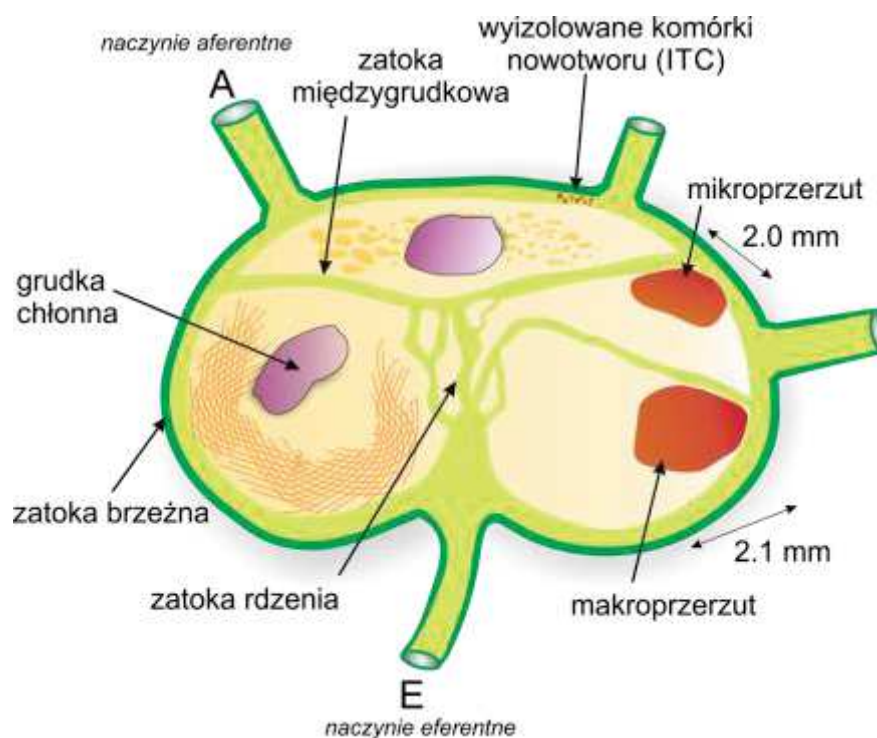
węzłów chłonnych, sprawiając, że węzły chłonne są klinicznie nieme i traktowane jako niezajęte (klinicznie N0). Wszystkie węzły chłonne zajęte przez komórki nowotworowe a niewykryte w badaniach klinicznych nazywane są „przerzutami utajonymi” lub „klinicznie niejawnymi” (*clinically occult*) [59]. Wątpliwości w określaniu statusu węzłów chłonnych budzą jedynie *ITC*, których nie uważa się za przerzut, ale ich obecność odnotowywana jest w klasyfikacji *AJCC* i *UICC*.

W Tabeli 2. zawarto cechy *ITC* i mikroprzerzutów, które zasadniczo różnią się od siebie (na podstawie pracy Hermanek i wsp. [60]). Na Rycinie 1. w uproszczony sposób przedstawiono węzeł chłonny oraz definicje tzw. „zdarzeń” w węzłach chłonnych – makroprzerzutów (*MAC*), mikroprzerzutów (*MIC*) oraz *ITC*.

Tabela 2. Cechy wyizolowanych komórek nowotworu i mikroprzerzutu [60].

Cecha	Wyizolowane komórki nowotworowe	Mikroprzerzut
Wielkość	≤0,2 mm	>0,2 mm, ≤2 mm
Kontakt ze ścianą zatoki*	-	+
Naciekanie ściany zatoki*	-	+
Reakcja podścieliska	-	+
Proliferacja poza zatokę*	-	+

*Dotyczy zatoki brzeżnej, międzygrudkowej lub rdzennej.



Rycina 1. Schematyczne przedstawienie węzła chłonnego wraz z rozróżnieniem zmian nowotworowych na makroprzerzut, mikroprzerzut i wyizolowane komórki nowotworu.

Kontakt ze ścianą zatoki brzeżnej lub dalsza penetracja komórek nowotworu do zatok międzygrudkowych i rdzennych doprowadza do implantacji komórek w zrąb węzła chłonnego. Pomimo posiadania definicji i znajomości różnic biologicznych, istnieje jednak wciąż wiele niewiadomych odnoszących się do roli mikroprzerzutów w węzłach chłonnych. Zarówno twierdzenia dotyczące użyteczności koncepcji *SLN*,

poparte wynikami cytowanych wcześniej badań, jak i kontrowersje, przedstawiono w Tabeli 3.

Tabela 3. Stwierdzenia i kontrowersje dotyczące roli mikroprzerzutów w węzłach chłonnych w raku szyjki macicy.

Stwierdzenie	<ul style="list-style-type: none"> ■ Warto badać <i>SLN</i> pod względem obecności mikroprzerzutów, gdyż ich wykrycie poprawia szansę na całkowite wyleczenie. Z drugiej strony wykrycie przerzutu każdej wielkości (w wyjątkiem <i>ITC</i>) pogarsza rokowanie w porównaniu do sytuacji, gdy rak nie dał przerzutów do węzłów chłonnych (istnieją dowody EBM klasy II). ■ Mikroprzerzuty do <i>SLN</i> mogą być tak samo ważne dla precyzji określania charakteru postępowania klinicznego co przerzuty o większej średnicy – tj. makroprzerzuty (istnieją dowody EBM klasy II).
Kontrowersje	<ul style="list-style-type: none"> ■ Czy badać <i>nSLN</i> na obecność mikroprzerzutów tylko przy dodatnich <i>SLN(s)</i> czy przy ujemnych również? ■ Jakiego powinno być leczenie po stwierdzeniu tylko mikroprzerzutów – w <i>SLN</i> oraz w <i>nSLN</i> (zakładając, że należy badać <i>nSLN</i> na obecność mikroprzerzutów?)

2.6. *Ultrastaging* i jego kontekst kliniczny

Ultrastaging jest bardziej dokładną metodą obróbki histologicznej preparatu tkankowego (np. węzłów chłonnych) niż metoda rutynowo stosowana w praktyce. *Ultrastaging* polega na „seryjnym” skrawaniu preparatu węzła chłonnego co niewielki odstęp (od 40 do 250 μm) na „ultracienkie” plasterki, a następnie barwieniu ich hematoksyliną i eozyną (HE) lub/i technikami immunohistochemicznymi (*IHC*). Ta metoda ze względu na swoją czasochłonność, była stosowana w przypadku *SLN*, natomiast dużo rzadziej stosowano ją w przypadku wszystkich węzłów chłonnych. Ultracienkie skrawanie pozwala na znalezienie *MICs* lub pojedynczych skupisk komórek nowotworowych. Metoda ta, z użyciem technik *IHC* (np. zastosowanie przeciwciał przeciwko cytokeratynom – białkom strukturalnym komórki), pozwala na znalezienie dodatkowych ognisk przerzutowych w węzłach chłonnych w średnio 10%-20% przypadków raka [61,62].

Do innych możliwych do zastosowania technik wykrywania przerzutów należą, poza *ultrastagingiem* histologicznym, także badania molekularne, np. ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (*RT-PCR*), pozwalające zidentyfikować *DNA* wirusa *HPV* lub transkrypty (*mRNA*) CK19 [34,63].

Techniki bazujące na metodzie *PCR* są w stanie wykryć *DNA* wirusa *HPV* w węzłach chłonnych ujemnych pod względem histologicznym. Häfner i wsp. zbadali 70 pacjentek z RSZM (70% stanowił wczesny rak), u których usunięto 140 węzłów chłonnych. Badacze porównali wyniki z 10 zdrowymi pacjentkami. Wykazali oni, że markery molekularne (*mRNA* CK19 i *mRNA* *HPV* 16 E6) różniły się poziomem ekspresji w ujemnych histologicznie węzłach chłonnych – ponad dwukrotnie mniejszy odsetek dodatnich wyników ekspresji miała *HPV* 16 E6 (33,9%) niż CK19 (80,4%), co wskazywało na wyższą specyficzność oznaczenia *HPV* 16 E6 [64]. Nie porównywano jednakże ekspresji tych markerów molekularnych z markerami histologicznymi w warunkach *ultrastagingu* z uwzględnieniem rachunku koszt-efektywność, choć sam

PCR w ultrastagingu był przeprowadzony na grupie 30 chorych z bardzo dobrym skutkiem diagnostycznym [65]. Taka analiza byłaby niewątpliwie bardzo wartościowa w odniesieniu do opracowania standardu postępowania diagnostycznego.

Analizowane są również nowe markery: w płaskonabłonkowym raku jamy ustnej oceniano procent immunodetekcji markera *DSG3* i stwierdzono, że ten marker w 100% dyskryminuje wolne węzły chłonne od przerzutowych [66]. Nie przeprowadzono odpowiadających analiz dla *DSG3* w przypadku RSZM. P16, marker nieodwracalności progresji zmiany przedinwazyjnej (*HG SIL*), okazał się dobrym markerem przewidywania przerzutów w węzłach chłonnych, ale nie badano go jak dotąd w węzłach chłonnych jako markera komórek RSZM w *ultrastagingu* [67,68]. Obecnie można powiedzieć, że standardową metodą oceny węzłów chłonnych w *ultrastagingu* w przypadku RSZM jest IHC.

Znaczenie *MICs* jest jednak wciąż kontrowersyjne, tak jak sama koncepcja *SLN*. Według jej zwolenników oraz zwolenników seryjnego skrawania węzłów chłonnych w RSZM, metody te wzajemnie się uzupełniają, pozwalają na wykrycie różnych dróg przerzutowania i umożliwiają znalezienie mikroprzerzutów oraz *ITC*. Znaczenie tych pierwszych wydaje się już bliższe ustalenia po cytowanych wyżej publikacjach, trzeba jednak podkreślić, że zostało ono określone dla węzłów chłonnych wartowniczych [40,54]. Znaczenie *ITC* wciąż nie jest wyjaśnione – jednak ich wykrycie i ujawnienie niekorzystnego wpływu na rokowanie może być jeszcze trudniejsze i bardziej czasochłonne niż *MICs*. Dostępność techniki i umiejętne jej wykorzystanie mogą poprawić ogólną wykrywalność przerzutów w węzłach chłonnych, o ile używa się wszystkich dostępnych metod wyznakowywania węzłów chłonnych. Taka idealna procedura polegałaby na znakowaniu radioaktywnym technetem, podawaniu barwiącego znacznika oraz planowaniu przebiegu procedury *SLND* w przedoperacyjnej limfoscyntygrafii z późniejszym wykonaniem śródoperacyjnego wykrywania *SLN* i *nSLN* detektorem promieniowania γ oraz pod kontrolą wzroku [39].

Obustronność wybarwienia lub/i radio-oznaczenia *SLN*, uznawaną za jeden z wyznaczników jakości procedury, udaje się uzyskać w szerokim zakresie w różnych badaniach (od 47,4% do 80,8%), głównie w zależności od liczby użytych technik [49, 69-73]. Nieliczni autorzy poświęcili swoje prace badawcze na uwagi na temat ograniczeń w skuteczności procedury. Pogarszają ją (niepowodzenie w wykrywaniu – węzły chłonne fałszywie ujemne) – niewytrenowanie chirurga w biopsji węzłów chłonnych [74], duże węzły chłonne (które powodują, że znacznik penetruje do przymacicz i wykrywa się węzły tam umiejscowione) [74], duża objętość guza pierwotnego (> 2 cm [46,48,69], a według niektórych badaczy > 3cm [70]), co ma później znaczenie w dobieraniu odpowiedniego leczenia do stanu zaawansowania choroby. Na jakość procedury *SLND* wydaje się nie mieć wpływu liczba użytych technik, pod warunkiem dobrego podania znacznika (równomierne podanie na zewnątrz guza, ewentualnie w sklepienia pochwy jak najbliżej guza, jeśli to jest możliwe) [70], choć większość autorów łączy dwie lub trzy metody dla poprawienia efektu diagnostycznego. Nie jest jednak pewne, czy mnogość użytych technik podnosi krzywą uczenia się tej procedury, gdyż nie wszyscy zgadzają się co do tego [71]. Inne markery, umożliwiające zakwalifikowanie pacjentek do grupy wysokiego ryzyka przerzutów do

węzłów chłonnych i wystąpienia wznowy, takie jak *squamous cell carcinoma antigen (SCC-Ag)*, mogą służyć nie tylko w charakterze „detektorów” komórek nowotworowych, ale również przydatne jako dodatkowe czynniki predykcyjne [74]. Grueneisen i wsp. twierdzą, że badanie PET-RM pozwala na identyfikację węzłów przerzutowych (cN1) w 80% przypadków, a także umożliwia wykrycie przerzutów w węzłach chłonnych innych niż regionalne [75]. Odmienne zdania są jednak inni badacze, choć odnoszą swoje wyniki do badania fuzyjnego PET-TK w RSZM. Na przykład Driscoll i wsp. uważają (za Sironim i wsp.), że PET-TK nie wykrywa przerzutów mniejszych niż 5 mm w węzłach chłonnych – a więc wszystkich mikroprzerzutów i części makroprzerzutów [76,77]. Cytowani powyżej Grueneisen i wsp. w innym badaniu (dotyczącym raka piersi) porównali wyniki dokładności *stagingu* w badaniach PET-RM i PET-TK oraz samego RM. Nie stwierdzili wyższości badań fuzyjnych nad samym RM w ocenie dokładności opisu cechy T nowotworu [78]. Autor nie zna takiego badania dla RSZM i nie może powiedzieć, czy PET-TK lub PET-RM stanie się wkrótce metodą referencyjną *stagingu*, ani też, czy kiedyś PET zastąpi np. *ultrastaging* immunohistochemiczny w tym nowotworze.

2.7. Uzasadnienie podjęcia badań

Częstość zmian przednowotworowych i inwazyjnych w szyjce macicy można przyjąć za względnie stałą w populacji (szczepienia przeciwko wirusom *HPV* 16 i 18 obejmują jak na razie jedynie wycinek polskiej populacji), ale następuje zauważalne przesunięcie rodzaju rozpoznań w stronę stanów przedinwazyjnych. Z powodu zwiększenia częstości rozpoznawania stanów przedrakowych i wczesnego RSZM (ograniczonego do szyjki macicy), dzięki wprowadzaniu zasad profilaktyki ujętych w Narodowym Programie Zwalczania Chorób Nowotworowych, u coraz większej liczby kobiet będzie dochodzić do decyzji leczniczych dotyczących zachowania płodności lub wykonania operacji oszczędzających.

Rak wczesny określony jest jako ograniczony do narządu, z którego się wywodzi – w przypadku RSZM jest to stopień I wg klasyfikacji *FIGO* oraz *AJCC/UICC*, a także Międzynarodowej Agencji do Badań nad Rakiem (*IARC – International Agency for Research on Cancer*). Radykalne usunięcie macicy w połączeniu z usunięciem węzłów chłonnych miednicznych (wycięcie regionalnych węzłów chłonnych) pozostaje standardową metodą leczenia kobiet chorych na RSZM we wczesnym stadium. Procedury lecznicze stają się jednak obecnie bardziej dopasowane do stanu zaawansowania klinicznego choroby. Dotyczy to zarówno aspektów miejscowych rozwoju RSZM (najmniejszy bezpieczny zakres resekcji raka), jak i węzłów chłonnych (najmniejsza bezpieczna liczba węzłów chłonnych), a także obejmują kwestie odległych następstw fizycznych i psychicznych u chorych.

W RSZM korzyści z procedur oszczędzających mogą płynąć przede wszystkim ze zwiększenia dokładności oceny węzłów chłonnych, gdyż aby usunąć mniejszy zakres zdrowych tkanek, należy być pewnym bezpieczeństwa takiego postępowania. Redukcja niepotrzebnego zakresu operacji może potencjalnie dotyczyć każdego stadium nowotworu. Pierwszą korzyścią jest obniżenie ryzyka powikłań pooperacyjnych, ale

z punktu widzenia korzyści diagnostycznych jest nią możliwość potencjalnego wykrycia istotnych dróg chłonnych i zbadania węzłów chłonnych w tych drogach, a kolejną – swego rodzaju selekcja (*triage*), dotycząca wyboru leczenia dla chorej (a nie chorej do leczenia, medycyna spersonalizowana), trzecią zaś – podkreślaną przez niektórych ginekologów-onkologów – potrzeba badań nad *SLN* w nowotworach złośliwych żeńskich narządów płciowych z uwagi na to, że znaczna część chorych kobiet znajduje się w wieku reprodukcyjnym i planuje zajście w ciążę [79].

Identyfikacja tych pacjentek z wczesnym RSZM, u których można by zaniechać pełnego leczenia regionalnego pod względem węzłów chłonnych, byłaby wymiernym efektem zastosowania procedury *SLND*. Korzyści, które można osiągnąć przez zaoszczędzenie węzłów chłonnych (tam, gdzie jest to możliwe) są podobne do tych osiągniętych w przypadku chorych na inne nowotwory, np. raka piersi. Tabela 4. przedstawia powikłania radykalnych interwencji chirurgicznych w RSZM [80]. Tych powikłań można by przynajmniej częściowo uniknąć poprzez wprowadzanie i udoskonalanie nowych technik operacyjnych, do których należy *SLND*.

Tabela 4. Powikłania związane z wycięciem węzłów chłonnych (zakres rozszerzonego usunięcia macicy) [80].

Charakter powikłania	Objawy (manifestacja kliniczna)
Zwiększone krwawienie związane z preparowaniem węzłów chłonnych	Krwiak wymagający lub niewymagający drenażu; niedokrwistość; objawy choroby zakrzepowo-zatorowej
Uszkodzenia sąsiadujących narządów – przede wszystkim moczowodu	Wyciek moczu z przeciętego moczowodu lub zakażenie układu moczowego
Uszkodzenia nerwów	Zaburzenia ruchowe lub czuciowe
Ból pooperacyjny	Różne nasilenie i umiejscowienie bólu
Obrzęk limfatyczny kończyn dolnych (zwłaszcza po następnej radioterapii pooperacyjnej)	Obrzęk kończyn dolnych wymagający zabiegów z zakresu rehabilitacji i fizykoterapii
Torbiele limfatyczne	Dyskomfort, ból brzucha, zakażenie
Zakażenie miednicy	Zespół bólowy miednicy mniejszej
Zwiększone ryzyko ponownej operacji	-

Zarówno sama technika *SLND*, jak i założenie, iż można się na niej oprzeć w określaniu rodzaju leczenia, są jednak obarczone pewnym ryzykiem błędu. Niedopracowanie techniki, czynnik ludzki (polegający na niedostatecznym wyuczeniu się techniki i braku doświadczenia), zbyt daleko idące wnioski wysuwane na podstawie jedynie oceny *SLNs* w trakcie operacji (badanie śródoperacyjne) albo po niej (badanie pooperacyjne) tylko wybranego poprzez znakowanie fragmentu spływu chłonnego, może doprowadzić do błędnej (nieoptymalnej) oceny zaawansowania kliniczno-patologicznego choroby. Może tak dziać się zwłaszcza w kontekście adekwatności operacji lub zastosowania leczenia adjuwantowego (głównie chemioradioterapii). Odsetek detekcji możliwych do wykrycia mikroprzerzutów podczas badania śródoperacyjnego może być bardzo niski i sięgać 33% [69], a czułość tego badania pod tym względem może wynosić 20,7% [81]. Niektórzy jednak uzyskują

wyniki znacznie wyższe – blisko 100% czułości [72]. Szacuje się, że częstość stwierdzenia mikroprzerzutów określanych jako ujemne w badaniu rutynowym wynosi około 4 – 15% [38]. *Ultrastaging*, poza dokładną oceną *SLN*, którą oferuje, może okazać się niezbędny w ocenie wszystkich węzłów chłonnych i być zalecony do w rutynowej praktyce klinicznej. Głównymi i uniwersalnymi celami zastosowania tej metody może być optymalny *staging*, co pozwala na określenie zasięgu operacji dotyczącej węzłów chłonnych i pola radioterapii. Kolejna korzyść z procedury *SLN* może się więc także odnosić do wyższych niż wczesne stadiów raka.

Wydaje się jednak, że aby wiarygodnie wypowiedzieć się o stanie przerzutów do węzłów chłonnych, należy zbadać pewną ich liczbę. Jest ona nieznaną dla RSZM, choć dla np. raka piersi sugerowane jest usuwanie nie więcej niż 5 *SLNs* oraz tych, które są podejrzane palpacyjnie [82,83]. Krytycy koncepcji *SLN* w RSZM podkreślają fakt, że trudno jest wiarygodnie przewidzieć drogi szerzenia się przerzutów RSZM, gdyż zmienia się funkcjonalność tych dróg wskutek licznych chorób zapalnych w życiu kobiety, przebytych operacji, a same węzły chłonne – uznane za wartownicze i ujemne – w rzeczywistości mogą nie być prawdziwie wartownicze. Może być to spowodowane różnorodnymi drogami spływu chłonki i niemożliwą do stuprocentowego określenia szansą na wykrycie wszystkich możliwych dróg, nawet przy użyciu wszystkich dostępnych technik identyfikacji. Na poparcie tych tez nie ma jednak zbyt wielu dowodów. Znane jest natomiast zjawisko tzw. unieczynnienia węzłów chłonnych, bądź występowania przerzutów przeskakujących (*skip metastases*), co przyczynia się do zwiększenia odsetka wyników fałszywie ujemnych i zmniejszenia odsetka detekcji prawdziwych *SLN* [61,84]. Niskie zliczenia wychwyty radio-znacznika oraz wyższa częstość wykrywania przerzutów „w drodze” (w drogach chłonnych, *in-transit*) u starszych pacjentów w porównaniu z młodszymi została stwierdzona w badaniach dotyczących *SLN* w czerniaku skóry [84], więc można przypuszczać istnienie podobnych zależności w RSZM. Do pozostałych czynników zwiększających liczbę wyników fałszywie ujemnych, mogą należeć zatory z komórek nowotworowych i niewłaściwe wykonanie badania histopatologicznego lub niedostateczne doświadczenie zespołu zajmującego się leczeniem. Poznanie przyczyn uzyskiwania wyników fałszywie ujemnych i warunków do ich zaistnienia pozwoli umiejętnie ominąć trudności poprzez lepsze dostosowanie techniki do pacjentki i warunków operacji.

Do tej pory opublikowano 10 prac badawczych na temat *ultrastagingu* węzłów *nSLN* w RSZM w stadiach obejmujących wczesne postaci raka (autorstwa Fregnani i wsp., nie opierała się na badaniu *nSLN*, ale wszystkich węzłów chłonnych) [20,52,65,70,71,86-90]. Przegląd tych badań naukowych przedstawiono w Tabeli 5. Niewiele jest analiz poświęconych mikroprzerzutom pomiędzy anatomicznymi lokalizacjami guza nowotworowego a węzłami chłonnymi towarzyszącymi naczyniom krwionośnym w miednicy i przymaciczach. Częstość mikroprzerzutów w tych miejscach szacuje się, podobnie jak w węzłach chłonnych, na 17% w całym stopniu I wg klasyfikacji *FIGO* [85]. Zdaje się to potwierdzać założenie stopniowości szerzenia się przerzutów w RSZM poprzez przymacicza (głównie drogami chłonnymi), a następnie *SLN*, *nSLN* aż do naczyń chłonnych wyższych pięter układu chłonnego i do układu krążenia.

Tabela 5. Dotychczasowe badania, w których u chorych wykonano ultracienkie skrawanie wszystkich węzłów chłonnych (w tym *SLN* i *nSLN*) i oznaczenie w hematoksylinie i eozynie, immunohistochemicznie lub w inny sposób. Prace dotyczą stadiów raka wg klasyfikacji *FIGO*, w których ujęto przypadki IA2 i IB1 [20,52,65,70,71,86-90].

Autor	Stadium raka	N pacjentek	Pacjentki z MAC N+	Pacjentki z mic N+	Metoda	Skrawanie co odstęp	Odsetek dodatnich węzłów <i>nSLN</i> przy ujemnych <i>SLN</i>	N węzłów	Pozycja piśmiennictwa
Cibula i wsp., 2016	IB1 \geq 3 cm, IB2, IIB	17	1	4	HE & IHC (CK AE1-AE3)	150 μ m	0	573	[90]
Śniadecki i wsp., 2014	IA-IIA	12	3	2(1)*	HE lub/i IHC (CK AE1-AE3)	150 μ m	8	280	[52]
Lou i wsp., 2013‡	Wczesny	30	9	68	PCR (CK19)	nieznany	18,2	268	[65]
Martínez i wsp., 2010	IA2-IB1	41	4	2	IHC (CK AE1-AE3)	200 μ m	0	798	[71]
Ogawa i wsp., 2010	IA-IIB	82	31	8	HE	Niewystarczające dane	0	157	[70]
Okamoto i wsp., 2009	IB1	10	1	1	HE i IHC (CK AE1-AE3)	200 μ m	0	309	[86]
Fregnani i wsp., 2006†	IB-IIA	289	37	11	HE i IHC (CK AE1-AE3)	nd	nd	5599	[87]
Popa i wsp., 2006	I-IIA	36	0	0	HE i IHC	40 μ m dla HE -6 poziomów, dodatkowy poziom pomiędzy 3. i 4. - oceniany przy pomocy IHC (AE1/3)	0	\geq 926 (Obliczone z niebezpośrednich danych)	[88]
Marchiolé i wsp., 2004	IA1-IB1	29	3	5	HES i IHC (CK AE1-AE3) w węzłach ujemnych pod wzgl. przerzutów w badaniu rutynowym	200 μ m	13	574	[89]
Barranger i wsp., 2003	IA2-IIA	13	0	0	HE i IHC (CK AE1-AE3) w węzłach ujemnych pod wzgl. przerzutów w badaniu rutynowym	3 mm	0	21	[20]

Objaśnienia: CK - cytokeratyna; HES – hematoksylina-eozyna-safron; MAC N+ – makroprzerzuty do węzłów chłonnych; mic N+ – mikroprzerzuty do węzłów chłonnych; nd – niewystarczające dane; *jeden dodatkowy mikroprzerzut do makroprzerzutu w jednym z węzłów chłonnych; ‡ artykuł w języku chińskim, dostępne jest tylko jego streszczenie; † w tej pracy zbadano wszystkie węzły chłonne w *ultrastagingu* bez wykonywania procedury znakowania węzłów chłonnych wartowniczych.

W konsekwencji tego podkreśla się także potrzebę obrania takiego kierunku badań, w wyniku którego można będzie ocenić lub przewidzieć szanse na wykrycie przerzutów we wszystkich stacjach limfatycznych potencjalnie znajdujących się w spektrum przerzutowania raka oraz możliwe będzie usunięcie zagrożonych przerzutami węzłów chłonnych. Ich spodziewana liczba powinna zostać określona dla każdego przypadku lub przynajmniej dla grupy przypadków, gdyż rokowanie może różnić w zależności od liczby zajętych węzłów chłonnych [91-93]. Nie jest także określone postępowanie z chorymi w przypadku niewielkiego zaawansowania choroby w węzłach chłonnych wartowniczych – czy idąc za koncepcją *SLN* w raku piersi można zrezygnować z kolejnej lub dalszej operacji na rzecz leczenia adjuwantowego?

Na tle powyższych rozważań warto się zastanowić, jaką właściwie treść i wartość niesie z sobą szczegółowe badanie wszystkich węzłów chłonnych? Czy podnosi ono poziom bezpieczeństwa onkologicznego przez swoją dokładność, czy jest niepotrzebne? Czy na jego podstawie można szybko i pewnie zdecydować o tym, jaki zakres węzłowy powinna mieć operacja?

Aby odpowiedzieć na te pytania, należy najpierw zadać podstawowe pytanie, będące pierwszym z dwóch celów rozważań niniejszej rozprawy doktorskiej. Brzmi ono następująco: „Jaka jest częstość występowania i jakie czynniki mogą wpływać na występowanie mikroprzerzutów we wszystkich usuniętych węzłach chłonnych, w szczególności *nSLNs*?”

Drugie pytanie powinno się odnosić do szczegółów technicznych badania, które pozwala na powyższą ocenę i brzmi następująco: „Jakimi metodami lub metodą należy się posłużyć, aby w sposób możliwie najbardziej obiektywny i powtarzalny dokonać dokładnej oceny węzłów chłonnych pod kątem obecności choroby?”

3. Hipotezy badawcze

Hipotezy niniejszej pracy doktorskiej dotyczą kwestii zasadności, wykonalności i użyteczności kliniczno-patologicznej oceny węzłów chłonnych pozawartowniczych (*nSLN*) we wczesnym RSZM. Są to hipotezy negatywne (H_0), których autor, kierując się krytycznym punktem widzenia, zakłada, iż nie znajdzie podstaw do ich odrzucenia albo je odrzuci, jeśli wyniki na to wskażą. Zawierają się one w poniższych stwierdzeniach:

1. Mikroprzerzuty w *nSLN* w RSZM w stadium *FIGO* IA2-IB1 są stwierdzane niezależnie od *SLN* – przemawiałoby to za brakiem zastosowania koncepcji *SLN* w RSZM w celu przewidywania dalszych przerzutów po ocenie *SLN*.
2. Rozszerzenie badania preparatu węzłów chłonnych o jego ultracienkie skrawanie i techniki immunohistochemiczne według określonego protokołu nie jest wskazane w przypadku RSZM w stadium IA2-IB1 wg *FIGO*.

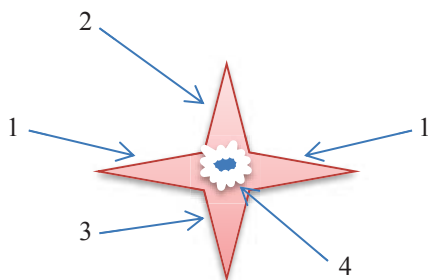
4. Uwagi anatomiczne i trudności związane z koncepcją wartowniczego węzła chłonnego

4.1. Drogi szerzenia się raka szyjki macicy

Rak szyjki macicy jest nowotworem, który na początku swojego rozwoju jest ograniczony do narządu, z którego się wywodzi. Szerzy się przez ciągłość oraz przez przerzuty nowotworowe. Najczęściej nacieka gniazdami komórek nowotworowych, rzadziej prezentuje typ rozprężający. Przez pierwszy z typów wzrostu łatwiej osiąga dostęp do przestrzeni naczyniowych, z czym wiąże się ryzyko przerzutów do węzłów chłonnych i przerzutów odległych. Istnieje kilka dróg szerzenia się RSZM: 1) bocznie do przymacicz, powodując wciągnięcie moczowodu w proces nowotworowy i zastój moczu w moczowodzie, a później w nerce (powstanie wodonercza), 2) do przodu w wymiarze strzałkowym, naciekając otrzewną pęcherza moczowego i pęcherz moczowy (wywołując krwimocz), 3) do tyłu w tym samym wymiarze, naciekając odbytnicę (doprowadzając do zaparć, niedrożności jelita na poziomie odbytnicy), 4) bocznie, powodując naciekanie nerwów (neuralgia), oraz 5) do dołu w kierunku pochwy (powodując krwawienia). Przerzuty do węzłów chłonnych stanowią drugą ważną drogę szerzenia się raka. Zagadnieniu temu poświęcono więcej uwagi w następnych podrozdziałach. Przerzuty do otrzewnej, typowe dla raka jajnika, zdarzają się w RSZM niezwykle rzadko [94].

4.2. Spływ chłonny z szyjki macicy i nazewnictwo węzłów chłonnych

Rozmieszczenie regionalnych węzłów chłonnych dla RSZM jest rozległe. Obszar spływu chłonnego obejmuje węzły umiejscowione w miednicy wzdłuż naczyń krwionośnych zasłonowych, biodrowych zewnętrznych, wewnętrznych i wspólnych. Rycina 2. oraz objaśnienia obok przedstawiają najczęstsze drogi spływu chłonki, które są opisywane przez anatomów [95].



- 1) Główna droga wiedzie poprzez boczne przymacicza do węzłów chłonnych biodrowych zewnętrznych, międzybiodrowych i zasłonowych;
- 2) przedni spływ prowadzi poprzez więzadło pęcherzowo-maciczne do węzłów chłonnych biodrowych zewnętrznych;
- 3) tylny spływ wiedzie przez więzadło krzyżowo-maciczne do węzłów chłonnych biodrowych wspólnych, krzyżowych i przyaortalnych;
- 4) guz nowotworowy.

Rycina 2. Ogólny zarys dróg szerzenia się raka szyjki macicy z guza pierwotnego.

Podejście klinicystów różni się jednak w znacznym stopniu od tego reprezentowanego przez anatomów i jest bardziej czynnościowe. Na przykład w pracy Ercoli i wsp., przeprowadzonej na zwłokach, wyróżniono tzw. „efektywne” drogi chłonne. Do tej grupy należą tylko drogi określone jako „nad- i pod-moczowodowe przymaciczne”, co odpowiada drodze „1” (– p. objaśnienia obok Ryciny 2.), a wzdłuż

więzadeł pęcherzowo-maciczych i krzyżowo-maciczych takie drogi w ogóle nie biegną [96]. Stwierdzenie, że dane naczynia są wykorzystywane przez nowotwór, a inne nie, jest nowe. Wpisuje się ono w nowe podejście do anatomii szerzenia się raka. Anatomia w ujęciu klinicznym odnosi się więc to teorii „kompartamentów”, którego autorem jest prof. Höckel. Według tej teorii macicę i przymacicza należy traktować segmentalnie oraz rozumieć miejscowe szerzenie się i przerzuty nowotworu jako proces ciągnący się wzdłuż pewnych zamkniętych przestrzeni, powięzi, oraz naczyń i nerwów, gdzie następuje osłabienie tkanek, a nie w sposób skokowy [97]. Rozumienie procesu przerzutowania jest ważne z punktu widzenia onkologii i biologii, stawia także w nowym świetle temat podjęty w niniejszej pracy doktorskiej.

Do regionalnych węzłów chłonnych w RSZM należą: węzły chłonne w obrębie miednicy (miedniczne) i węzły chłonne przyaortalne. Wśród miednicznych węzłów chłonnych w tym obrębie wyróżnia się biodrowe zewnętrzne, wspólne, a także „międzybiodrowe” (wyróżniane przez część badaczy), oraz zasłonowe – i mniej typowo zajmowane przez przerzuty nowotworowe – węzły chłonne przymacicza oraz przedkrzyżowe [98]. Węzły chłonne przyaortalne zaczynają się na wysokości rozwidlenia aorty i towarzyszą obu naczyniom głównym. Przerzuty do nich powstają w dalszych fazach ekspansji nowotworu.

Podział anatomiczny jest inny niż czynnościowy, gdyż *SLN* potencjalnie może znajdować się na różnych poziomach spływu chłonnego. Procedura *SLND* może w znaczeniu czynnościowym obejmować trzy grupy węzłów chłonnych: 1) sam *SLN*, 2) węzeł chłonny po(za)wartowniczy (wybarwiony węzeł chłonny na wyższym poziomie po usunięciu *SLN*, z języka francuskiego *second echelon*) i 3) węzeł chłonny niewartowniczy (w istocie termin ten dotyczy każdego węzła chłonnego poza wartowniczymi). Wszystkie typy węzłów chłonnych można określić jako pojedyncze lub mnogie na każdą ze stron.

4.3. Przerzuty do regionalnych węzłów chłonnych

Komórka nowotworowa RSZM posiada szczególne cechy właściwe dla nowotworów nabłonkowych, nadające jej zdolność do tworzenia przerzutów, w tym do węzłów chłonnych. Należą do nich: zdolność odłączania się od masy guza, produkcja czynników tkankowych i enzymów (m.in. degradujących macierz pozakomórkową), przeciskanie się przez połączenia komórek śródbłonka naczyniowego, przeżywanie w łożysku naczyniowym, zakotwiczenie się w miejscu docelowym i stymulacja procesu angiogenezy (limfangiogenezy) zależnej od nowotworu [99].

Komórki raka płaskonabłonkowego szyjki macicy cechują się limfotropizmem. Głównym aspektem w kontekście przerzutu nowotworowego do węzła chłonnego jest produkcja cytokin i receptorów przez komórkę nowotworową (np. naczyniowy czynnik wzrostu komórek śródbłonka *VEGF-C* – *vascular endothelial growth factor-C*). Komórki raka na zasadzie diapedezy i dzięki zwiększonemu ciśnieniu płynu pozakomórkowego pomiędzy frontem guza (najdalszego gniazda nowotworowego) a naczyniem włosowatym, wpływają do układu kapilarnych naczyń chłonnych, penetrując z biegiem tego układu do pierwszego węzła chłonnego – *SLN*. Następnie

dochodzi do procesu implantacji komórek nowotworowych w węzle chłonnym, w którym odgrywają rolę chemokiny, m.in. *CCL21 – chemokine (C-C motif) ligand 7*. Miejscem powstawania przerzutu są zatoki rdzenne węzła chłonnego [11].

Przerzuty do węzłów chłonnych stanowią ważne ogniwo w przerzutowaniu RSZM. Ryzyko ich pojawienia się rośnie wraz z głębokością naciekania oraz wielkością nowotworu (nacieku). Jest ono zróżnicowane dla różnych stadiów zaawansowania – w stopniu IA1 (naciekanie raka ≤ 3 mm, największy wymiar guza do 7 mm włącznie) wg klasyfikacji *FIGO* – ok. 1%, dla IA2 (naciekanie raka ≤ 5 mm, największy wymiar guza do 7 mm włącznie) – do ok. 8%. Ryzyko przerzutów zmienia się jednak znacząco, gdy guz nowotworowy zalicza się do stadium wyższego niż IA2. Szacowany odsetek przerzutów do węzłów chłonnych przedstawia Tabela 6.

Tabela 6. Szacowane odsetki stwierdzenia przerzutów do węzłów chłonnych dla różnych stadiów raka szyjki macicy wg klasyfikacji *FIGO* [39-42,100].

Stadium zaawansowania raka szyjki macicy	Odsetek stwierdzanych przerzutów (%)
IA1	1 – 2,6
IA2	1 – 8
IB1	4 – 15
IB2	12 – 20
II	20 – 27
III – IV	90 – 95

Objaśnienia: *FIGO* – Międzynarodowa Federacja Ginekologii i Położnictwa.

Rak szyjki macicy nie zawsze ma tendencję do dawania przerzutów w określonym porządku. Szerzy się przez ciągłość, naciekając najpierw przymacicza (przede wszystkim drogą przestrzeni okołonaczyniowej limfatycznej, *lymphovascular space invasion, LVSI*, lub przez ciągłość), ale niezależnie i wcześniej (co jest związane z inwazją i dostępem do naczyń krwionośnych podścieliska szyjki macicy) komórki nowotworowe mogą zajmować drogi i węzły chłonne przymacicza, węzły chłonne zasłonowe, biodrowe, a później przyaortalne. W badaniu Candido i wsp. na grupie 30 chorych na RSZM w grupie *FIGO* IB nie stwierdzono związku pomiędzy przerzutami w przymaciczach a przerzutami węzłowymi w miednicy, a także nie wykazano związku pomiędzy szerzeniem się raka w tkance przymacicza (przez ciągłość lub bez zachowania ciągłości oraz przez *LVSI*) a mikroprzerzutami w przymaciczach [85]. Z kolei w badaniu Daraï i wsp., obejmującym 54 chore w stopniach zaawansowania raka IA-IIIB wg klasyfikacji *FIGO*, w których przypadków raka IB1 było 57,4%, wykazano związek pomiędzy zajętejmi przymaciczymi a dodatnimi węzłami chłonnymi miednicy [101]. Wyniki tych publikacji skłaniają do stwierdzenia, że drogi szerzenia się raka nie są łatwe do przewidzenia, a każdy z podtypów umiejscowienia anatomicznego przerzutów może być niezależny od siebie nawzajem.

4.4. Przerzuty odległe

Wzrastanie częstości przerzutów odległych jest związane z wzrastającym stadium choroby oraz z jej utajonym charakterem – wynosi od 3% w stadium IA

(z obecnością inwazji do przestrzeni okołonaczyniowej limfatycznej) do 75% w stadium IVA wg *FIGO* [102]. W cytowanym badaniu Fagundes i wsp. stwierdzili, że na częstość przerzutów odległych nie miały wpływu typ histologiczny nowotworu, wielkość zmian nowotworowych, ani wiek chorej. W tym badaniu, które objęło 1211 chorych leczonych tylko napromienianiem, z których 322 rozwinęło przerzuty odległe w ciągu 10 lat obserwacji przebiegu choroby, zła kontrola miejscowa była niezależnym niekorzystnym czynnikiem predykcyjnym wobec wystąpienia przerzutów odległych. Inni autorzy również popierają tę tezę, wiążąc zwiększenie ryzyka odległych przerzutów nowotworowych z niedostatecznym leczeniem miejscowym i ogólnym (zbyt bliski margines zdrowych tkanek, zbyt mała liczba cykli chemioterapii) [103,104]. Najczęstszym miejscem przerzutów odległych są płuca, następnie jama brzuszna, wątroba, układ pokarmowy. Wydaje się, że wyniki tej pracy można ekstrapolować na miejscową kontrolę chirurgiczną wobec węzłów chłonnych, a więc właściwy zakres operacji we wczesnym RSZM.

4.5. Metody znakowania węzłów chłonnych

Techniki znakowania *SLN* obejmują podanie znaczników w sposób, który umożliwia ich dotarcie z okolicy guza pierwotnego lub z samego guza pierwotnego do każdego węzła chłonnego połączonego z nim naczyniem chłonnym. Wśród używanych obecnie metod funkcjonują barwnikowa, izotopowa z lub bez limfoscyntygrafii oraz barwnikowo-izotopowa, a w sferze badań klinicznych są metody wolne od użycia izotopów – wykorzystujące właściwości paramagnetyczne tkanek lub specjalnie skonstruowane znaczniki, wykazujące reakcję świecenia w świetle podczerwonym (zieleń indocyjaniny, system *FLARE* i inne [105,106,107]. Są one możliwe do zastosowania również u pacjentek z RSZM w ciąży [108].

Do znaczników barwnikowych, wśród których używa się przede wszystkim barwinków niebieskich, należą: pochodne aniliny (błękit patentowy V, *Patentblau – V*; alfazuryna, *Alphazurin*, limfazuryna, *Lymphazurin*) i błękit metylenowy. W przypadku znaczników barwnikowych wykrycie *SLN* manifestuje się jako „wybarwienie”.

Metoda z użyciem radioznaczników polega na podaniu izotopu promieniotwórczego (najczęściej radioaktywny izotop technetu – Tc^{99m} – nadtechnecjan) połączonego z nośnikiem (w większości przypadków na bazie ludzkiej albuminy), który dzięki temu przemieszcza się z miejsca podania do naczyń i węzłów chłonnych. Czas, w którym dochodzi do przechodzenia znacznika przez naczynia chłonne i czas jego obecności w węzle chłonnym są różnie długie w zależności od wielkości cząsteczki nośnika. W badaniach Kliniki (m.in. nad *SLN* w RSZM i raku błony śluzowej trzonu macicy) używa się cząsteczek ludzkiej albuminy osocza (nanokoloidu) o średniej wielkości cząsteczki 5 – 80 nm. Radioizotop podaje się w warunkach Zakładu Medycyny Nuklearnej. Węzły *SLNs* wykrywa się, gdy są „aktywne” tj. cechują się większą intensywnością sygnału, ocenianą śródoperacyjnie za pomocą przenośnego detektora promieniowania γ , często jest to poprzedzone badaniem limfoscyntygraficznym.

Limfoscyntygrafia stanowi przedoperacyjne rozszerzenie powyższej metody o dokładne „mapowanie” miejsc aktywności („gorące” węzły chłonne) w obrębie regionalnego układu chłonnego drenującego guz, przy użyciu aparatury medycyny nuklearnej – gamma kamery o dużym polu widzenia. W tej metodzie znacznik również jest podawany w Zakładzie Medycyny Nuklearnej, a na sali operacyjnej zachodzi konfrontacja „mapy” uzyskanej przez lekarza medycyny nuklearnej z obrazem aktywności uzyskanym przez chirurga przy użyciu przenośnego detektora promieniowania γ .

W badaniach klinicznych znajdują się paramagnetyki, które wytwarzają w miejscu wychwytu zmienne pole magnetyczne przemijająco magnetyzujące cząsteczki podawane jako znacznik. Przykładem takiej metody jest użycie cząsteczek tlenku żelaza. Metodę tą używa się w przypadku raka piersi. Klinika nie ma doświadczeń w wykorzystywaniu jej w odniesieniu do nowotworów ginekologicznych z uwagi na brak rejestracji paramagnetyku dla RSZM w Polsce. W poniższej Tabeli 7. znajduje się krótkie zestawienie zalet i wad głównych metod znakowania *SLN*.

Tabela 7. Przegląd metod znakowania węzłów chłonnych stosowanych obecnie rutynowo w Polsce w przypadku nowotworów ginekologicznych.

Metoda znakowania	Zalety	Wady
Barwnikowa	Nie wymaga zaawansowanego zaplecza zakładu medycyny nuklearnej, uniknięcie promieniowania	Wymagająca technika (doświadczenie), możliwość wystąpienia reakcji uczuleniowych, tatuaży, niemożliwy pomiar ilościowy
Z użyciem światła podczerwonego	Nie wymaga zaawansowanego zaplecza zakładu medycyny nuklearnej, uniknięcie promieniowania	Wymaga zaadsorbowania zieleni indocyjaninowej do ludzkiej albuminy oraz specjalnego systemu detekcji śródoperacyjnej
Izotopowa	Większa czułość i specyficzność w wykrywaniu <i>SLN</i> w porównaniu do samej techniki barwnikowej, ocena ilościowa wychwytu	Droższa, wymagająca zaplecza zakładu medycyny nuklearnej (wykwalifikowany, interdyscyplinarny personel)
Limfoscyntygraficzna	Duża czułość i specyficzność w wykrywaniu <i>SLN</i> , ocena ilościowa wychwytu, przydatna w tzw. „krzywej uczenia się”	Droższa, wymagająca zaplecza zakładu medycyny nuklearnej (wykwalifikowany, interdyscyplinarny personel, posiadanie gamma kamery)
Paramagnetyczna	Niewielki koszt i nakład zaplecza sprzętowego w porównaniu do uzyskiwanych wyników, ocena ilościowa wychwytu	Niezarejestrowany w Polsce do użycia w raku szyjki macicy

Objaśnienia: *SLN* – węzeł chłonny wartowniczy.

5. Cele badań

Celami badań przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej były: określenie stopnia przydatności oceny występowania mikroprzerzutów, a także wyizolowanych komórek nowotworu w węzłach pozawartowniczych (*nSLN*).

Szczegółowo można je zawrzeć w dwóch poniższych punktach:

1. Określenie częstości występowania mikroprzerzutów do węzłów chłonnych pozawartowniczych (i czynników wywierających na to wpływ) w stadiach zaawansowania klinicznego raka szyjki macicy IA2 – IB1 wg klasyfikacji *FIGO*.
2. Opisanie procedury wykonania i protokołu oceny histologicznej i immunohistochemii za pomocą przeciwciał AE1/AE3 w ultracienkich skrawkach węzłów chłonnych *SLN* i *nSLN* (*ultrastaging*) oraz ocenę jej wartości w raku szyjki macicy.

6. Materiały i metody

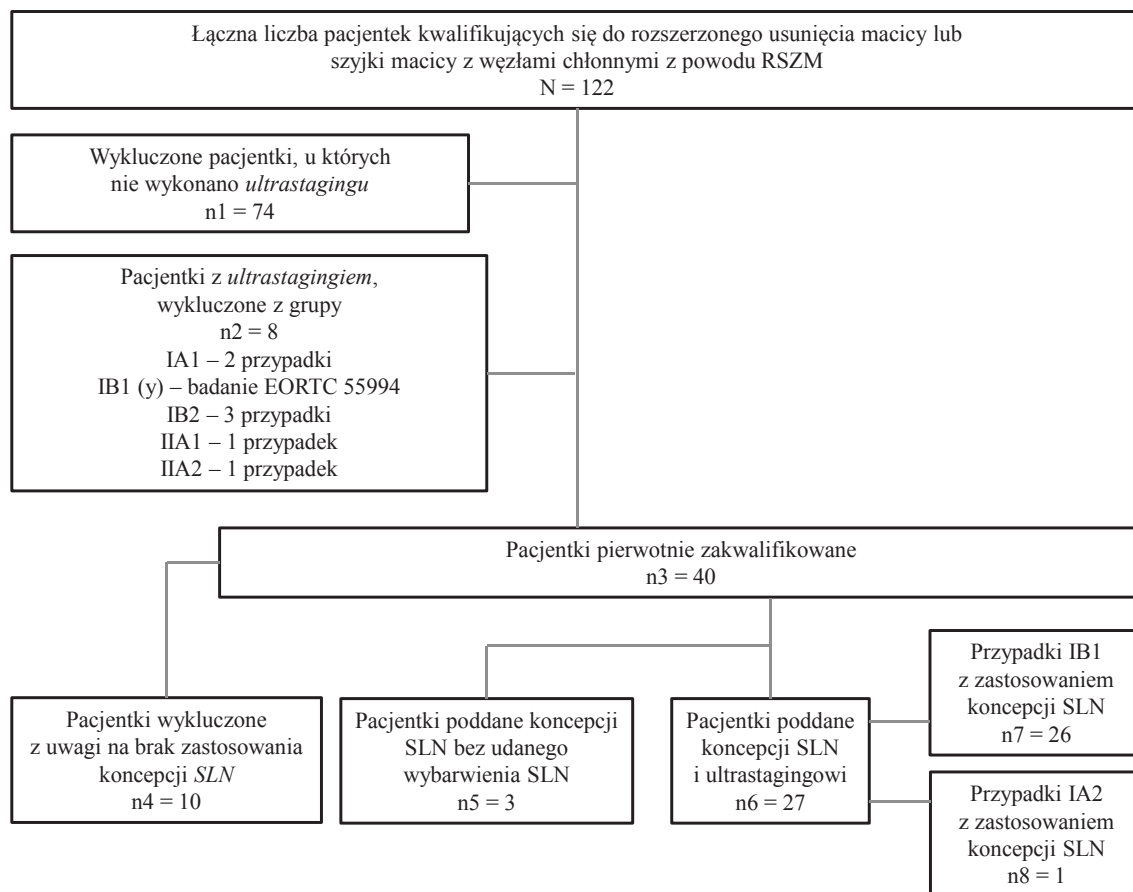
6.1. Sposób doboru próby (grupa badana)

Pomiędzy styczniem 2010 a kwietniem 2014 roku w Katedrze i Klinice Ginekologii, Ginekologii Onkologicznej i Endokrynologii Ginekologicznej Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego zidentyfikowano grupę 122 pacjentek z pierwotnie operacyjnym RSZM (grupa N), u których przeprowadzono właściwą operację dla stanu zaawansowania klinicznego choroby. Z tej grupy wyłączono 74 pacjentki (grupa n1), u których nie wykonano badania węzłów chłonnych metodą *ultrastagingu*. Z pozostałej grupy chorych wyłączono kolejne 8 (grupa n2), których stan zaawansowania choroby nie mieścił się w założonych kryteriach włączenia do badania (Tabela 8.). Z pozostałych pierwotnie zakwalifikowanych 40 pacjentek (grupa n3) 10 wykluczono z uwagi na brak zastosowania koncepcji *SLN* (grupa n4), a 3 kolejne – ze względu na brak wybarwienia *SLN* (nieudana procedura *SLND*, grupa n5). Wśród pozostałych chorych ostatecznie włączonych do badania (grupa n6 = 27) 26 stanowiły pacjentki w stopniu zaawansowania choroby *FIGO* IB1 (grupa n7), 1 chora miała RSZM w stopniu *FIGO* IA2 (grupa n8). Na Ryczeniu 3. na następnej stronie przedstawiono sposób doboru próby do badania.

Tabela 8. Kryteria włączenia i wyłączenia pacjentek z badania.

Kryteria włączenia	<ul style="list-style-type: none">■ Wiek > 18. r. ż.■ Stan zaawansowania klinicznego IA2 i IB1 (pierwotnie operacyjny RSZM) wg klasyfikacji <i>FIGO</i>■ Przeprowadzenie operacji z usunięciem węzłów chłonnych■ Wyznakowanie co najmniej 1 <i>SLN</i>■ Przeprowadzenie oceny węzłów chłonnych metodą <i>ultrastagingu</i>
Kryteria wyłączenia	<ul style="list-style-type: none">■ Stan zaawansowania inny niż IA2 i IB1 wg <i>FIGO</i>■ Niewykonanie operacji usunięcia węzłów chłonnych■ Brak zastosowania koncepcji <i>SLN</i>■ Brak wyznakowania <i>SLN</i> pomimo zastosowanej koncepcji <i>SLN</i>

Objaśnienia: *FIGO* – Międzynarodowa Federacja Położnictwa i Ginekologii; RSZM – rak szyjki macicy; *SLN* – węzeł chłonny wartowniczy.



Rycina 3. Diagram przedstawiający proces kwalifikowania chorych do różnych grup w badaniu (N, n1-8).

6.2. Technika wykrywania węzła chłonnego wartowniczego

W ułożeniu kończyn dolnych w pozycji ginekologicznej we wziernikach podawano błękit metylenowy (*Methylen blauw*, *Sterop Pharmacobel*, Belgia) podśluzówkowo w 4 miejsca w ilości po 1 ml (10 mg) na 1 wkłucie igły (rozmiar 22 G, *Poly Medicure Ltd.*, Indie) na godzinach 3, 6, 9, 12 każdorazowo ok. 0,5 cm od brzegu guza szyjki macicy. W sytuacji, gdy guz zajmował większą część szyjki, podawano barwnik w wolne miejsce szyjki co najmniej 0,5 cm od guza. Podanie wykonywano na sali operacyjnej po znieczuleniu chorej na ok. 15-20 minut przed cięciem chirurgicznym skóry i ok. 15-25 minut przed otwarciem przestrzeni zaotrzewnowej i identyfikacji *SLN(s)*. Węzły chłonne uznawano za wartownicze w przypadku ich niebieskiego zabarwienia określonego przez operatora lub lekarza patologa albo zidentyfikowano drogę chłonną, która biegła do konkretnego węzła chłonnego lub węzłów chłonnych.

6.3. Procedura opracowywania preparatów tkankowych

Pobrane węzły chłonne przez dobę utrwalano w roztworze 4% zbuforowanej formaliny. Następnie odwadniano je w procesorze tkankowym (próżniowo-ciśnieniowy typ *Leica ASP 3005*, *Leica Biosystems*, Nussloch, Niemcy) zawierającym szereg

alkoholi o wzrastających stężeniach (70%, 96%, absolutny) i ksyleneń. W ostatnim etapie pracy aparatu nastąpiło zatopienie materiału w niskotopliwej, ciekłej parafinie. Z tak przygotowanych tkanek wykonano bloczki parafinowe.

Każdy bloczek, zawierający od 1 do 4 węzłów chłonnych, został skrojony warstwowo przy pomocy mikrotomu saneczkowego (Leica SM2010 R, *Leica Biosystems*, Nussloch, Niemcy) na skrawki grubości 4 mikrometrów w równych odległościach (co 150 mikrometrów). Wycinki umieszczano na silanizowanych szkiełkach podstawowych, dwa skrawki z danego poziomu: jeden w celu wybarwienia w HE), drugi w celu wywołania reakcji z przeciwciałem CK AE1/AE3. Utrwalenie preparatów zachodziło w cieplance w temp. 55°C (24 h). Po procesie wstępnego przygotowania tkanki nastąpiło jej wybarwienie.

1. Procedura barwienia hematoksyliną-eozyną. Odparafinowane skrawki w roztworach ksyleneń i alkoholi o malejących stężeniach (absolutny, 96, 70%) wybarwiono ręcznie hematoksyliną Mayera i eozyną, odwodniono w roztworach alkoholi o rosnących stężeniach, a następnie w roztworach ksyleneń i utrwalono w syntetycznym medium (Leica CV Mount U.N 1866, *Leica Biosystems*, Nussloch, Niemcy).

2. Barwienie z udziałem przeciwciał przeciw cytokeratynom. Nieodparafinowane skrawki przygotowano do barwienia na obecność CK AE1/AE3 w aparacie PitLink (aparat do obróbki wstępnej i cieplnego odmaskowania antygeny) z użyciem roztworu *Target Retrieval Solution-high pH* (Dako) przez 1,5 godziny, w tym w temperaturze 97°C przez 20 minut. Następnie preparaty były poddawane schładzaniu do 65°C. Odczyny IHC wykonano w autostainerze (*AutostainerLink 48*, Dako, Ameryka Płn., 6392 Via Real, Carpinteria, CA 93013, USA) z wykorzystaniem zestawu *EnVision FLEX, Mouse High pH (link) code k8002*. Odczynniki wykorzystane do barwień w kolejności nanoszenia były następujące: *EnVision FLEX peroxidase-blocking reagent* (5 minut), przeciwciało *FLEX monoclonal Mouse Cytokeratin clone AE1/AE3 ready-to-use* nr kat. IS053 (20 minut), *EnVision FLEX/HRP* (20 minut), *Substrate Working Solution* (mieszanina, 5 minut), *EnVision FLEX Hematoxylin* (barwienie kontrastowe, 10 minut); pomiędzy każdorazowo nakładanym odczynnikiem preparaty były płukane buforem *Flex Wash Buffer*, a na koniec wodą destylowaną. W ostatnim etapie ręcznie odwadniano wycinki i zamknięto w medium (Leica CV Mount U.N 1866, *Leica Biosystems*, Nussloch, Niemcy).

6.4. Analiza statystyczna

W badaniu posłużono się testem niezależności chi-kwadrat do badania związku między zmiennymi dychotomicznymi. W przypadku predyktorów ilościowych badano zgodność ich rozkładów z rozkładem normalnym za pomocą testu zgodności Kołmogorowa z poprawką Liliforsa. Następnie stosowane były testy t-Studenta do badania zależności między predyktorem o rozkładzie normalnym a dychotomiczną zmienną zależną. Wybór odpowiedniej statystyki testowej testu t-Studenta poprzedzony

był weryfikacja hipotezy o równości wariancji w porównywanych populacjach. Do badania związku między predyktorami ilościowymi o rozkładach niezgodnych z rozkładem normalnym a dychotomiczną zmienną zależną wykorzystano nieparametryczny test U-Manna Whitneya. Test ten jest najmocniejszą nieparametryczną alternatywą testu t-Studenta i nie wymaga spełnienia założeń odnośnie rozkładu zmiennej ilościowej.

Zdolności dyskryminacyjne zmiennych ilościowych badano za pomocą krzywej *ROC* i pola powierzchni pod nią (*AUC*). Jako kryterium wyboru optymalnego punktu odcięcia przyjęto maksymalizację współczynnika Youdena.

We wszystkich testach przyjęto poziom istotności 0,05. Obliczenia przeprowadzono w programie Statistica 12 w wersji polskiej.

6.5. Sposób opisywania wyników w *ultrastagingu*

Każdy usunięty węzeł chłonny był określony osobno pod względem występowania makroprzerzutu (*MAC*), mikroprzerzutu (jednego lub więcej *MIC*) oraz wyizolowanych komórek nowotworu (*ITC*) (jedno skupisko lub więcej). Określenie zostało odpowiednio ujęte w klasyfikacji patologicznej (p) *TNM* jako „uN1”, „uN1mi” oraz „uN0i(+)”, poprzedzone literą „p”, oznaczającą *staging* patologiczny. W dwóch ostatnich przypadkach, jeżeli węzły chłonne zawierały tylko *MIC* lub/i tylko *ITC*, podawano w nawiasie liczbę zajętych węzłów chłonnych, np. „puN1mi,i(+) (3LN, 1LN)”, „puN0i(+) (4LN)”. W przypadku, gdy węzły chłonne zawierały *MAC* i *MIC* lub *ITC*, taką informację dodawano w nawiasie na końcu, np. „puN1(3/5, mic)” lub „puN1(3/5, itc). W odniesieniu do węzłów chłonnych wartowniczych przyjęto zasadę, że w przypadku udanego wybarwienia jednej lub dwóch stron miednicy, w nawiasie jest podana dodatkowa informacja o stosunku dodatnich węzłów chłonnych do liczby *SLNs*, np. 0/2 sn.

7. Wyniki

7.1. Charakterystyka ogólna pacjentek zakwalifikowanych do badania

Ogólną charakterystykę badanej grupy chorych z guzami szyjki macicy przedstawiono w Tabeli 9.

Tabela 9. Charakterystyka pacjentek i raka szyjki macicy u 27 chorych (grupa n6).

Populacja	n	%
Wiek (mediana 54 lata, zakres 23 – 65 lat)		
20-39 lat	8	30
40-59 lat	12	44
60 lat i więcej	7	26
Stopień wg klasyfikacji FIGO		
IA2	1	96
IB1	26	4
≤2 cm	11	40
>2 cm	16	60
Typ operacji		
PRS II (pLND)	1	4
PRS III (BSO, pLND)	19	70
PRS III (BSO, p+paLND)	3	11
PRS III (BS, pLND)	2	7
PRS III (BSO, SLND)	1	4
PRS III (RSO, LS, pLND)	1	4
Histopatologiczna wielkość guza w cm (mediana; zakres)	2,5; 0,6 – 5,5	
Histologia		
Rak płaskonabłonkowy	24	89
Rak gruczołowy	2	7
Inne typy	1	4
Liczba chorych z dodatnimi węzłami chłonnymi (MAC+/MIC+)	7	26
Liczba chorych ze zdarzeniami w węzłach chłonnych (MAC+/-MIC+/-ITC)	11	41
LVSI	15	56
Stopień złośliwości histologicznej		
G1	2	7
G2	15	56
G3	10	37
Głębokość naciekania*		
≤10 mm	16	59
10,1 – 19,9 mm	10	37
≥20 mm	1	4

Objaśnienia: BS – obustronne usunięcie jajowodów; BSO – obustronne usunięcie jajników i jajowodów; CON – konizacja, FIGO – Międzynarodowa Federacja Ginekologii i Położnictwa, G – stopień złośliwości histologicznej, pLND – usunięcie miednicznych węzłów chłonnych, paLND – usunięcie przyaortalnych węzłów chłonnych, PRS – usunięcie macicy wg typu określonego przez Piver-Rutledge-Smith; SLND – wydzielenie wartowniczych węzłów chłonnych; komentarz: w dwóch przypadkach nie można było określić wymiarów guza w badaniu pooperacyjnym.

W tej grupie 20 chorych przeszło histerektomię sklasyfikowaną według powszechnie przyjętego stopnia jej radykalności za Piverem, Rutledge i Smithem jako typ III (PRS III) z przydatkami obustronnie metodą otwartą, 2 chore przeszły

analogiczną operację metodą laparoskopową, 2 chore miały operację PRS III z obustronnym usunięciem jajowodów metodą otwartą, 1 chora miała operację PRS III tylko z *SLND* metodą otwartą, 1 chora miała operację PRS III z prawostronnym usunięciem przydatków i lewostronnym usunięciem jajowodu metodą otwartą, a jedna chora przeszła operację PRS typu II metodą otwartą (schemat przedstawiony na Rycinie 3. na stronie 40). U wszystkich chorych usunięto regionalne (miedniczne) węzły chłonne, zaś u 3 chorych usunięto również węzły chłonne przyaortalne (do wysokości odejścia tętnicy kręzkowej dolnej). Najczęstszym typem histologicznym był rak płaskonabłonkowy.

Obustronnie wykryto *SLN* w 11 przypadkach (36%). W jednym z nich użyto planarnej limfoscyntygrafii. U 9 chorych wykryto jeden lub więcej *SLN* tylko po prawej stronie, u 7 – tylko po lewej stronie miednicy.

7.2. Klasyfikacja przypadków klinicznych

We wszystkich przypadkach oceny zaawansowania klinicznego choroby dokonano za pomocą klasyfikacji *FIGO* i porównano z oceną zaawansowania patologicznego wg *TNM* (opartej o 7. wydanie klasyfikacji *TNM* wg *UICC* [109]). Klasyfikację kliniczną wg systemu *FIGO* oraz pełne określenia stanu zaawansowania wg systemu *TNM* każdego z przypadków przedstawiono w Tabeli 10. Skalę *TNM* każdorazowo uzupełniono o informację na temat użycia *ultrastagingu* (u) w klasyfikacji oraz liczby stwierdzonych przerzutów do węzłów chłonnych, a także podano rodzaj postępowania chirurgicznego.

Na podkreślenie zasługuje fakt, że w trzech przypadkach na podstawie wyniku badania histopatologicznego określono odmienny *staging* guza przy tym samym jego największym wymiarze 0,6 cm – pacjentka nr 5 – KA, pacjentka nr 8 – ŁD oraz pacjentka nr 24 – LM. W pierwszym przypadku nacieki podścieliska szyjki macicy przez nowotwór wynosił 4 mm (pT1a2), w drugim i trzecim – 6 mm (pT1b1).

Tabela 10. Szczegółowe przedstawienie danych o *stagingu* każdej chorej w grupie badanej (n6 = 27).

L.p.	Inicjaly	FIGO	Pierwotny <i>staging</i> po operacji¶	Pełna (poszerzona) klasyfikacja TNM („ <i>restaging</i> ”)‡	Głębokość naciekania (mm)	LVSI	Chirurgia	Węzły chłonne
1.	JB	IB1	pT1b1N0Mx	pT1b1(3,2cm)uN0(0/26, 0/5sn)Mx	13	Tak	PRS III	P
2.	LM	IB1	pT1b1N0Mx	pT1b1(2,7cm)uN0(0/24, 0/2sn)Mx	15	Nie	PRS III	P+Pa
3.	TI	IB1	pT1b1N0Mx	pT1b1(3,3cm)uN0(0/36, 0/3sn)Mx	20	Nie	PRS III	P+Pa
4.	OE	IB1	pT2a1N0Mx	pT2a1(3,7cm)uN0(0/29, 0/2sn)Mx	12	Tak	PRS III	P
5.	KA	IA2	pT1a2N0M0	pT1a2(0,6cm)uN0(0/9, 0/2sn)Mx	4	Nie	PRS II	P
6.	MM	IB1	pT1b1N0Mx	pT1b2(5,5cm)uN0(0/37, 0/4 sn)Mx	12	Nie	PRS III	P+Pa
7.	TM	IB1	pT1b1N1Mx	pT1b1(2,8cm)uN1(6/16, 4/7 sn, mic)Mx	10	Tak	PRS III	P
8.	ŁD	IB1	pT1b1N0Mx	pT1b1(0,6cm)uN0(0/5, 0/3sn)Mx	6	Nie	PRS III	P
9.	WJ	IB1	pT1b1N0Mx	pT1b1(2,5cm)uN0(i+)(0/8, 0/1 sn, 4LN)Mx	16	Tak	PRS III (LPS)	P
10.	JM	IB1	pT2a1N0Mx	pT1b1(3,0cm)uN0(i+)(0/12, 0/2sn, 2 LN)Mx	9	Tak	PRS III	P
11.	BE	IB1	pT1b1N0Mx	pT1b1(0,7cm)uN0(0/9, 0/2sn)Mx	7	Tak	PRS III	P
12.	KT	IB1	pT1b1N0Mx	pT1b1(3,0)uN0(i+)(0/12, 0/2sn, 1snLN)Mx	5	Nie	PRS III (LPS)	P
13.	PM	IB1	pT1b1N0Mx	pT1b1(1,0cm)uN1mi, i(+)(3/5, 1/2sn, 1 LN)Mx	10	Tak	PRS III	P
14.	WW	IB1	pT1b1N0Mx	pT1b1(0,8cm)uN0(0/17, 0/1sn)Mx	5	Nie	PRS III	P
15.	JL	IB1	pT1b1N0Mx	pT1b1(2,0cm)uN0(i+)(0/20, 0/1 sn, 4LN)Mx	15	Tak	PRS III	P
16.	SD	IB1	pT2a1N1Mx	pT2a1(3,0 cm)uN1(19/24, 2/2sn, mic)	4	Tak	PRS III	P
17.	PE	IB1	pT1b1N1Mx	pT1b1(3,5cm)uN1(8/19, 4/4sn, mic)Mx	14	Tak	PRS III (RSO, LS)	P
18.	WJ	IB1	pT1b1N0Mx	pT1b1(0,8cm)uN0(0/15, 0/1sn)Mx	8	Nie	PRS III (BS)	P
19.	OS	IB1	pT1b1N1Mx	pT1b1(0,8cm)uN1(1/12, 0/1sn)Mx	8	Tak	PRS III	P
20.	GB	IB1	pT1b1N0Mx	pT1b1(2,4cm)uN0(0/53, 0/4sn)Mx	5,5	Nie	PRS III	P
21.	DM	IB1	pT2a1N0Mx	pT2a1(2,0cm)uN0(0/24, 0/3 sn)Mx	6	Tak	PRS III (BS)	P
22.	MW	IB1	pT1b1N0Mx	pT1b1(2,0cm)N0(0/10, 0/1sn)Mx	12,5	Tak	PRS III	P
23.	BM	IB1	pT1b1N1Mx	pT1b1(2,7cm)uN1mi(1/20, 1/2 sn)Mx	12	Tak	PRS III	P
24.	LM	IB1	pT1b1N0(sn)Mx	pT1b1(0,6cm)uN0(sn)(0/3sn)Mx	6	Nie	PRS III (SLND)	P
25.	SJA	IB1	pT1b1N0Mx	pT1b1(2,5cm)uN0(0/24, 0/3 sn)Mx	10	Nie	PRS III	P
26.	KT	IB1	pT1b1N0Mx	pT1b1(0,6cm)uN0(0/20, 0/2sn)Mx	6,1	Tak	PRS III	P
27.	MW	IB1	pT1b2N1Mx	pT1b2(4,2cm)uN1(6/27, 0/1 sn, mic)M1	19	Nie	PRS III	P + Pa

Objaśnienia: *BS* – obustronne usunięcie jajowodów, *BSO* – obustronne usunięcie przydatków, *i(+)* – obecność *ITC*, *LND* – usunięcie regionalnych węzłów chłonnych (limfadenektomia), L.p. – numer przypadku, *LPS* – laparoscopia, n6=27 – pacjentki poddane *SLND* i *ultrastagingowi* (p. diagram na Rycinie 3.); P – usunięcie miednicznych węzłów chłonnych, Pa – usunięcie przyaortalnych węzłów chłonnych, PRS II,III – operacja Piver-Rutledge-Smith, typ II,III; *R/LS* – prawo/lewostronne usunięcie jajowodu, *R/LSO* – prawo/lewostronne usunięcie przydatków, *SLND* – usunięcie wartowniczych węzłów chłonnych; ¶ oparty o rutynowe krojenie preparatów histologicznych; ‡ oparta o *ultra* cienkie skrawanie.

7.3. Statystyka usuniętych węzłów chłonnych

Usunięto łącznie 516 węzłów chłonnych u 27 chorych, z których wszystkie poddano badaniu w *ultrastagingu* (średnio ok. 19,4 węzłów chłonnych na pacjentkę, zakres: 3-53 węzły chłonne). Usunięto 66 *SLN* (średnio 2,5 *SLN* na pacjentkę). Liczba usuniętych *SLNs* na pacjentkę wynosiła: 1 w 7 przypadkach, 2 w 10 przypadkach, 3 w 5 przypadkach, 4 w 3 przypadkach, zaś po 5 i 7 *SLN* usunięto każdorazowo w jednym przypadku. Nie stwierdzono różnic w liczbie znalezionych węzłów chłonnych w przypadku jedno i dwustronnego wybarwienia *SLN* (test U Manna-Whitney'a, $p=0,3344$). Pacjentki z jednostronnym wybarwieniem były średnio starsze o 9,5 roku niż te, u których powiodła się dwustronna identyfikacja *SLN* (test U Manna-Whitneya, $p=0,03256$). Wśród potencjalnych czynników mogących mieć znaczenie w efektywności procedury *SLND* zbadano także przebyte konizacji. Była ona udziałem 8 pacjentek a dwie inne miały amputację szyjki macicy. Dwie chore po konizacji były w grupie ze stwierdzonymi zdarzeniami w węzłach chłonnych. Nie stwierdzono statystycznie istotnej zależności między stanem po konizacji a stronnością wybarwienia (test niezależności chi-kwadrat, $p=0,15883$).

7.4. Statystyka „zdarzeń” w węzłach chłonnych (makroprzerzuty, mikroprzerzuty, wyizolowane komórki nowotworu)

Łącznie stwierdzono 44 węzły chłonne dodatnie pod względem *MAC* lub/i *MIC* oraz 12 węzłów chłonnych z *ITC*, co stanowiło 10,8% wszystkich usuniętych węzłów chłonnych (56/516). W Tabeli 10. szczegółowo przedstawiono analizę liczebności poszczególnych typów „zdarzeń” (zmian) nowotworowych w węzłach chłonnych. Ich szczegółowy rozkład, kierując się kryterium ważności (dominacji) zmiany obecnej w węzle chłonnym, przedstawia Rycina 4. Na 11 przypadków chorych w podgrupie ze zdarzeniami w węzłach chłonnych w 8 przypadkach wykonano oba barwienia (H i E oraz IHC), w dwóch wykryto je za pomocą tylko zastosowanej H i E, a w jednym za pomocą tylko IHC.

Wszystkie przypadki raka u chorych ze stwierdzonymi przerzutami do węzłów chłonnych były określone jako stadium IB1 wg klasyfikacji *FIGO* (wg systemu *TNM AJCC/UICC* była to grupa pN1). Grupa ta, jak wyżej wspomniano, stanowiła 7 przypadków. Średnia wielkość zmiany nowotworowej w tej grupie wynosiła 2,57 cm. U największej liczby chorych (4 chore; 14,8%) stwierdzono zarówno makro-, jak i mikroprzerzuty. Wykrycie wyłącznie *ITC* dotyczyło 4 pacjentek; wszystkie one otrzymały stopień choroby pod względem zajęcia węzłów chłonnych jako pN0(i+) wg klasyfikacji *AJCC/UICC*. Szczegółowe dane na temat pacjentek ze zmianami w węzłach chłonnych, rodzajem i liczbą tych zmian nowotworowych, znajdują się na następnych stronach w Tabelach 11.-15. oraz Rycinie 4., przedstawiającej topografię tych węzłów chłonnych. W Tabeli 11. umieszczono liczby pacjentek, u których wystąpiły *MAC*, *MIC* oraz *ITC* w węzłach chłonnych, decydujące o *stagingu* węzłowym ($MAC > MIC > ITC$, gdzie znak większości odpowiada kryterium ważności).

W Tabeli 12. przedstawiono szczegółowo częstość występowania poszczególnych „zdarzeń” w węzłach chłonnych, a statystyki dotyczące samej wydzielonej podgrupy zawierającej chore ze zmianami nowotworowymi w węzłach chłonnych przedstawiono w Tabeli 13.

Tabela 11. Wartości cech decydujące o *stagingu* (cecha N) w grupie 11 chorych z co najmniej jednym makroprzerzutem, N1(MAC), mikroprzerzutem (bez makroprzerzutu, N1mi, oraz wyizolowanymi komórkami nowotworu N0i(+)) w węzłach chłonnych według systemu *TNM (UICC)*.

Cecha	Liczba przypadków (procent wszystkich, n6 = 27)
N1(MAC)	6 (22)
N1mi	2 (7,5)
N0i(+)	3 (11)
SUMA	11 (40,5)

Tabela 12. Charakterystyka usuniętych węzłów chłonnych w badanej grupie n6 (27 chorych).

Cecha	Wynik (%)
Liczba zbadanych węzłów chłonnych	516
Liczba zbadanych SLNs	66
Liczba zbadanych nSLNs	450
Łączna liczba stwierdzonych dodatnich węzłów chłonnych (obecne makro- lub mikroprzerzuty)	44
w tym w SLN	12
w tym w nSLN	32
Liczba wszystkich węzłów chłonnych z makroprzerzutami bez względu na obecność innych zmian wtórnych w węzłach chłonnych	22
w tym w SLN	7
w tym w nSLN	15
Liczba węzłów chłonnych z mikroprzerzutami bez względu na obecność ITC	22
w tym w SLN	6
w tym w nSLN	16
Liczba węzłów chłonnych wyłącznie z ITC	12
w tym w SLN	3
w tym w nSLN	9
Liczba węzłów chłonnych z mikroprzerzutami lub ITC bez makroprzerzutów	34
w tym w SLN	9
w tym w nSLN	25

Objaśnienia: *ITC* – wyizolowane komórki nowotworu, *LVLND* – choroba węzłowa o małej objętości, *SLN* – węzeł chłonny wartowniczy, *nSLN* – węzeł chłonny pozawartowniczy.

Tabela 13. Rozkład zmian wtórnych w węzłach chłonnych w badanej grupie (n6 = 27 chorych).

Cecha	n (%)
Liczba chorych z przerzutami do węzłów chłonnych	7
W tym liczba chorych wyłącznie z MAC	1
W tym liczba chorych wyłącznie z MIC	1
Liczba chorych wyłącznie z ITC	4
W tym liczba chorych z MAC, MIC, ITC	0
W tym liczba chorych z MAC i MIC	4
W tym liczba chorych z MAC i ITC	0
W tym liczba chorych wyłącznie z MIC oraz ITC	1

Objaśnienia: *MAC* – makroprzerzut, *MIC* – mikroprzerzut, *ITC* – wyizolowane komórki nowotworu.

W ostatniej wymienionej tabeli uwzględniono wybarwienie *SLN* prawo, lewo lub obustronne (Tabela 14.).

Tabela 14. Przypadki ze zdarzeniami w węzłach chłonnych zamieszczone w Tabeli 10., rozbudowanej o wielkość guza nowotworowego oraz informację z *ultrastagingu*, z podaniem strony identyfikacji *SLN*, stan *SLN* i *nSLN* (wg kryterium dominacji zmiany na daną stronę i węzły chłonne), oraz wykrycia zmian nowotworowych w *SLN/nSLN* z uwzględnieniem strony wybarwienia i podaniem liczby tych węzłów chłonnych.

Nr przypadku (Inicjały)	Pełna klasyfikacja¶	Detekcja <i>SLN</i>		Stan węzłów chłonnych				Dodatknie nieoznaczone lub inne
		Strona prawa	Strona lewa	Strona prawa		Strona lewa		
				<i>SLN</i>	<i>nSLN</i>	<i>SLN</i>	<i>nSLN</i>	
7. (TM)	pT1b1(2,8cm)uN1 (6/16, 4/7 sn, mic)Mx	+	+	MAC (1) MIC (1)	-	MAC (1) MIC (1)	-	MAC (1) i MIC (1) w nieozn. węzłach chłonnych
9. (WJ)	pT1b1(2,5cm)uN0i(+) (0/8, 0/1 sn, 4LN)Mx	-	+	-	-	-	ITC (4)	
10. (JM)	pT1b1(3,0cm)uN0i (+) (0/12, 0/2sn, 2 LN)Mx	+	-	ITC (1)	ITC (1)	-	-	
12. (KT)	pT1b1(x)uN0i(+)(0/12, 0/2sn, 1snLN)Mx	+	-	ITC (1)	-	-	-	
13. (PM)	pT1b1(1,0cm)uN1mic, i(+)(3/5, 1/2sn, 1 LN)Mx	+	+	-	-	MIC (1)	MIC (2) ITC (1)	
15. (JL)	pT1b1(2,0cm)uN0i(+)(0/20, 0/1 sn, 4LN)Mx	-	+	-	-	ITC (1)	ITC (2)	ITC w węzle chłonnym przymacicza lewego (1)
16. (SD)	pT2a1(3,0 cm)uN1(19/24, 2/2sn, mic)	+	+	MIC (1)	MAC (2) MIC (6)	MAC (1)	MAC (7) MIC (2)	
17. (PE)	pT1b1(3,5cm)uN1(8/19, 4/4sn, mic)Mx	+	+	MAC (1)	-	MAC (3)	MAC (3) MIC (1)	
19. (OS)	pT1b1(0,8cm)uN1(1/12, 0/1sn)Mx	-	+	-	MAC (1)	-	-	
23. (BM)	pT1b1(2,7cm)uN1mic(1/20, 1/2 sn)Mx	+	+	MIC (1)	-	-	-	
27. (MW)	pT1b2(4,2cm)uN1(6/27, 0/1 sn, mic)M1	+	-	-	MIC (2)	-	MAC (1) MIC (2)	MIC (1) w węzle chłonnym przaortalnym

Objaśnienia: ¶ wg systemu *TNM UICC* (2010 r.) [109]; *MAC* – makroprzerzut, *MIC* – mikroprzerzut, *ITC* – wyizolowane komórki nowotworu, *SLN* – węzeł chłonny wartowniczy, *nSLN* – węzeł chłonny pozawartowniczy.

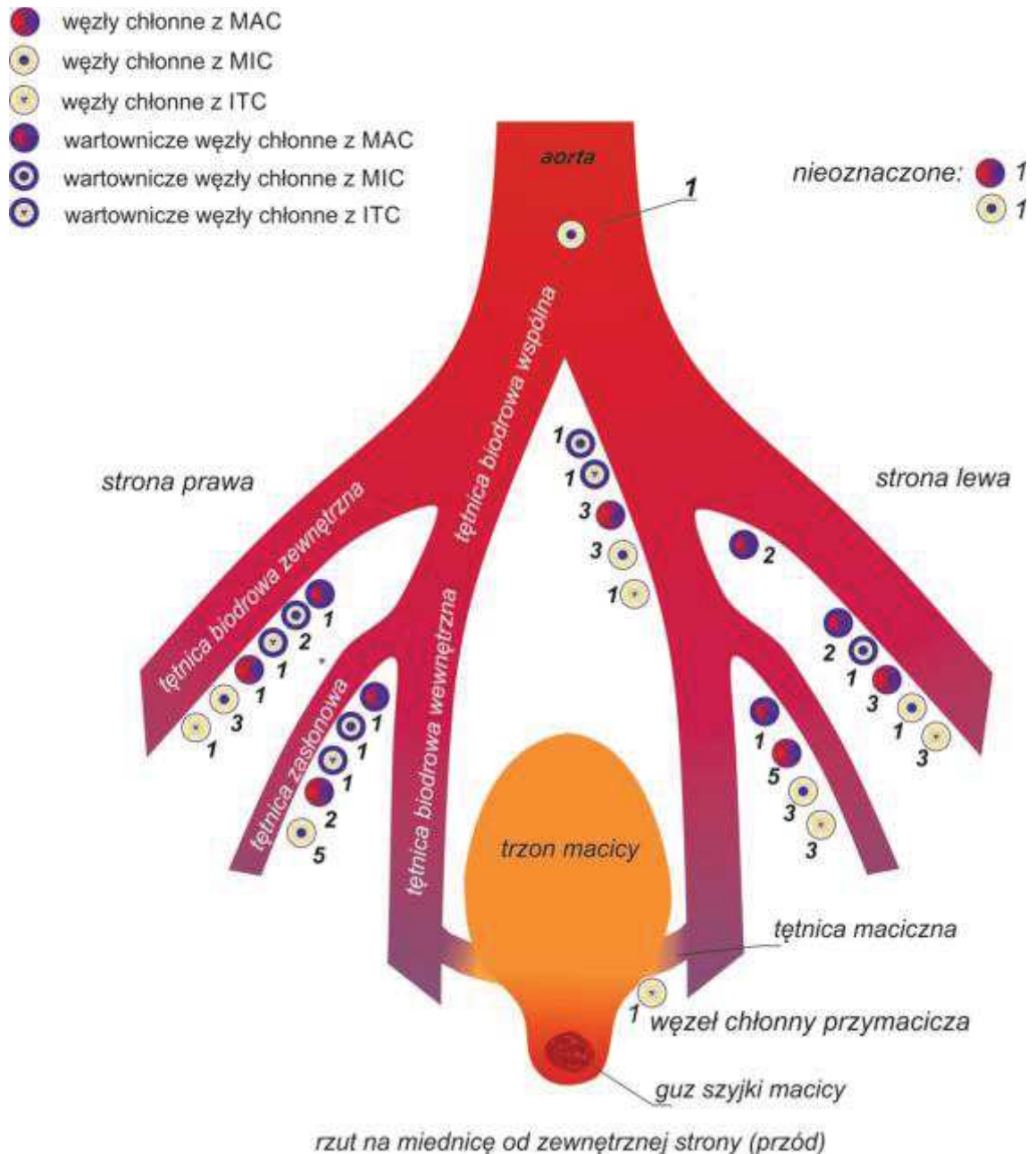
W 3 przypadkach, pomimo braku zmian w węzłach *SLNs*, stwierdzono zdarzenia w *nSLN*. W pierwszym przypadku (pacjentka WJ, nr 9) znaleziono *ITC*, które pojawiły się w *nSLNs*, a nie było ich w *SLN*. Przypadek ten dotyczył rozpoznania raka płaskonabłonkowego G2 wielkości 2,5 cm (naciekanie na głębokość 16 mm) z dodatnią cechą *LVISI* i „dobrą” jakością podania błękitu metylenowego. U tej chorej usunięto 8 węzłów chłonnych, z czego po lewej było 5, a po prawej 3. Węzeł chłonny wartowniczy należał do grupy biodrowej zewnętrznej lewej, a *nSLNs* z *ITC* - do węzłów chłonnych biodrowych zewnętrznych i zasłonowych lewych. Chora ta nie była obciążona wywiadem notowotworowym lub operacyjnym.

W dwóch przypadkach uzyskano wyniki fałszywie ujemne (pacjentki OS, nr 19 i MW, nr 27) pod względem przerzutów (nie *ITC*). W pierwszym przypadku po prawej stronie (tj. niewybarwionej) zidentyfikowano *MAC* w *nSLN*. Dotyczyło przypadku pacjentki z rakiem płaskonabłonkowym G2 o największym wymiarze 8 mm, obecna była również cecha *LVISI* w przymaciaczu prawym). Znotowano, iż podanie znacznika było niezadowalające (jakość podania „słaba - widać tylko końcowy fragment szyjki, podano poza szwami”). Pacjentka miała 3,5 tygodnia wcześniej wykonaną konizację szyjki macicy (pierwotna wielkość zmiany była szerokości 8 mm, głębokość naciekania wynosiła 6 mm, *LVISI* nieobecne). Pacjentka miała również mięśniaki macicy. Podczas operacji usunięto 12 węzłów chłonnych, 8 po lewej stronie i 4 po prawej, wśród których w jednym z dwóch węzłów chłonnych należących do grupy zasłonowych prawych znaleziono *MAC*. Węzeł chłonny wartowniczy znajdował się w grupie biodrowych zewnętrznych po stronie lewej.

Druga pacjentka również miała jednostronne (prawostronne) wybarwienie *SLNs*, ale obustronnie wykryto *MIC* w *nSLNs*. Był to przypadek raka płaskonabłonkowego G3 o głębokości naciekania 19 mm. Znotowano „dobrą” jakość podania. Pacjentka nie miała wcześniej wykonywanej operacji na szyjce macicy z wyjątkiem biopsji i łyżeczkowania kanału szyjki macicy. U chorej usunięto 27 węzłów chłonnych, 11 po prawej stronie, 9 po lewej stronie i 7 paraaortalnych. W grupie węzłów chłonnych biodrowych zewnętrznych prawych znaleziono dwa węzły chłonne z *MIC*, w grupie węzłów chłonnych biodrowych zewnętrznych lewych po 1 węzle chłonnym z *MAC* i *MIC*, w jedynym usuniętym węzle chłonnym biodrowym wspólnym lewym znaleziono *MIC*, a w jednym z 7 węzłów chłonnych paraaortalnych również stwierdzono pojedynczy *MIC*. Węzeł chłonny wartowniczy należał do grupy zasłonowych po prawej stronie.

Ostatni przypadek należy uznać za „prawdziwie” fałszywie ujemny, gdyż przy skutecznym wyznakowaniu *SLN* po prawej stronie miednicy, w którym nie znaleziono przerzutów, dodatnimi okazały się dwa węzły chłonne *nSLNs* po tej stronie.

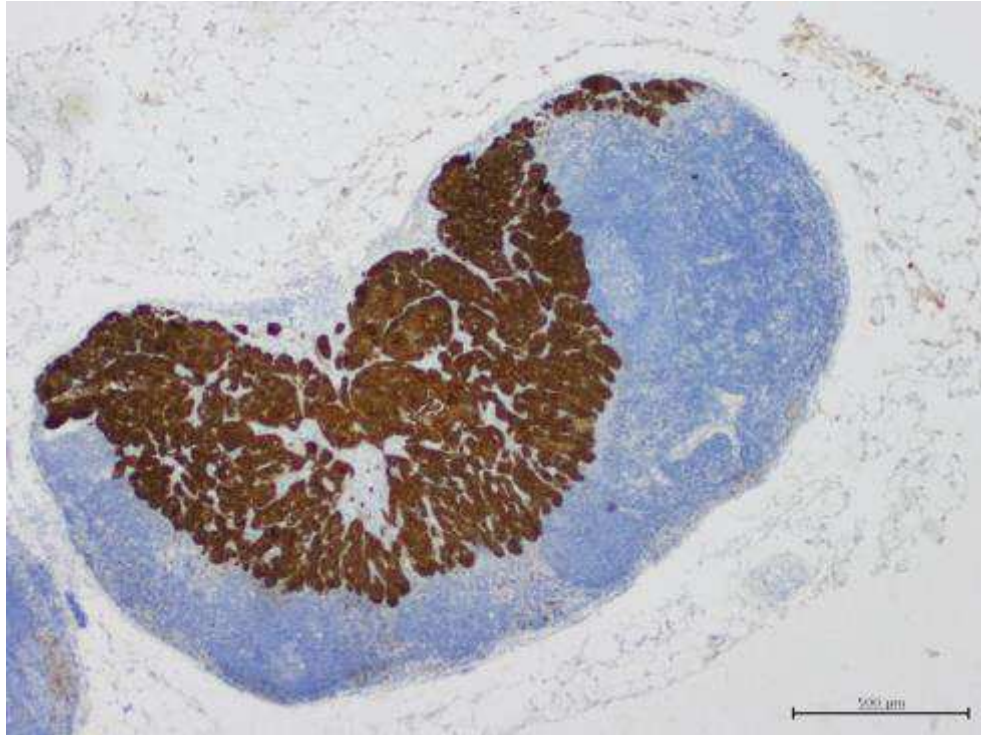
Dla 27 pacjentek (przynajmniej jeden *SLN*), przy 36% obustronnej detekcji (38 stron detekcji), stwierdzono czułość i swoistość koncepcji *SLN* połączonej z *ultrastagingiem* na stronę detekcji *SLN* odpowiednio wynoszącą 66,7% i 86,2%.



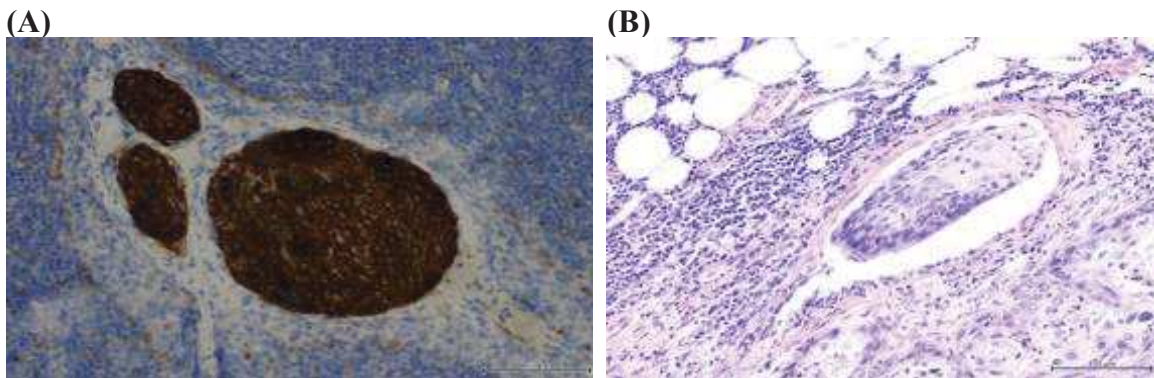
Rycina 4. Rozkład zmian nowotworowych w węzłach chłonnych miednicy, kierując się kryterium dominacji zmiany $MAC > MIC > ITC$.

Wykazano, że większość przerzutów oraz *ITC* lokalizowało się w *nSLN* (Tabela 12.), u większości chorych (4/7) stwierdzono współistnienie *MAC* z *MIC* (Tabela 13.), a w 5 na 11 przypadków udało się uzyskać obustronne, a więc optymalne wybarwienie *SLN* (Tabela 14.). Szczegółowy ilościowy i topograficzny podział według rodzaju zmian w węzłach chłonnych przedstawia Rycina 4. w tym podrozdziale, natomiast analizę liczebności węzłów chłonnych z uwzględnieniem wybarwienia umieszczono w podrozdziale 7.6.

W poniższych fotografiach zaprezentowano przerzuty raka płaskonabłonkowego w węzłach chłonnych – Fotografia 1. przedstawia przerzut wielkości ok. 1,6 mm (mikroprzerzut). Fotografia 2. (A, B) przedstawia różne przerzuty raka pod większym powiększeniem.



Fotografia 1. Niewielki węzeł chłonny zawierający mikroprzerzut, który ma ok. 1,6 mm w największym wymiarze. Powiększenie 40x, barwienie z przeciwciałem CK AE1/AE3.



Fotografia 2. **A.** Izolowane skupiska nowotworu (*ITC*) oraz zmiana, która znajduje się na granicy izolowanego *ITC* i mikroprzerzutu (nieco ponad 0,2 mm) w zatoce międzygrudkowej węzła chłonnego. Powiększenie 400x, barwienie z przeciwciałem CK AE1/AE3; **B.** Przerzut raka płaskonabłonkowego ponad 0,2 mm. Powiększenie 400x, barwienie hematoxyliną i eozyną.

7.5. Analiza zależności przerzutów w węzłach chłonnych od czynników związanych z nowotworem

7.5.1. Typ histologiczny nowotworu

W Tabeli 15. przedstawiono wyniki analizy dotyczącej związku pomiędzy typem histologicznym RSZM a przerzutami do węzłów chłonnych (*MAC/MIC*) oraz *ITC* (wszystkie „zdarzenia”). Nie uzyskano wyniku świadczącego o istotnym statystycznie związku pomiędzy typem histologicznym nowotworu a obecnością przerzutów oraz *ITC* w węzłach chłonnych.

U chorych ze zmianami nowotworowymi w węzłach chłonnych stwierdzono tylko przypadki z rakiem płaskonabłonkowym, dlatego nie można było wykazać zależności pomiędzy typem histopatologicznym raka a zmianami nowotworowymi w *nSLNs*, w tym izolowanymi *MICs*. Przedstawiają to Tabele 16. i 17.

Tabela 15. Zależność pomiędzy typem histologicznym nowotworu a obecnością „zdarzeń” w węzłach chłonnych w badanej grupie chorych (n6 = 27).

Typ histologiczny nowotworu	Stan węzłów chłonnych		
	n	puN0(<i>MAC</i> -, <i>MIC</i> -) oraz <i>ITC</i> (-)	puN1(<i>MAC</i> +/ <i>MIC</i> +) lub <i>ITC</i> (+)
Płaskonabłonkowy	24	13	11
Gruzołowy	2	2	0
Inny	1	1	0
Ogółem	27	16	11

Objaśnienia: Zastosowano test chi-kwadrat, $p=0,31344$ – brak statystycznej istotności różnic; n – liczba chorych, puN0: nie ma mikro- (*MIC*) ani makroprzerzutu (*MAC*), puN1: dodatni co najmniej jeden węzeł chłonny (obecne makro- lub/i mikroprzerzut-y), *ITC* (*isolated tumor cells*) – wyizolowane komórki nowotworu w co najmniej jednym węzle chłonnym.

Tabela 16. Zależność pomiędzy typem histologicznym nowotworu a obecnością „zdarzeń” w pozawartowniczych węzłach chłonnych (*nSLNs*) w badanej grupie chorych (n6 = 27).

Typ histologiczny nowotworu	Stan <i>nSLN</i>			
	n	puN0(<i>MAC</i> -, <i>MIC</i> -) oraz <i>ITC</i> (-)	puN1(<i>MAC</i> +/ <i>MIC</i> +) lub <i>ITC</i> (+)	<i>ITC</i> (+)
Płaskonabłonkowy	24	13	7	4
Gruzołowy	2	2	0	0
Inny	1	1	0	0
Ogółem	27	16	6	3

Objaśnienia: Zastosowano test chi-kwadrat, $p=0,79299$ – brak statystycznej istotności różnic; n – liczba chorych, puN0: nie ma mikro- (*MIC*) ani makroprzerzutu (*MAC*), puN1: dodatni co najmniej jeden węzeł chłonny (obecne makro- lub/i mikroprzerzut-y), *ITC* (*isolated tumor cells*) – wyizolowane komórki nowotworu w co najmniej jednym węzle chłonnym.

Tabela 17. Stan węzłów chłonnych pozawartowniczych (*nSLN*) w zależności od typu histologicznego nowotworu z uwzględnieniem izolowanych *MIC* (bez współistniejących makroprzerzutów, *MAC*) w badanej grupie chorych (n6 = 27).

Typ histologiczny nowotworu	Stan <i>nSLN</i>			
	n	puN0(<i>MAC</i> -, <i>MIC</i> -) oraz <i>ITC</i> (-)	<i>MIC</i> (+), <i>MAC</i> (-)	puN1(<i>MAC</i> + z <i>MIC</i> +) lub <i>ITC</i> (+)
Płaskonabłonkowy	24	13	2	9
Gruzołowy	2	2	0	0
Inny	1	1	0	0
Ogółem	27	16	2	9

Objaśnienia: Zastosowano test chi-kwadrat, $p=0,87372$ – brak statystycznie istotnych różnic; n – liczba chorych, puN0: nie ma mikro- (*MIC*) ani makroprzerzutu (*MAC*), puN1: dodatni co najmniej jeden węzeł chłonny (obecne makro- lub/i mikroprzerzut-y), *ITC* (*isolated tumor cells*) – wyizolowane komórki nowotworu w co najmniej jednym węzle chłonnym.

7.5.2. Stopień złośliwości histologicznej nowotworu (*grade*)

W Tabeli 18. ujęto wyniki analizy dotyczącej potencjalnego związku statystycznego pomiędzy stopniem złośliwości histologicznej nowotworu a obecnością jakichkolwiek zmian nowotworowych w węzłach chłonnych. Nie stwierdzono, aby ich

występowanie zależało od *grade*. Podobnie, nie stwierdzono zależności pomiędzy stopniem złośliwości histologicznej nowotworu a rodzajem zmian nowotworowych w *nSLN*, w tym w odniesieniu do *MIC* (Tabela 19. i Tabela 20.).

Tabela 18. Zależność pomiędzy stopniem złośliwości histologicznej nowotworu (*grade*) a obecnością „zdarzeń” w węzłach chłonnych w badanej grupie chorych (n6 = 27).

Stopień złośliwości nowotworu	Stan węzłów chłonnych		
	n	puN0(<i>MAC</i> -, <i>MIC</i> -) oraz <i>ITC</i> (-)	puN1(<i>MAC</i> +/ <i>MIC</i> +) lub <i>ITC</i> (+)
1	2	2	0
2	15	10	5
3	10	4	6
Ogółem	27	16	11

Objaśnienia: Zastosowano test chi-kwadrat, $p=0,19669$ – brak statystycznie istotnych różnic; n – liczba chorych, puN0: nie ma mikro- (*MIC*) ani makroprzerzutu (*MAC*), puN1: dodatni co najmniej jeden węzeł chłonny (obecne makro- lub/i mikroprzerzut-y), *ITC* (*isolated tumor cells*) – wyizolowane komórki nowotworu w co najmniej jednym węzle chłonnym.

Tabela 19. Zależność występowania zmian nowotworowych w *nSLN* (*MAC* lub *MIC*, *ITC*) od stopnia złośliwości histologicznej nowotworu w badanej grupie chorych (n6 = 27).

Stopień złośliwości nowotworu	Stan <i>nSLN</i>			
	n	puN0(<i>MAC</i> -, <i>MIC</i> -) oraz <i>ITC</i> (-)	puN1(<i>MAC</i> +/ <i>MIC</i> +) <i>ITC</i> (+)	<i>ITC</i> (+)
1	2	2	0	0
2	15	11	2	2
3	10	5	4	1
Ogółem	27	18	6	3

Objaśnienia: Zastosowano test chi-kwadrat, $p=0,47032$ – brak statystycznie istotnych różnic; n – liczba chorych, puN0: nie ma mikro- (*MIC*) ani makroprzerzutu (*MAC*), puN1: dodatni co najmniej jeden węzeł chłonny (obecne makro- lub/i mikroprzerzut-y), *ITC* (*isolated tumor cells*) – wyizolowane komórki nowotworu w co najmniej jednym węzle chłonnym.

Tabela 20. Stan węzłów chłonnych pozawartowniczych (*nSLN*) w zależności od stopnia złośliwości histologicznej nowotworu (*grade*) z uwzględnieniem izolowanych *MIC* (bez współistniejących makroprzerzutów, *MAC*, ani wyizolowanych komórek nowotworu, *ITC*) w badanej grupie chorych (n6 = 27).

Stopień złośliwości nowotworu	Stan <i>nSLN</i>			
	n	puN0(<i>MAC</i> -, <i>MIC</i> -) oraz <i>ITC</i> (-)	<i>MIC</i> (+), <i>MAC</i> (-)	puN1(<i>MAC</i> + z <i>MIC</i> +) lub <i>ITC</i> (+)
1	2	2	0	0
2	15	10	1	4
3	10	4	1	5
Ogółem	27	16	2	9

Objaśnienia: Zastosowano test chi-kwadrat, $p=0,87372$ – brak statystycznie istotnych różnic; n – liczba chorych, puN0: nie ma mikro- (*MIC*) ani makroprzerzutu (*MAC*), puN1: dodatni co najmniej jeden węzeł chłonny (obecne makro- lub/i mikroprzerzut-y), *ITC* (*isolated tumor cells*) – wyizolowane komórki nowotworu w co najmniej jednym węzle chłonnym.

7.5.3. Wielkość guza pierwotnego

W Tabeli 21. przedstawiono wyniki badania zależności statystycznej pomiędzy wielkością guza nowotworowego a obecnością zmian nowotworowych w węzłach chłonnych (*MAC*, *MIC*, *ITC*).

Tabela 21. Zależność pomiędzy wielkością guza nowotworowego a obecnością „zdarzeń” w węzłach chłonnych (*MAC*, *MIC*, *ITC*) we wszystkich przypadkach z podziałem na przypadki bez i ze zmianami nowotworowymi w węzłach chłonnych w badanej grupie chorych (n6 = 27).

Wielkość guza	Stan węzłów chłonnych		
	n	puN0(<i>MAC</i> -, <i>MIC</i> -), oraz <i>ITC</i> (-)	puN1(<i>MAC</i> +/ <i>MIC</i> +) lub <i>ITC</i> (+)
≤2 cm	11	8	3
>2 cm	16	8	8
Ogółem	27	16	11

Objaśnienia: Zastosowano test chi-kwadrat, $p=0,23763$ – brak statystycznej zależności; n – liczba chorych, puN0: nie ma mikro- (*MIC*) ani makroprzerzutu (*MAC*), puN1: dodatni co najmniej jeden węzeł chłonny (obecne makro- lub/i mikroprzerzut-y), *ITC* (*isolated tumor cells*) – wyizolowane komórki nowotworu w co najmniej jednym węzle chłonny.

Nie uzyskano wyniku istotnego statystycznie świadczącego o tym, że istnieje taka zależność. Podobnie analizując osobno grupę 11 chorych ze stwierdzonymi zmianami w węzłach chłonnych uzyskano podobny wynik (Tabela 22.).

Tabela 22. Zależność pomiędzy wielkością guza nowotworowego a obecnością „zdarzeń” w węzłach chłonnych pozawartowniczych (*nSLN*) w podgrupie 11 chorych.

Wielkość guza	Stan <i>nSLN</i>		
	n	puN0(<i>MAC</i> -, <i>MIC</i> -) oraz <i>ITC</i> (-)	puN1 (<i>MAC</i> +/ <i>MIC</i> +) lub <i>ITC</i> (+)
≤2 cm	3	0	3
>2 cm	8	2	6
Ogółem	11	2	9

Objaśnienia: Zastosowano test chi-kwadrat, $p=0,8351$ – brak statystycznej istotności; n – liczba chorych, puN0: nie ma mikro- (*MIC*) ani makroprzerzutu (*MAC*), puN1: dodatni co najmniej jeden węzeł chłonny (obecne makro- lub/i mikroprzerzut-y), *ITC* (*isolated tumor cells*) – wyizolowane komórki nowotworu w co najmniej jednym węzle chłonny;

W Tabeli 23. przedstawiono wyniki osobnej analizy poświęconej zależności między wielkością guza a *MIC* w *nSLN* w grupie 11 chorych ze zdarzeniami w węzłach chłonnych. Stwierdzono, że wielkość guza wpływa na stan *nSLN* – w grupie 11 chorych było istotnie więcej przypadków ze zmianami pierwotnymi większymi niż 2 cm i dodatnimi *nSLN* pod względem *MIC*, *MAC* lub *ITC* niż przypadków ze zmianami pierwotnymi mniejszymi lub równymi 2 cm i *nSLN* zawierającymi tylko *MIC*.

Tabela 23. Zależność występowania mikroprzerzutów (*MIC*) węzłach chłonnych pozawartowniczych (*nSLN*) od wielkości guza nowotworowego w grupie 11 chorych ze zmianami wtórnymi w węzłach chłonnych.

Wielkość guza	Stan <i>nSLN</i>		
	n	pN1(<i>MAC+</i> i <i>MIC+</i>) lub <i>ITC</i> (+)	<i>MIC</i> (+), <i>MAC</i> (-)
≤2 cm	3	1	2
>2 cm	8	8	0
Ogółem	11	9	2

Objaśnienia: Zastosowano test chi-kwadrat, $p=0,01068$ – różnica statystycznie istotna; n – liczba chorych, puN0: nie ma mikro- (*MIC*), ani makroprzerzutu (*MAC*), puN1: dodatni co najmniej jeden węzeł chłonny (obecne makro- lub/i mikroprzerzut-y); *ITC* (*isolated tumor cells*) – wyizolowane komórki nowotworu w co najmniej jednym węzle chłonnym.

7.5.4. Głębokość naciekania raka

Wyniki analizy głębokości naciekania RSZM dla dwóch grup w odniesieniu do cechy N: bez przerzutów („0” – węzły chłonne niezawierające *MAC*, *MIC*, ani *ITC*) i z przerzutami („1” – zawierające któryś z typów zmian nowotworowych), znajdują się poniżej na Wykresie 2.

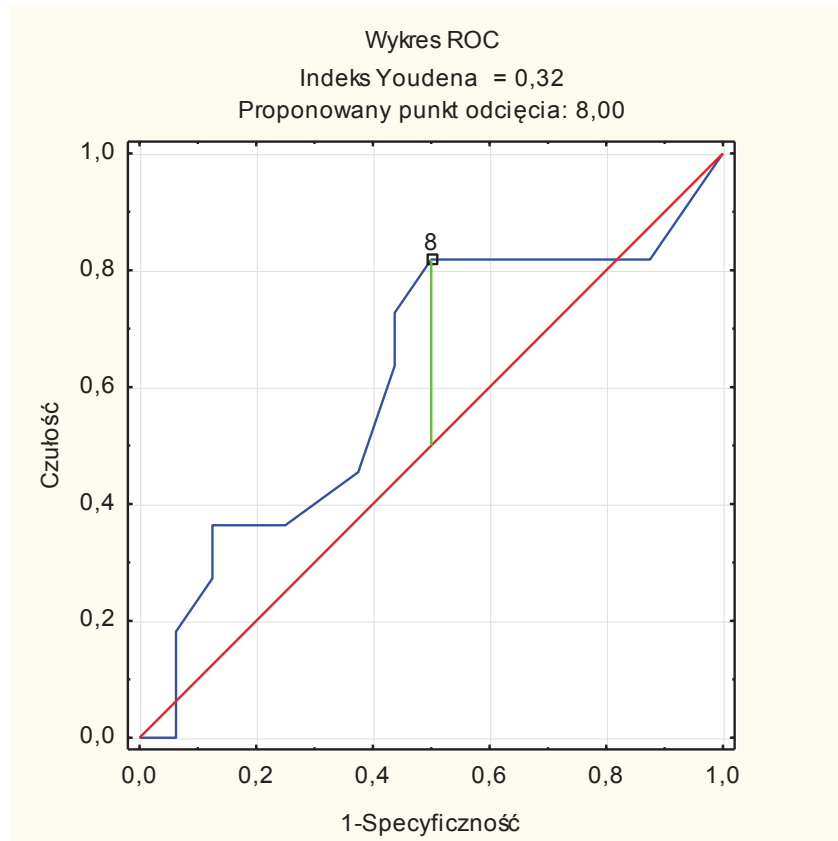


Wykres 2. Zależność pomiędzy głębokością naciekania (w milimetrach, wyrażonej jako mediana) a stwierdzeniem jakiegokolwiek zmiany nowotworowej w węzłach chłonnych; test t-studenta dla dwóch średnich $p=0,310$; test F wariancji $p=0,858$.

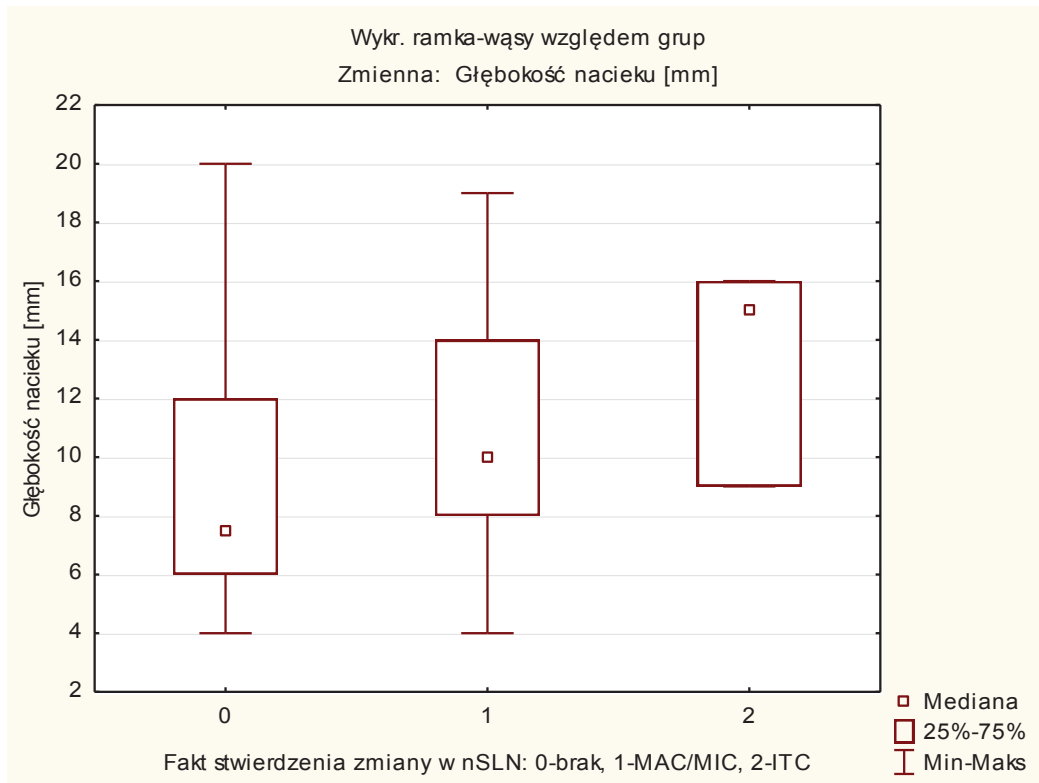
Średnie w rozkładach głębokości naciekania w grupie ze zmianami nowotworowymi i bez nich nie różnią się istotnie statystycznie.

Na wykreślonej krzywej *ROC* (Wykres 3.) pokazano wynik analizy głębokości naciekania w odniesieniu do wartości tej cechy, która mogłaby dyskryminować przypadki ujemne pod względem przerzutów i *ITC* od dodatnich pod względem którejs z tych zmian. Według indeksu Youdena wartość ta wynosiłaby 8 mm.

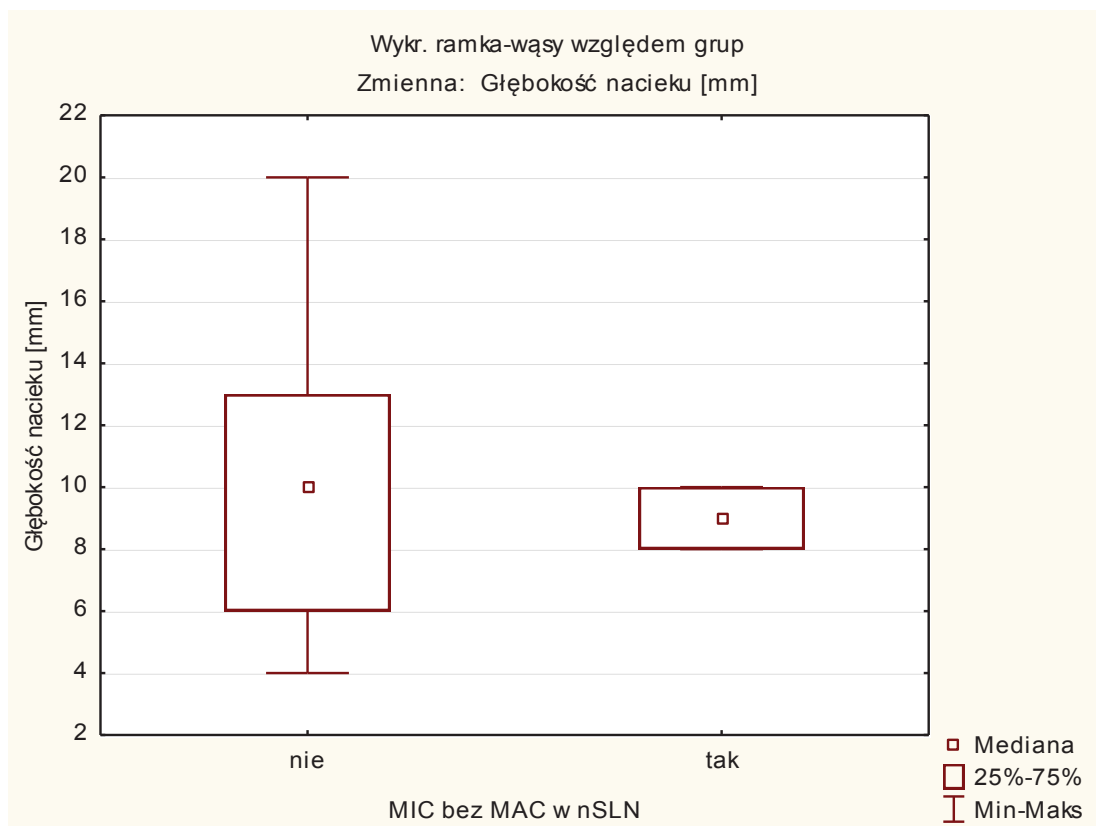
Nie znaleziono zależności pomiędzy głębokością naciekania a przerzutami w *nSLN(s)*. Kolejny wykres (Wykres 4.) ilustruje tę zależność. Głębokość naciekania także nie korelowała z obecnością izolowanych *MIC* w *nSLN(s)*, co przedstawia Wykres 5.



Wykres 3. Krzywa ROC ilustrująca wartość decyzyjną punktu odcięcia głębokości naciekania równa 8 mm dla „zdarzeń” w węzłach chłonnych.



Wykres 4. Zależność pomiędzy głębokością naciekania a obecnością przerzutu (cecha N1) i ITC w przynajmniej jednym *nSLN*. ANOVA, test Kruskala-Wallisa $p=0,2498$ - brak statystycznej istotności.



Wykres 5. Zależność pomiędzy głębokością naciekania a obecnością izolowanych MIC w *nSLN* (cecha N1) i ITC w przynajmniej jednym *nSLN*. Test U Manna-Whitneya $p=0,926236$, brak statystycznej istotności.

7.5.5. Naciekanie okołonaczyniowej przestrzeni limfatycznej (LVSI)

W Tabeli 24. oraz Tabeli 25. przedstawiono wyniki badania zależności pomiędzy LVSI a zmianami nowotworowymi w węzłach chłonnych. W Tabeli 24. wzięto pod uwagę wszystkie zmiany nowotworowe w węzłach chłonnych łącznie. W Tabeli 25. podzielono zdarzenia na stopień ich ważności i roli w określeniu *stagingu*, przy czym oceniono tylko te przypadki, w których były stwierdzone zmiany nowotworowe w węzłach chłonnych. W celu porównania zliczono przypadki stwierdzonych dodatnich węzłów chłonnych pod względem *MAC*, *MIC* i *ITC* w H i E oraz w *IHC*. Przyjęto w analizie brać pod uwagę 1 zdarzenie na 1 węzeł chłonny zgodnie z kryterium ważności: w przypadku współistnienia *MAC* i *MIC* przyjmowano za istotne zdarzenie wystąpienie *MAC*, a w przypadku *MIC* i *ITC* przyjmowano za istotne zdarzenie wystąpienie *MIC*.

W Tabeli 26. ujęto zależność pomiędzy LVSI a zmianami w *nSLN*. Okazało się, że LVSI ma wpływ na stan tych węzłów chłonnych. Tabela 27. pokazuje, że zależność LVSI pozostaje jednak bez wpływu na izolowane występowanie mikroprzerzutów w *nSLN*.

Tabela 24. Częstość występowania i zależność pomiędzy naciekaniem przestrzeni okołonaczyniowej limfatycznej (LVSI) a obecnością „zdarzeń” w węzłach chłonnych w grupie badanych chorych (n6 = 27).

LVSI	Stan węzłów chłonnych		
	n	puN0(<i>MAC</i> -, <i>MIC</i> -) oraz <i>ITC</i> (-)	puN1(<i>MAC</i> + i/lub <i>MIC</i> +)
(-)	12	10	2
(+)	15	6	9
Ogółem	27	16	11

Objaśnienia: Zastosowano test chi-kwadrat, $p=0,02278$ – różnice statystycznie istotne; n – liczba chorych; puN0: nie ma mikro- (*MIC*) ani makroprzerzutu (*MAC*), puN1: dodatni co najmniej jeden węzeł chłonny (obecne makro- lub/i mikroprzerzut-y).

Tabela 25. Zależność pomiędzy naciekaniem przestrzeni okołonaczyniowej limfatycznej (LVSI) a obecnością „zdarzeń” w węzłach chłonnych z podziałem na ich stopień ważności w grupie 11 chorych, u których stwierdzono zmiany nowotworowe.

LVSI	Stan węzłów chłonnych			
	n	<i>ITC</i> decydujące o <i>stagingu</i>	<i>MIC</i> decydujące o <i>stagingu</i>	<i>MAC</i> decydujące o <i>stagingu</i>
(-)	2	1	0	1
(+)	9	3	2	4
Ogółem	11	4	2	5

Objaśnienia: Zastosowano test chi-kwadrat, $p=0,74806$ – brak statystycznej zależności; n – liczba chorych, puN0: nie ma mikro- (*MIC*) ani makroprzerzutu (*MAC*), puN1: dodatni co najmniej jeden węzeł chłonny (obecne makro- lub/i mikroprzerzut-y), *ITC* (*isolated tumor cells*) – wyizolowane komórki nowotworu w co najmniej jednym węzle chłonny.

Tabela 26. Zależność pomiędzy naciekaniem przestrzeni okołonaczyniowej limfatycznej (*LVSI*) a stanem węzłów chłonnych pozawartowniczych (*nSLN*).

<i>LVSI</i>	Stan <i>nSLN</i>			
	n	puN0(<i>MAC</i> -, <i>MIC</i> -, <i>ITC</i> (-))	puN1(<i>MIC</i> + i/lub <i>MAC</i> +))	<i>ITC</i> (+)
(-)	12	11	1	0
(+)	15	7	5	3
Ogółem	27	18	6	3

Objaśnienia: Zastosowano test chi-kwadrat, $p=0,04285$ – istotnie statystyczna zależność, n – liczba chorych; puN0: nie ma mikro- (*MIC*) ani makroprzerzutu (*MAC*), puN1: dodatni co najmniej jeden węzeł chłonny (obecne makro- lub/i mikroprzerzut-y), *ITC* (*isolated tumor cells*) – wyizolowane komórki nowotworu w co najmniej jednym węzle chłonnym.

Tabela 27. Zależność pomiędzy naciekaniem przestrzeni naczyń krwionośnych i chłonnych (*LVSI*) a izolowaną obecnością mikroprzerzutów w węzłach chłonnych pozawartowniczych (*nSLN*).

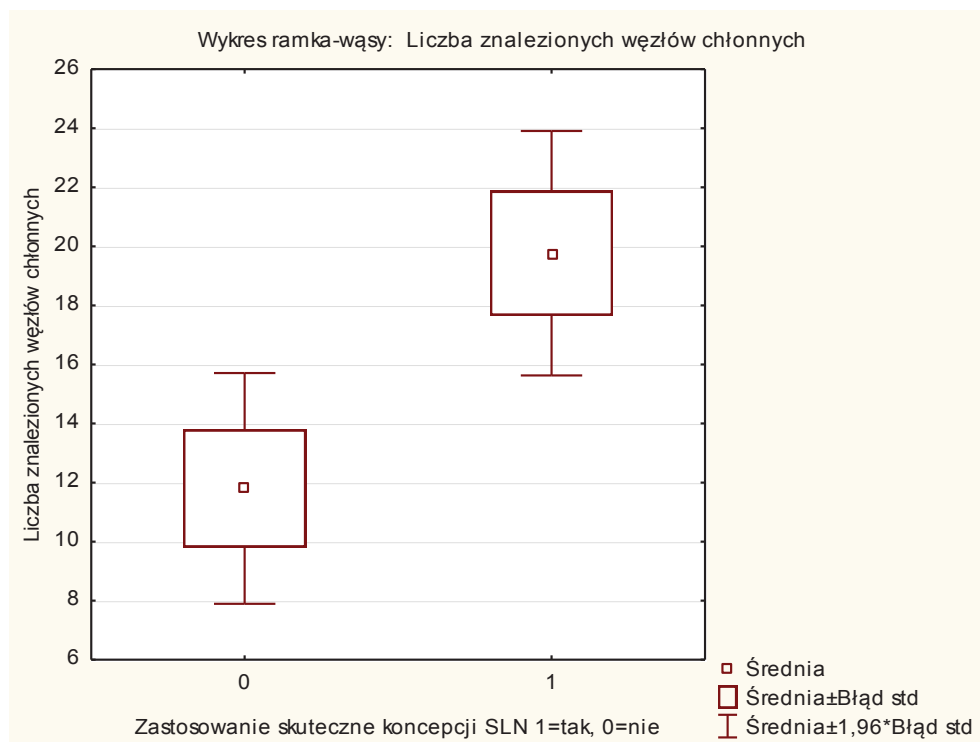
<i>LVSI</i>	Stan <i>nSLN</i>			
	n	puN0(<i>MAC</i> -, <i>MIC</i> -) oraz <i>ITC</i> (-)	puN1(<i>MAC</i> + i/lub <i>MIC</i> +) lub <i>ITC</i> (+)	Izolowane <i>MIC</i>
(-)	12	10	2	0
(+)	15	6	7	2
Ogółem	27	16	9	2

Objaśnienia: Zastosowano test chi-kwadrat, $p=0,18867$ – brak statystycznej zależności; n – liczba chorych, puN0: nie ma mikro- (*MIC*) ani makroprzerzutu (*MAC*), puN1: dodatni co najmniej jeden węzeł chłonny (obecne makro- i/lub mikroprzerzut-y), *ITC* (*isolated tumor cells*) – wyizolowane komórki nowotworu w co najmniej jednym węzle chłonnym.

7.6. Analiza liczebności wykrytych węzłów chłonnych przy zastosowaniu koncepcji wartowniczego węzła chłonnego

Porównano liczby węzłów chłonnych uzyskiwanych ze skutecznym użyciem koncepcji *SLN* i bez niej oraz z nieudanym jej zastosowaniem (Rycina 3. odpowiednio grupy $n_6 = 27$ oraz łącznie $n_4 = 10$ i $n_5 = 3$, s. 40). Wyniki przedstawiono na Wykresie 6. oraz w Tabeli 28. Wykazano, że średnia liczba węzłów chłonnych w grupie ze skuteczną detekcją *SLN* jest większa niż w grupie bez *SLND* i nieskuteczną *SLND*.

Dodatkowo przy tej analizie wykonano obliczenia sprawdzające, czy wielkość guza mniejsza lub równa 2 cm (wobec > 2 cm) pozwala zrealizować koncepcję *SLN* oraz, czy w tym pierwszym przypadku częściej udaje się ją zrealizować obustronnie (optymalnie)? W tym celu zestawiono wielkość guza z decyzją odnośnie zastosowania tej koncepcji (Tabela 29. – część górna) oraz wielkość guza z faktem w pełni udanego (optymalnie dwustronnego) wybarwienia *SLN* (Tabela 29. – część dolna). W obu przypadkach nie stwierdzono istotnej statystycznie zależności.



Wykres 6. Liczba znalezionych węzłów chłonnych bez i ze skutecznym zastosowaniem koncepcji węzła chłonnego wartowniczego (SLN). Test dla dwóch średnich; $p=0,046$ (Test wariancji F – $p=0,06$ – wariancje są równe).

Tabela 28. Liczba znalezionych węzłów chłonnych u wszystkich chorych w grupie $n3 = 40$ w zależności od skutecznego zastosowania koncepcji SLN.

Koncepcja SLN	Statystyka liczebności węzłów chłonnych						
	Średnia	N	Min.	Maks.	SD	Przedział ufności (95% CI)	Med.
Tak	19,07	27	3,00	53,00	11,32	14,59-23,55	19
Nie	15,08	13	5,00	42,00	10,16	15,08-21,22	13
Ogółem	17,78	40	3,00	53,00	10,99	14,26-21,99	15,5

Objaśnienia: Med. – mediana; N – liczba przypadków; SD – odchylenie standardowe; SLN – węzeł chłonny wartowniczy.

Tabela 29. Wielkość guza i realizacja koncepcji węzła chłonnego wartowniczego (SLN) dla grup $n3$ i $n6$.

Wielkość guza	Analiza grupy $n3 = 40$ chorych*		
	n	Brak skutecznego wykrycia SLN	Skuteczne wykrycie SLN
≤2 cm	15	4	11
>2 cm	25	9	16
Ogółem	40	13	27

Wielkość guza	Analiza grupy $n6 = 27$ chorych**		
	n	Jednostronne wybarwienie	Dwustronne wybarwienie
≤2 cm	11	6	5
>2 cm	16	10	6
Ogółem	27	16	11

* Test chi-kwadrat $p=0,54177$ – brak statystycznie istotnej zależności; n – liczba przypadków.

** Test chi-kwadrat $p=0,67936$ – brak statystycznie istotnej zależności.

7.7. Analizy liczebności wykrytych węzłów chłonnych za pomocą różnych technik histopatologicznych

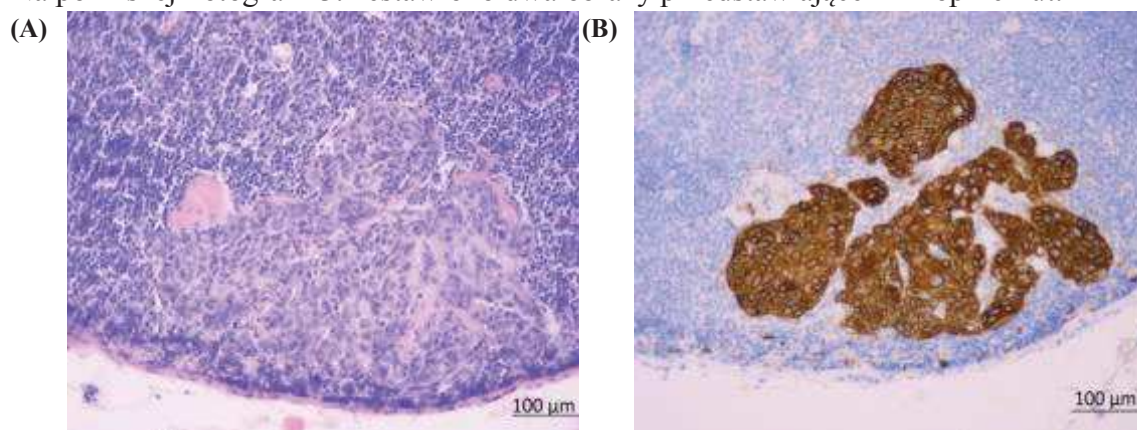
W celu zestawienia poszczególnych sposobów analiz histopatologicznych w *ultrastagingu*, przypadki podzielono na trzy grupy: poddane tylko ocenie w hematoxylinie i eozynie (H i E), tylko w immunohistochemii (IHC) oraz w jednej i drugiej metodzie jednocześnie. Wyniki analizy przedstawia Tabela 30.

Tabela 30. Zestawienie wykrytych zmian nowotworowych z użyciem *ultrastagingu* histopatologicznego.

Rodzaj metody <i>ultrastagingu</i> histopatologicznego	n	puN0(MAC-, MIC-) oraz ITC(-)	puN1(MAC+/MIC+) oraz ITC(+)
H i E	7	5	2
H i E + IHC	19	11	8
IHC	1	0	1
Ogółem	27	16	11

Objaśnienia: H i E – hematoxylina i eozyna; IHC – immunohistochemia; n – liczba przypadków;

Na poniższej Fotografii 3. zestawiono dwa obrazy przedstawiające mikroprzerzut.



Fotografia 3. Mikroprzerzut raka w węzle chłonny, w powiększeniu 200x; **A.** Barwienie hematoxyliną i eozyną; **B.** Barwienie z użyciem przeciwciał CK AE1/AE3.

7.8. Zmiany w ocenie zaawansowania choroby po zastosowaniu *ultrastagingu*

W Tabeli 31. przedstawiono zbiorczo charakterystykę pacjentek pod względem występowania *LVLND – MICs* oraz *ITC*. Zmiana cechy „N” nastąpiła w 1 na 27 przypadków (3,7%).

W jednym przypadku chorej (pacjentka o inicjałach PM, kolejny nr 13; pT1bN0Mx wg klasyfikacji *UICC/AJCC* [109] oraz pT1b1(1,0cm)uN1mi, i(+)(3/5, 1/2sn), 1 (LN)Mx wg rozwiniętej klasyfikacji) zaobserwowano zmianę klasyfikacji węzłów chłonnych. Używając standardowej oceny histopatologicznej bez poszukiwania mikroprzerzutów nie stwierdzono obecności przerzutów (*MIC*) zarówno w dwóch laparoskopowo usuniętych *SLN*, jak i w pozostałych trzech *nSLN*. Po zastosowaniu techniki oceny preparatu w *ultrastagingu* i barwieniu HE oraz *IHC* znaleziono mikroprzerzuty odpowiednio w 1/2 oraz 3/3 węzłach chłonnych oraz dodatkowo trzy komórki nowotworu (*ITC*) w jednym z węzłów chłonnych.

Tabela 31. Szczegółowy wykaz cechy obecności mikroprzerzutów (*MIC*) i wyizolowanych komórek nowotworu (*ITC*) w węzłach chłonnych wartowniczych (*SLN*) i pozawartowniczych (*nSLN*) wraz z oznaczeniem przypadków czcionką pogrubioną, w których nastąpiły zmiany cechy N w grupie badanej (n6 = 27).

Cecha Pacjentka	N węzłów chłonnych zbadanych w <i>ultrastagingu</i>	<i>SLN</i>			<i>nSLN</i>			Zmiana cechy N¶	Przypadek fałszywie ujemny
		<i>MAC</i>	<i>MIC</i>	<i>ITC</i>	<i>MAC</i>	<i>MIC</i>	<i>ITC</i>		
1. (J.B)	26	-	-	-	-	-	-	-	-
2. (L.M)	24	-	-	-	-	-	-	-	-
3. (T.I.)	36	-	-	-	-	-	-	-	-
4. (OE)	29	-	-	-	-	-	-	-	-
5. (KA)	9	-	-	-	-	-	-	-	-
6. (MZ)	37	-	-	-	-	-	-	-	-
7. (T.M.)	16	+	+	-	+	+	-	-	-
8. (Ł.D.)	5	-	-	-	-	-	-	-	-
9. (W.J.)	8	-	-	-	-	-	+	-	-
10. (J.M.)	12	-	-	+	-	-	-	-	-
11. (B.E.)	9	-	-	-	-	-	-	-	-
12. (K.T)	12	-	-	+	-	-	-	-	-
13. (P.M.)	5	-	+	-	-	+	+	+	-
14. (W.W.)	17	-	-	-	-	-	-	-	-
15. (J.L)	20	-	-	+	-	-	+	-	-
16. (S.D)	24	+	+	-	+	+	-	-	-
17. (P.E.)	19	+	+	-	+	+	-	-	-
18. (W.J)	15	-	-	-	-	-	-	-	-
19. (O.S)	12	-	-	-	+	-	-	-	+
20. (G.B.)	53	-	-	-	-	-	-	-	-
21. (D.M.)	24	-	-	-	-	-	-	-	-
22. (M.W)	10	-	-	-	-	-	-	-	-
23. (B.M.)	20	-	+	-	-	-	-	-	-
24. (L.M.)	3	-	-	-	-	-	-	-	-
25. (S.J.)	24	-	-	-	-	-	-	-	-
26. (K.T.)	20	-	-	-	-	-	-	-	-
27. (MW)	27	-	-	-	+	+	-	-	+
SUMA	516	3	5	3	4	5	3	1	2

Objaśnienia: ¶Tylko w przypadku ponownej oceny preparatu w trybie *ultrastagingu*, po którym znaleziono wcześniej niewykryte przerzuty; pogrubieniem oznaczono 11 przypadków, w których stwierdzono zmiany wtórne w węzłach chłonnych.

Przypadek ten cechował się rozpoznaniem raka płaskonabłonkowego o wysokim stopniu złośliwości (*grade 3*), naciekaniem przestrzeni okołonaczyniowej limfatycznej oraz głębokością naciekania raka 10 mm. Chora na podstawie wyniku badania rutynowego została skierowana na chemioradioterapię. Oba przypadki fałszywie ujemne (19., OS oraz 27., MW) zostały omówione w podrozdziale 7.4 na stronie 49). Szczegółowe podsumowanie przypadków zmian w klasyfikacji jest przedstawione w Tabeli 32.

Tabela 32. Zmiany w klasyfikacji po *ultrastagingu* w grupie n6 = 27 chorych ze skutecznym wybarwieniem węzła chłonnego wartowniczego (SLN).

Cecha	Charakter zmiany	Różnica
Stopień zaawansowania choroby	• kliniczny wobec patologicznego (<i>ultrastaging</i>)	5 przypadków (nr 4, 10, 16, 21, 27)
	• w ocenie patologicznej: rutynowo (standardowe opracowanie preparatu) wobec <i>ultrastagingu</i>	
	1. Stopień cechy T	
	• z pT1a2 lub puT1b1 na wyższy	1 przypadek (nr 6)
	• z pT2a1 na puT1b1 (z wyższego na niższy)	1 przypadek (nr 10)
	2. Stopień cechy N (z pN0 na puN1)	1 przypadek (nr 13)
	3. Stopień cechy M (z pM0/Mx na puM1)	1 przypadek (nr 27)
Potencjalna zmiana rokowania	Wskutek zmiany cechy N	Na niekorzyść u jednej pacjentki (nr 13)
	Wskutek zmiany cechy M	Na niekorzyść u jednej pacjentki (nr 27)

Objaśnienia: *T, N, M* – *tumor, node, metastasis features*, guz, węzeł, przerzuty; u – wykonany *ultrastaging*.

7.9. Przewidywanie obecności przerzutów (makro i mikroprzerzutów) oraz wyizolowanych komórek nowotworu w węzłach chłonnych pozawartowniczych na podstawie informacji uzyskanych z badania węzłów chłonnych wartowniczych

Szczegółową analizę zależności pomiędzy występowaniem *MAC* w *SLN*, a towarzyszącym występowaniem *MIC* w *nSLN* w grupie 11 chorych ze zmianami nowotworowymi w węzłach chłonnych przedstawiono w Tabeli 33. Wykazano istotną statystycznie zależność pomiędzy stwierdzeniem *MAC* w *SLN* i *MIC* w *nSLN*.

Tabela 33. Współwystępowanie makroprzerzutów (*MAC*) w węzłach chłonnych wartowniczych (*SLN*) z mikroprzerzutami (*MIC*) w węzłach chłonnych pozawartowniczych (*nSLN*).

<i>SLN-MAC</i>	<i>nSLN-MIC</i>		
	n	(-)	(+)
-	8	7	1
+	3	0	3
Razem	11	7	4

Objaśnienia: Zastosowano test chi-kwadrat, $p=0,00721$ – zależność jest statystycznie istotna; n – liczba przypadków, *nSLN-MIC*: dodatni *MIC* w przynajmniej jednym *nSLN*, *SLN-MAC*: dodatni *MAC* w przynajmniej jednym *SLN*.

W kolejnej tabeli umieszczono dane na temat stanu węzłów chłonnych (*SLN* i *nSLN*) pod względem przerzutów nowotworu wraz z liczbą przypadków i odpowiadającym im stanowi węzłów chłonnych pod względem *ITC* (Tabela 34.). Nie stwierdzono istotnej statystycznie zależności pomiędzy stanem *SLN/nSLN* a obecnością *ITC* w węzłach chłonnych.

W analizie, której wyniki są ujęte w Tabeli 35. pokazano, że wystąpienie przerzutu w *SLN* sprzyja wystąpieniu jakiegokolwiek zdarzenia nowotworowego

w *nSLN*. Wyniki pokazane w Tabeli 36. wskazują natomiast, że zależność ta nie istnieje dla izolowanych *MICs* w *nSLNs*.

Tabela 34. Zdarzenia decydujące o *stagingu* u 11 chorych, u których wykryto *SLN*, w podziale na węzły chłonne wartownicze (*SLN*) i pozawartownicze (*nSLN*) w odniesieniu do wyizolowanych komórek nowotworu (*ITC*).

Stan <i>SLN</i>	Stan <i>nSLN</i>	n (%)	<i>SLN-ITC</i>	<i>nSLN-ITC</i>
-	-	4 (36,36)	3	2
-	+	2 (18,18)	0	0
+	-	1 (9,09)	0	0
+	+	4 (36,36)	0	1
RAZEM		11 (100)	3	3

Objaśnienia: Zastosowano test chi-kwadrat, $p=0,12168$ – brak statystycznie istotnej zależności; lewa część tabeli: fakt dodatniego (+) *SLN* lub *nSLN* dotyczy stwierdzenia makroprzerzutu(ów) lub mikroprzerzutu(ów) w danym węźle chłonnym, *ITC* – wyizolowane komórki nowotworu; prawa części tabeli: dotyczy liczby przypadków *ITC* odpowiednio w węzłach chłonnych wartowniczych (*SLN-ITC*) i pozawartowniczych (*nSLN-ITC*).

Tabela 35. Analiza współwystępowania dodatnich węzłów chłonnych wartowniczych (*SLN*) pod względem makro (*MAC*) lub/i mikroprzerzutów (*MIC*) ze zmianami nowotworowymi w węzłach chłonnych pozawartowniczych (*nSLN*).

Obecność <i>MAC</i> lub/i <i>MIC</i> w <i>SLN</i>	Obecność <i>MAC</i> lub/i <i>MIC</i> lub/i <i>ITC</i> w <i>nSLN</i>		
	(-)	(+)	n
(-)	17	5	22
(+)	1	4	5
Ogółem	18	9	27

Objaśnienia: Zastosowano test chi-kwadrat, $p=0,0142$ – zależność statystycznie istotna; n - liczba przypadków.

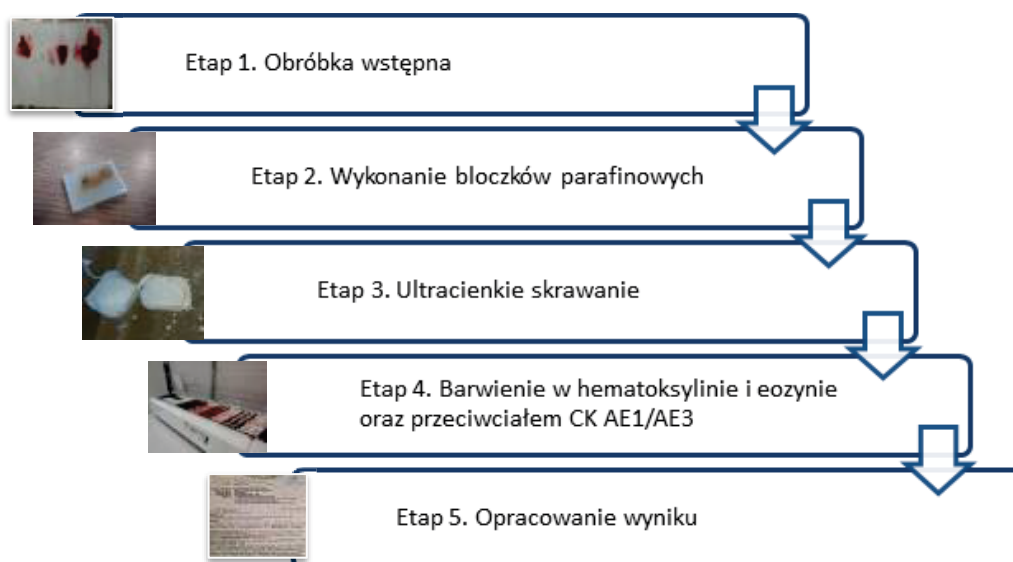
Tabela 36. Analiza współwystępowania dodatnich węzłów chłonnych wartowniczych (*SLN*) pod względem makro (*MAC*) lub/i mikroprzerzutów (*MIC*) z izolowanymi mikroprzerzutami w węzłach chłonnych pozawartowniczych (*nSLN*).

Obecność <i>MAC</i> lub/i <i>MIC</i> w <i>SLN</i>	Izolowana obecność <i>MIC</i> w <i>nSLN</i>		
	(-)	(+)	n
Nie	1	1	2
Tak	3	1	4
Ogółem	4	2	6

Objaśnienia: Zastosowano test chi-kwadrat, $p=0,5403$ – brak statystycznej istotności; n – liczba przypadków.

7.10. Synopsis raportowania wyników w *ultrastagingu*

Poniżej przedstawiono streszczenie procesu opracowania preparatów pooperacyjnych, według którego postępowano. Jego rozwinięcie w Tabeli 37. może stanowić instrukcję, jak należałoby postępować w *ultrastagingu* histopatologicznym. Rycina 5. przedstawia etapy opracowania preparatu.



Rycina 5. Schematyczne przedstawienie wzorcowego opracowania materiału histopatologicznego po operacji.

Tabela 37. Etapy opracowania preparatu tkankowego w *ultrastagingu*.

Etap 1:	<ul style="list-style-type: none"> • Odpowiednie opisanie nadesłanych węzłów chłonnych z podaniem ich liczby oraz umiejscowienia • Utrwalenie materiału tkankowego w płynie utrwalającym (4% formaldehyd z buforem fosforanowym, 24h), wypłukanie wodą destylowaną • Odwadnianie utrwalonych preparatów za pomocą procesora tkankowego (roztwory alkoholu, ksylenu, parafina)
Etap 2:	<ul style="list-style-type: none"> • Zatopienie przepojonych parafiną preparatów stanowiących kostki parafinowe w foremkach, dostosowanych wielkością do preparatu
Etap 3:	<ul style="list-style-type: none"> • Krojenie skrawków parafinowych grubości 4µm przy użyciu mikrotomu saneczkowego • Skrawanie co 150 µm, pobieranie na jednym poziomie dwóch skrawków na silanizowane szkiełka • Skrawanie przekrojowe węzłów chłonnych do imentu (jeden skrawek na HE, drugi na CK) • Suszenie skrojonych skrawków w cieplarce (24h, temp. 55°C)
Etap 4:	<ul style="list-style-type: none"> • Odparafinowanie skrawków poprzez roztwory ksylenu, następnie nawodnienie w szeregu alkoholowym, począwszy od absolutnego, przez 96%, do 70% • Płukanie preparatów i zabarwienie kolejno hematoksyliną Mayera i eozyną • Zapewnienie trwałości zabarwionego preparatu na szkiełku poprzez odwodnienie (szereg odwrotny)
Etap 5:	<ul style="list-style-type: none"> • Ciepłe odmaskowanie antygenu w temperaturze wstępnego ogrzewania 65°C i czas odmaskowania antygenu 97°C przez 20 minut, schładzanie do 65°C • Zastosowanie zautomatyzowanego procesu barwienia zawierającego zestaw wszystkich odczynników i roztworów potrzebnych do barwienia immunohistochemicznego • Ręczne odwadnianie skrawków i zamknięcie w syntetycznym medium

Regionalne węzły chłonne są oceniane za pomocą *ultrastagingu* i na wyniku histopatologicznym są zebrane następujące informacje dotyczące statusu węzłów chłonnych:

Regionalne węzły chłonne (puN)

puNx: Nie mogą być ocenione

puN0: Regionalne węzły chłonne wolne od przerzutów

puN1: Przerzuty do regionalnych węzłów chłonnych

Liczba znalezionych/nadesłanych węzłów chłonnych:

Liczba znalezionych/nadesłanych węzłów chłonnych wartowniczych:

Liczba zbadanych węzłów chłonnych bez przerzutów raka:

Liczba węzłów chłonnych z przerzutami raka:

Liczba węzłów chłonnych z izolowanymi mikroprzerzutami:**Liczba węzłów chłonnych z wyizolowanymi komórkami nowotworowymi (ITC):**

W raporcie należy podać metodę detekcji *ITC*

Regionalne węzły chłonne obejmują węzły: przymaciczne, przyszyjkowe, zasłonowe, biodrowe wewnętrzne, biodrowe zewnętrzne, biodrowe wspólne, krzyżowe i przedkrzyżowe. **Węzły chłonne opisane przez operatora inaczej należy wziąć w cudzysłów.**

Klasyfikacja zaawansowania nowotworu zostaje oceniona za pomocą klasyfikacji *TNM*. Dla przykładu użytego w tym podrozdziale (KA, nr 8):

Regionalne węzły chłonne (puN)

puN0: Regionalne węzły chłonne wolne od przerzutów

Ilość znalezionych/nadesłanych węzłów chłonnych: 9

Liczba znalezionych/nadesłanych węzłów chłonnych wartowniczych: 2

Liczba zbadanych węzłów chłonnych bez przerzutów raka: 9

Liczba węzłów chłonnych z przerzutami raka: 0

Liczba węzłów chłonnych z izolowanymi mikroprzerzutami: 0

Liczba węzłów chłonnych z wyizolowanymi komórkami nowotworowymi (ITC): 0

(Hematoksylina i eozyna)

Węzły chłonne biodrowe zewnętrzne (0/1), „wybarwiony węzeł wartowniczy strona prawa” (0/1), węzły chłonne zasłonowe (0/3), węzły chłonne biodrowe zewnętrzne (0/3), „wybarwiony węzeł wartowniczy zasłonowy strona lewa” (0/1).

pT1a2(0,6cm)uN0(0/9, 0/2sn)Mx

8. Dyskusja

W wyselekcjonowanej grupie 27 pacjentek z wczesnym rakiem szyjki macicy (stopnie IA2 i IB1 wg klasyfikacji *FIGO*) z wyznakowaniem węzłów chłonnych wartowniczych przynajmniej jednej strony, znaleziono dzięki *ultrastagingowi* histopatologicznemu mikroprzerzuty w 16/450 (3,6%) węzłów chłonnych pozawartowniczych. U 3 chorych (11,2%) z jednostronną identyfikacją *SLN* znaleziono zmiany w *nSLN* przy ich braku w *SLN*. W pierwszym przypadku po niewybarwionej stronie miednicy zidentyfikowano *MAC* w *nSLN*. W drugim przypadku, przy prawostronnym wybarwieniu *SLNs*, obustronnie wykryto *MIC* w *nSLNs*. W trzecim przypadku znaleziono *ITC* w *nSLNs*. Procedura ultradokładnego badania wszystkich węzłów chłonnych wpłynęła na zmianę statusu węzłów chłonnych z ujemnych na dodatnie oraz zmianę statusu przerzutowego choroby (przerzut odległy).

Głównym ograniczeniem pracy doktorskiej jest mała wielkość kohorty chorych. Przy usuniętych średnio ok. 19,4 węzłów chłonnych na pacjentkę (łącznie 515), średnio na 1 chorą przypadało ok. 180 ocenionych szkiełek. Wysoki koszt badania immunohistochemicznego ograniczał możliwość selekcji pacjentek do przypadków podobnych pod względem zaawansowania klinicznego i szeroko uznawanych za cel procedury *SLND* na świecie. Z tego powodu materiał pracy doktorskiej jest w znacznym stopniu homogeny pod względem stanu zaawansowania raka (dominuje stopień IB1 wg klasyfikacji *FIGO*). Pozwoliło to wprawdzie na wyciągnięcie wniosków o dużym stopniu wiarygodności, jednak właściwych tylko do RSZM w stopniu IB1. Na obronę można jednak podać fakt, że część raków w stopniu zaawansowania klinicznego *FIGO* IB1 miała spełnione kryterium wielkości nacieku niewiele ponad granicę kryterium określania stadium IA2. Minusem może być jednak również wyznakowanie *SLN* za pomocą pojedynczej metody, co nie jest optymalne i w konsekwencji doprowadziło w części przypadków do jednostronnej identyfikacji *SLN*. Jednakże, założeniem pracy było zbadać wykonalność oznaczenia *nSLN* pod względem histopatologicznym w *ultrastagingu*. Selekcję pacjentek zawężono do tych chorych, które miały przynajmniej jeden *SLN* (każdy inny węzeł chłonny był nazwany *nSLN*). Wymienione wyżej słabe punkty pracy doktorskiej można poddać szerszej dyskusji, cytując publikację Van de Lande i wsp. [74]. Zespół ten opublikował w 2007 roku przegląd systematyczny obejmujący 23 prace naukowe i 842 pacjentki z wczesnym RSZM, w którym nie stwierdzono statystycznie istotnej różnicy w zbiorczej analizie czułości wykrywania *SLN* na korzyść metody łączącej koloid technetu (^{99m}Tc) z niebieskim barwnikiem w porównaniu do samego niebieskiego barwnika.

Szerokość kryteriów selekcji odzwierciedla odsetek pacjentek z obecnością zmian w węzłach chłonnych. W grupie pacjentek poddanych analizie w pracy doktorskiej odsetek zajętych przez przerzuty węzłów chłonnych wartowniczych wyniósł 15% (12/66), a wliczając *ITC* – 24% (16/66). W niniejszym materiale średnia liczba usuniętych *SLNs* wyniosła 2,5 na pacjentkę, tj. przeciętnie, choć bliżej dolnej granicy przedziału podawanego w literaturze (2-4 *SLNs*) [89,90].

Stwierdzona klinicznie (przedoperacyjnie) nieobecność przerzutów w węzłach chłonnych jest warunkiem podjęcia procedury *SLND*, a ich stwierdzenie ma

podstawowe znaczenie rokownicze. Rokowanie można jeszcze zróżnicować w zależności od liczby zajętych węzłów chłonnych [91,93]. Stwierdzenie przerzutów w węzłach chłonnych ma także znaczenie predykcyjne, gdyż kwalifikacja chorej do odpowiedniego leczenia pooperacyjnego odbywa się zgodnie ze stanem węzłów chłonnych. W przypadku *stagingu* w RSZM, w stadiach IA2 i IB1 wg klasyfikacji *FIGO* (tj. wczesnym raku) wszystkie przypadki mogą być traktowane jako „ujemne węzłowo”, gdyż *FIGO* nie nakłada obowiązku oceny węzłów chłonnych (status węzłowy jest niepewny lub nieznan).

Wykonalność koncepcji *SLN* w przypadku RSZM była celem wielu badań, wśród których najważniejszym wydaje się badanie autorstwa Altagassena i wsp. na grupie 590 chorych z wielome stadiami RSZM. Wykazano w nim największą efektywność techniki podwójnego znaczenia radiokoloide i niebieskim barwnikiem, co pozwala uzyskać odsetek detekcji *SLN* wynoszący 93,5% [48]. Tak wysokie wartości detekcji były jednak możliwe do osiągnięcia w małych rakach (do 2 cm w największym wymiarze), co determinowało użycie *SLND* w RSZM do bardzo wczesnych zmian. W praktyce, użycie *SLND* jest pochodną skryningu RSZM i będzie coraz częstsze, gdyż więcej wykrytych zmian będzie miało (dużo) mniej niż 2 cm średnicy. W pracy doktorskiej nie ograniczono selekcji do małych guzów szyjki macicy. Wykazano, że wielkość zmiany nie miała znaczenia w kontekście skuteczności (jedno, obustronność, brak wybarwienia), co może też wynikać z niedużej liczby chorych.

Tematowi *ultrastagingu* węzłów chłonnych poświęcało uwagę w badaniach wielu autorów, cytowanych poprzednio [20,52,65,70,71,86-90]. W szczególności ostatnia praca badawcza czeskich autorów zasługuje na szersze omówienie i porównanie, a chińskich i francuskich dobrze demonstrują różnice w podejściu do realizacji koncepcji *SLN*. Zespół pod kierunkiem prof. Cibuli „ostrożnie” wyselekcjonował (*carefully selected*) 17 pacjentek z RSZM w stopniu zaawansowania IB1 (≥ 3 cm, 8 chorych), IB2 (7 chorych), IIB (2 chorych) wg klasyfikacji *FIGO* z obustronną identyfikacją *SLN* za pomocą techniki skojarzonej (podanie Tc^{99m} i niebieskiego barwnika) [90]. Na uwagę zasługuje fakt, że usunięto średnio 2,5 *SLN* na pacjentkę, a więc tyle, co w materiale niniejszej pracy doktorskiej (przy odsetku obustronnej detekcji wynoszącym 36%). W pracy doktorskiej uzyskano zbliżone wyniki z tym, że stwierdzono trzy przypadki fałszywie ujemne po stronie zidentyfikowanego *SLN*, wliczając *ITC* (czułość wyniosła 66,7%, a swoistość 86,2%, badając realizację procedury na stronę). W drugim przypadku w materiale pracy doktorskiej stwierdzono obecność *ITC* w *nSLN* przy ujemnym *SLN*. Biorąc pod uwagę fakt, że w związku z pośrodkowym położeniem szyjki macicy możliwość uzyskania fałszywego wyniku oceny zmiany w *SLN* należy rozpatrywać na stronę miednicy oraz, że według obecnej wiedzy *ITC* nie należy traktować jako przerzut, odsetek rzeczywistych wyników fałszywie ujemnych w pracy doktorskiej wynosi 3,7% (1/27). Cibula i wsp. użyli bardzo ścisłych kryteriów selekcji pacjentek („duże” guzy - „*bulky tumors*”, o wysokim ryzyku przerzutów), dlatego łatwo uzyskali dużą precyzję diagnostyczną na mniejszej grupie chorych (17), u których udało się uzyskać obustronną detekcję *SLN*. Względnie niską czułość testu w pracy doktorskiej należy tłumaczyć wysoką liczbą (3) przypadków fałszywie ujemnych na stronę, biorąc pod uwagę każdą zmianę w węzłach chłonnych.

Istnieje tylko jedna publikacja o liczbie chorych znacznie przewyższającej wszystkie inne [87]. Fregnani i wsp. przeprowadzili bardzo obszerne badanie na 289 pacjentkach z RSZM w stadiach IB-IIA wg klasyfikacji *FIGO* (5599 węzłów chłonnych – 19,3 węzłów na pacjentkę), nie badali jednak kwestii zależności statusu *nSLN* od stanu *SLN* (nie identyfikowali *SLN*), oceniali również tylko jeden skrawek na węzeł chłonny. Brazylijscy naukowcy skupili się na znaczeniu rokowniczym tzw. choroby mikroprzerzutowej w węzłach chłonnych.

W badaniach na podobnej pod względem liczebności grupach chorych i podobnym celu jak w niniejszej pracy doktorskiej, osiągnano odmienne wyniki, stosując różne techniki oceny węzłów chłonnych. W badaniu autorów z ośrodka naukowego w Chinach, obejmującym 30 pacjentek, Lou i wsp. wykazali odsetek wyników fałszywie ujemnych wynoszący 18,2%, używając techniki RT-PCR [65]. Badanie budzi zastrzeżenia metodologiczne, gdyż na każdą pacjentkę jeden *SLN* był pobierany przypadkowo spośród powiększonych węzłów chłonnych (za takie uznawano *SLNs*), podobnie usuwano jeden lub więcej spośród *nSLNs*.

Martinez i wsp. zbadali 41 pacjentek z RSZM w stopniu IA2-IB wg klasyfikacji *FIGO* (36/41 przypadków IB1) przede wszystkim pod kątem zgodności pomiędzy obrazem SPECT/CT a śródoperacyjną lokalizacją *SLN*, stosując uzupełnienie procedury radiologicznej o barwienie błękitem patentowym [71]. Technika podwójna pozwoliła na wykrycie obustronnych *SLNs* w 80,5% przypadków. Badacze z ośrodka hiszpańskiego wykazali, że SPECT/CT nie ma przewagi nad badaniem z udziałem barwnika w identyfikacji co najmniej jednego *SLN* (barwnik – 100% przypadków detekcji, SPECT – 95%), podkreślając jednak rolę krzywej uczenia się procedury radiologicznego wykrywania *SLN* [71].

Marchiole i wsp. zbadali proporcjonalną do materiału prezentowanej pracy doktorskiej liczbę węzłów chłonnych (574) u podobnej liczby 29 chorych na RSZM IA1(LVSI+) - IB1 wg klasyfikacji *FIGO*, używając w większości przypadków (27/29) metody pojedynczego znakowania metodą barwnikową. Stwierdzili, że odsetek wyników fałszywie ujemnych jest zbyt duży (13%), aby uznać procedurę *SLND* za bezpieczną [89]. Należy jednak zwrócić uwagę, że cytowani francuscy autorzy należą do pionierów techniki *SLND* w raku szyjki macicy i było to wczesne badanie (2004 r.) [89].

Obawy co do zasadności koncepcji *SLN* podzielali w różnym czasie również inni autorzy w przypadku średnio-zaawansowanego i zaawansowanego RSZM, optując za pełnym usunięciem węzłów chłonnych miednicznych i przyaortalnych [104, 105, 110, 111]. W pracy Silva i wsp. stwierdzono, że w samych tylko *SLNs* zbadanych metodą IHC można znaleźć ponad 5% *MICs* w H-E-negatywnych węzłach chłonnych [110]. W całej grupie regionalnych węzłów chłonnych częstość stwierdzania *MICs* we wczesnym RSZM wynosi ok. 2,1%-15%, ale zależy to od użytej metody (badanie standardowe lub *ultrastaging*) oraz lokalizacji anatomicznej badanych węzłów chłonnych [22, 52, 65, 70, 71, 86-90]. Zaal i wsp., po zbadaniu 645 chorych na RSZM w stadiach IA-IIB, zauważyli korzyść rokowniczą w odniesieniu do przeżyć całkowitych i wolnych od wznowy po usunięciu więcej niż 16 *nSLN* tylko w przypadku raków w stadiach IB2 – II wg klasyfikacji *FIGO* [92]. Nie wiadomo na podstawie

innych badań, czy to samo dotyczy mniejszego zaawansowania raka. W materiale prezentowanej pracy doktorskiej chorym usunięto 66 *SLNs* i 450 *nSLN*, średnio ok. 2,5 i 16,6 węzłów chłonnych na pacjentkę, a odsetek węzłów chłonnych ze zmianami (*MAC*, *MIC*, *ITC*) wynosił 10,8%. Jest to zgodne z wynikami badań w literaturze. Nie analizowano przeżyć pacjentek po zastosowanym leczeniu, ale można sądzić, że u tych chorych, które miały więcej niż 16 usuniętych *nSLN*, określony status węzłów chłonnych będzie wiarygodny.

W badaniu Sakuragi i wsp., przeprowadzonym u chorych w stadiach IB1-IB2 wg klasyfikacji *FIGO*, częstość przerzutów do węzłów chłonnych miednicy wyniosła 11,5%, a 2,1% chorych doświadczyło przerzutów w węzłach chłonnych przyaortalnych [112]. Podobny wynik procentowy uzyskali jednak Zand i wsp. w grupie RSZM IB2-IV wg *FIGO*, również badając węzły chłonne w *ultrastagingu* [113]. Martínez i wsp., analizując 24 chore na zaawansowanego RSZM, zbadał w *ultrastagingu* 581 przyaortalnych węzłów chłonnych ujemnych po badaniu rutynowym w HE i stwierdził obecność *MICs* tylko w dwóch węzłach chłonnych (0,34%) u dwóch chorych (8,3%) [114]. W niniejszej pracy doktorskiej, obejmującej 516 węzłów chłonnych u 27 chorych na RSZM w stadiach IA2-IB1 wg klasyfikacji *FIGO* (IB1 stanowiło 96,3% przypadków) wykryto 22 węzły chłonne z *MICs*, przy czym *SLN* zawierających *MIC* było 7, a *nSLN* – 15. W jednym przypadku doszło do zmiany stanu zaawansowania pod względem cechy N (z N0 do N1). W innym przypadku (jednym z 4 przypadków z usuwanymi węzłami chłonnymi przyaortalnymi stwierdzono niewybarwiony węzeł chłonny z *MIC* (przerzut odległy), co jest wynikiem bardzo istotnym, ponieważ fakt ten zmienia stadium zaawansowania raka (cecha M1). Był to przerzut wielkości 2mm niewidoczny w pierwotnym badaniu HE. Dopiero po powtórnym badaniu preparatu w IHC doszło do jego wykrycia. Przypadek ten dotyczył pacjentki z drugim największym guzem nowotworowym, zmierzonym pooperacyjnie (pT=4,2 cm). Ta pacjentka miała ostatecznie 6 dodatnich węzłów chłonnych, a guz naciekał na głębokość 19 mm bez cechy *LVI*.

Dwa przypadki pT1b2 (pT=4,2 cm i pT=5,6 cm) pokazują z jednej strony niedostatki klasyfikacji ginekologiczno-chirurgicznej, a z drugiej sugerują, że wykonywanie procedury *SLND* z ewentualnym nastawieniem na podejmowanie decyzji śród/pooperacyjnych powinno się kategorycznie ograniczać do guzów, co do których nie ma żadnych wątpliwości, że są małe (znacznie poniżej 4 cm, najlepiej zgodnie z wielokrotnie cytowanym piśmiennictwem ≤ 2 cm). Analizując poszczególne przypadki stwierdzono, że wśród 11 przypadków aż w 7 stwierdzono guz większy niż 2 cm.

„Entuzjaści” koncepcji *SLN* tacy jak Du i wsp. skłonni są zalecać leczenie oszczędzające płodność (radykalną trachelektomię) przy ujemnych *SLNs* stwierdzonych po badaniu śródoperacyjnym, zwłaszcza u chorych planujących ciążę [115]. Badając 68 chorych na RSZM w stadiach IA2-IB1 wg klasyfikacji *FIGO* Du i wsp. uzyskali wysoki odsetek detekcji *SLN* (94,1%), a u 8 chorych zaobserwowali dodatnie *SLNs*. U tych chorych wykonali rozszerzone usunięcie macicy, u pozostałych radykalną trachelektomię i tylko *SLND*. W badanej przez Du i wsp. grupie 53% (8/15) chorych zaszło w ciążę, u 2 wystąpiła wznowa choroby (po 8 i 17 miesiącach, w pierwszym przypadku w miednicznych węzłach chłonnych, w drugim – w przyaortalnych węzłach

chłonnych), a jedna osoba zmarła [115]. Inni badacze, jak Slama i wsp., nie zalecają, aby opierać się na badaniu śródoperacyjnym węzłów chłonnych, gdyż mogą one dawać fałszywie ujemne wyniki nawet w 56,2% przypadków, co implikuje dalsze błędne decyzje lecznicze [116]. Badanie węzłów chłonnych śródoperacyjnie w *ultrastagingu* mogłoby definitywnie określić status węzłów chłonnych, ale metodologia badania ogranicza jego użyteczność, gdyż jest ono czasochłonne.

Dodatkowym czynnikiem, o którym należałoby wspomnieć, jest konizacja szyjki macicy. W pracy doktorskiej jeden przypadek fałszywie ujemny wystąpił u pacjentki po konizacji. W kilku badaniach wzięto również pod uwagę ten zabieg jako czynnik mogący wpływać na jakość procedury detekcji *SLN*. Nie wykazano, aby konizacja miała niekorzystny wpływ na odsetek detekcji *SLN* [117-121]. W pracy Kato i wsp. na 50 chorych na RSZM w stadiach *FIGO* IA2-IB1 (IA1 tylko jeden przypadek; wszystkie przypadki <2 cm) stwierdzono, że *SLNs* w lokalizacji biodrowej zewnętrznej były znajdowane rzadziej w grupie kobiet niepoddanych wcześniej konizacji (2,7%) niż w grupie kobiet poddanych konizacji (9,5%). Wiele cytowanych poprzednio badań wskazywało na to, że obok węzłów chłonnych zasłonowych, są to węzły chłonne najczęściej zajmowane przez nowotwór, ale w cytowanej pracy różnice w dystrybucji nie miały jednak znaczenia predykcyjnego [119]. Seong i wsp. w badaniu obejmującym 89 chorych na RSZM w stadiach IA2 – IIB wg klasyfikacji *FIGO* podają, że konizacja wywiera nawet korzystny efekt (odsetek detekcji *SLN* 73,3% w grupie kobiet poddanych konizacji vs. 49,1% bez wcześniejszej konizacji) [119]. Wuntakal i wsp. analizując wpływ różnych czynników na jednostronność a nie dwustronność identyfikacji *SLN*, zbadali 132 chore na RSZM w stadiach *FIGO* IA1 (*LVS1+*) – IIA i podobnie jak inni autorzy nie znaleźli ujemnego efektu konizacji na jakość przeprowadzonej procedury *SLND* [120]. Andikyan i wsp. przeprowadzili badanie na jedynie 10 chorych (lata 2005 – 2012; 7 chorych z RSZM w stadium *FIGO* IA1 z *LVS1+*, 3 z RSZM IB1 wg klasyfikacji *FIGO*). Jego celem było określenie możliwości przeprowadzenia konizacji szyjki macicy z identyfikacją *SLN* jako strategii oszczędzającej płodność u chorych na RSZM w I stopniu zaawansowania klinicznego wg *FIGO* oraz ocena minimalnego wystarczającego marginesu chirurgicznego. U wszystkich chorych wykonali powtórny konizację, uzyskując obustronność wykrycia *SLN* po obu stronach miednicy we wszystkich przypadkach. Największy wymiar nacieku raka w żadnym przypadku nie był większy niż 11 mm, a największa głębokość naciekania nie przekroczyła 6 mm [121].

W żadnej z cytowanych publikacji nie podano zastosowanego odstępu czasowego pomiędzy konizacją a właściwą procedurą leczniczą. W kontekście analizowania statusu *nSLN* wcale nie analizowano tego zagadnienia. W materiale niniejszej pracy doktorskiej było 10 (37%) przypadków konizacji (8) i amputacji szyjki macicy (2), z których dwa przypadki po konizacji znalazły się w grupie ze „zdarzeniami” w węzłach chłonnych. W obu tych przypadkach wybarwienie było tylko jednostronne. Należy wspomnieć, że w jednym z tych przypadków nie doszło do identyfikacji *SLN* po prawej stronie miednicy, a po usunięciu regionalnych węzłów chłonnych stwierdzono makroprzerzut raka w jednym z *nSLNs* (węzeł chłonny zasłonowy prawy). Podanie znacznika opisano jako „utrudnione”. Naciekanie raka

wynosiło w tym przypadku 8 mm. Należy więc przypuszczać, że błędne było podanie znacznika albo proces gojenia utrudnił jego penetrację, choć brak literatury na ten temat. W kilku pracach naukowych pojawiło się stwierdzenie, że młodszy wiek chorych predysponuje do bardziej skutecznego przeprowadzenia procedury *SLND* [118-120]. Wyniki pracy doktorskiej potwierdzają obserwacje zawarte w literaturze. W grupie 27 badanych chorych nie stwierdzono zależności jakości *SLND* wyrażonej jako dwustronność detekcji *SLN* (w porównaniu do jednostronnej detekcji) od przebytej wcześniej konizacji jako zabiegu diagnostycznego, natomiast u kobiet młodszych częściej uzyskiwano obustronność identyfikacji *SLN*.

Efektywność kosztowa metody została wyceniona przez liczbę życia skorygowanych o jakość (*quality-adjusted life-years*, QALY) i absolutnych lat życia (*absolute life-years*, ALY) przez Brar i wsp. [122]. Porównanie dotyczyło 3 strategii limfadenektomii po radykalnym usunięciu macicy: regionalnego usunięcia miednicznych węzłów chłonnych, biopsji *SLN* z użyciem technetu^{99m} i niebieskiego barwnika oraz biopsji *SLN* z użyciem tylko technetu^{99m} w pięcioletnim okresie. Biopsja *SLN* z użyciem Tc^{99m} i niebieskiego barwnika kosztowała 21089 dolarów na pacjentkę, dostarczyła 4.54 QALY, 4.90 ALY i była najbardziej efektywna kosztowo. W niniejszej pracy nie analizowano QALY, ale najbardziej zbliżonym parametrem byłby koszt, jaki należałoby ponieść, aby zyskać istotną poprawę jakości *stagingu*. Należałoby więc wydatkować dodatkowo około 250 dolarów na pacjentkę x 13.5 przypadków (=3375 USD), aby zyskać 1 zmianę w *stagingu* o znaczeniu rokowniczym (pN lub pM *upstage*).

Ultrastaging z seryjnym skrawaniem materiału tkankowego i barwieniem immunohistochemicznym jest efektywny z punktu widzenia onkologicznego, gdyż pozwala na poprawienie jakości określenia zaawansowania klinicznego choroby, a w niektórych przypadkach również poprawienie precyzji określania rokowania chorej na RSZM [87]. Z drugiej jednak strony takie badanie jest dosyć kosztowne finansowo i czasowo, gdyż średnia cena wszystkich kosztów oznaczeń przypadku liczącego średnio ok. 18 węzłów chłonnych wynosi ok. 1000 złotych, a czas jaki jest wymagany w warunkach polskich do obejrzenia preparatów (po 3-10 skrawków z jednego węzła chłonnego) z wielu węzłów chłonnych to ok. 2-3 godzin. Metoda ta jest trudna w codziennym zastosowaniu i na razie zbyt kosztowna, aby była rutynowo stosowana w diagnostyce histopatologicznej. Powinna być więc zastąpiona tańszymi metodami, najlepiej nieinwazyjnymi, albo być zarezerwowana dla wyselekcjonowanych przypadków lub węzłów chłonnych.

Prawie żadne z liczących się międzynarodowych towarzystw nie podało wytycznych ani zaleceń dotyczących *SLN* w RSZM. Jedynie amerykańska *National Comprehensive Cancer Network* opracowała w zaleceniach optymalne użycie metody i stwierdziła jasno, że „mapowanie” *SLN* jest najskuteczniejsze w guzach mniejszych niż 2 cm [123]. Rekomenduje ona tę metodę, nadając jej status 2B wg *Evidence Based Medicine* (tj. na podstawie konsensusu, że dana interwencja jest właściwa). *National Comprehensive Cancer Network* poświęca całą stronę swoich wytycznych odnośnie postępowania w RSZM kwestii „mapowania” *SLN*, wskazując na potrzebę *ultrastagingu* ujemnych w badaniu HE *SLNs*. Podkreśla jednak, że stanowi to element leczenia chirurgicznego, nie wspominając o badaniu w *ultrastagingu* innych węzłów

chłonnych oprócz *SLN* [123]. Kwestię „wydajności” koncepcji *SLN* wikłają czynniki omówione w pierwszych rozdziałach niniejszej rozprawy, wśród których przypomnieć należy pośrednie położenie szyjki macicy [96], przerzuty skaczące [124] czy istnienie „immunologicznych trupów” węzłów chłonnych, które mogą zmieniać przewidywane szlaki przerzutowania, ale również fakt, że podobnie jak w raku piersi, już niewielki guz posiada potencjał do pozostawiania krążących komórek nowotworowych we krwi [125]. Nie wiadomo przy jakiej wielkości guza dzieje się tak w RSZM.

Przerzuty do węzłów chłonnych stanowią ważny czynnik rokowniczy. Wśród czynników, które wpływają na tę cechę, wymienia się najczęściej wielkość guza, głębokość naciekania, stopień złośliwości histologicznej (*grade*) oraz naciekanie przestrzeni okołonaczyniowej (*LVI*). W pracy doktorskiej stwierdzono, że do czynników ryzyka przerzutów do węzłów chłonnych RSZM w stopniu IB1 wg klasyfikacji *FIGO* (w mniejszym stopniu IA2) należą *LVI*, następnie wielkość guza i idąca za tym głębokość naciekania, natomiast nie mają wartości pozostałe czynniki. Nie stwierdzono także zależności pomiędzy przerzutami nowotworowymi w węzłach chłonnych a typem histologicznym nowotworu. Nie analizowano *stagingu* i naciekania przymacicz, gdyż materiał pracy doktorskiej prawie wyłącznie zawierał przypadki w stadiach IB1 wg klasyfikacji *FIGO*. Przy zajętych przymaciczach częstość przerzutów w węzłach chłonnych może być znacząco wyższa niż jest to odnotowane w niniejszej pracy i może sięgać 36% w grupie chorych w stadiach IB1-IIA wg klasyfikacji *FIGO* [126]. U 31% chorych w cytowanym badaniu w stadium IB1 (*FIGO*) znaleziono subkliniczne przerzuty nowotworu w przymaciczach, co może sugerować, że w najbliższych węzłach chłonnych także mogą znajdować się przerzuty. Należy dodać uwagę, że w materiale pracy doktorskiej znalazł się jeden wykryty węzeł chłonny przymacicza zawierający *ITC* (nieistotny w klasyfikacji). Został on usunięty razem z innymi węzłami chłonnymi w trakcie histerektomii.

Rak szyjki macicy jest jedynym ginekologicznym nowotworem złośliwym, którego klasyfikacja do stadiów zaawansowania wg klasyfikacji *FIGO* odbywa się za pomocą badania fizykalnego, RTG klatki piersiowej, urografii, cystoskopii, rektoskopii [109,127]. W krajach o wyższym dochodzie narodowym, w których finansowanie opieki zdrowotnej jest na wysokim poziomie ekonomicznym, zalecaną opcją są badania obrazujące, takie jak TK i RM. Klasyfikacja RSZM odbywa się zgodnie z powszechnie przyjętą skalą kliniczną *FIGO* lub kliniczno-patologiczną *TNM*. W związku z dużym odsetkiem wyników fałszywie dodatnich i ujemnych w badaniach obrazujących oraz z powodu niepełnej dostępności tych badań na świecie, *WHO* oraz *FIGO* nie zgodziły się do tej pory na zalecenie obligatoryjnego ich wykonywania w celu określenia *stagingu*. Z drugiej strony wykazano, że przerzuty do węzłów chłonnych są najważniejszym czynnikiem rokowniczym i predykcyjnym u chorych z RSZM. Skala kliniczno-patologiczna *TNM* (c lub p *TNM*) pozwala na dokładne określenie *stagingu*, ale nie istnieją obecnie łatwo dostępne i nieomyłne metody wykrywania przerzutów w węzłach chłonnych na etapie planowania leczenia. Punktem wyjścia do osiągnięcia tego celu jest jednak określenie, u których chorych jest większe prawdopodobieństwo wystąpienia przerzutów nowotworowych, a u których jest ono na tyle małe, że oprócz

resekcji raka należy tylko sprawdzić, czy regionalne węzły chłonne są (najprawdopodobniej) niezmiennione, tak jak to by wynikało z przedoperacyjnych badań.

Mimo tego, że zainteresowanie *SLN* w RSZM nie jest nowe, stosunkowo niewiele prac naukowych poświęcono *nSLN*. Koncentrowano się na zebraniu jak największych grup chorych i badaniu w *ultrastagingu* tylko *SLNs*, a nie *nSLN*. W pracy doktorskiej badania *ultrastagingu* były przeprowadzane sukcesywnie na kolejnych zakwalifikowanych pacjentkach we wszystkich węzłach chłonnych, a uzyskiwana wiedza stopniowo wzbogacała merytorycznie pracę doktorską, dając nowe informacje do analiz. Ponadto autor postarał się poświęcić uwagę wielu różnym zagadnieniom, przedstawiając temat *SLN* i *nSLN* w przekrojowy sposób. Postawił on hipotezy negatywne, nie faworyzując użycia koncepcji *SLN* nad elektywnym usunięciem regionalnych węzłów chłonnych, co wskazuje na próbę obiektywnego podejścia i wyciągania niezależnych, krytycznych wniosków.

9. Wnioski

1. Mikroprzerzuty w układzie limfatycznym w raku szyjki macicy są najczęściej zlokalizowane w węzłach chłonnych wartowniczych (9,1%), rzadziej w pozawartowniczych (3,6%). Ich wykrycie jest możliwe poprzez rozszerzenie badania histologicznego o metodę cienkich skrawków. Czynnikiem zwiększającym ryzyko mikroprzerzutów do węzłów chłonnych pozawartowniczych są: wielkość guza >2cm oraz naciekanie przestrzeni okołonaczyniowej limfatycznej.
2. Stan węzła chłonnego wartowniczego determinuje stan pozostałych węzłów chłonnych pod warunkiem obustronnej identyfikacji. W przypadku braku wykrycia *SLN* nie można wiarygodnie wnioskować o stanie węzłów chłonnych po tej stronie, gdyż występuje wówczas ryzyko uzyskania fałszywego wyniku diagnostycznego i niedoszacowania stadium zaawansowania. Najlepszymi kandydatkami do zastosowania procedury identyfikacji węzła chłonnego wartowniczego w raku szyjki macicy są chore ze zmianą pierwotną do 2 cm bez zajęcia przez komórki raka okołonaczyniowej przestrzeni.
3. Rozszerzenie badania preparatów węzłów chłonnych o ich ultracienkie skrawanie i techniki immunohistochemiczne według określonego protokołu umożliwia uzyskanie informacji o rzeczywistym zaawansowaniu klinicznym w przypadku raka szyjki macicy w stadium IA2-IB1 wg klasyfikacji *FIGO*.

10. Podziękowania

Autor dziękuje Gdańskiemu Uniwersytetowi Medycznemu za udzielenie pomocy finansowej w ramach pracy statutowej ST02-0074/07.

Podziękowania należą się Panu Doktorowi Szymonowi Wojtylakowi z Katedry i Zakładu Patomorfologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego za wiele godzin konsultacji cienkich skrawków preparatów histopatologicznych.

11. Piśmiennictwo

- [1] Bray F, Jemal A, Grey N, Ferlay J, Forman D. *Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study. Lancet Oncol* 2012; 13: 790-801.
- [2] Raporty na podstawie danych Centrum Onkologii: Krajowy Rejestr Nowotworów; Pozyskano z: onkologia.org.pl; Dostęp: 05.04.2017r.
- [3] Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H. *A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. EMBO J* 1984; 3: 1151-1157.
- [4] Brinton LA, Herrero R, Reeves WC, de Britton RC, Gaitan E, Tenorio F. *Risk factors for cervical cancer by histology. Gynecol Oncol* 1993; 51: 301-306.
- [5] Forhan SE, Gottlieb SL, Sternberg MR, Xu F, Datta SD, McQuillan GM, Berman SM, Markowitz LE. *Prevalence of sexually transmitted infections among female adolescents aged 14 to 19 in the United States. Pediatrics* 2009; 124: 1505-1512.
- [6] De Martel C, Ferlay J, Franceschi S, Vignat J, Bray F, Forman D, Plummer M. *Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. Lancet Oncol* 2012; 13: 607-615.
- [7] Forman D, de Martel C, Lacey CJ, Soerjomataram I, Lortet-Tieulent J, Bruni L, Vignat J, Ferlay J, Bray F, Plummer M, Franceschi S. *Global burden of human papillomavirus and related diseases. Vaccine* 2012; 30 Suppl 5: F12-23.
- [8] Tong SY, Lee YS, Park JS, Namkoong SE. *Human papillomavirus genotype as a prognostic factor in carcinoma of the uterine cervix. Int J Gynecol Cancer* 2007; 17: 1307-1313.
- [9] Pozyskano z: www.seer.cancer.gov/statfacts; Dostęp: 05.04.2017r.
- [10] Insinga RP, Liaw KL, Johnson LG, Madeleine MM. *A systematic review of the prevalence and attribution of human papillomavirus types among cervical, vaginal, and vulvar precancers and cancers in the United States. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17: 1611-1622.
- [11] Van Trappen PO, Pepper MS. *Lymphatic dissemination of tumour cells and the formation of micrometastases. Lancet Oncol* 2002; 3: 44-52.
- [12] Bień S. Historia badań nad układem chłonnym. W: Jeziorski A (red.). Biblioteka Chirurga Onkologa. Tom 1. Węzeł chłonny wartowniczy. Wyd. Via Medica, Gdańsk 2014; s. 3-7.
- [13] Braithwaite L.R. *The flow of lymph from the ileocaecal angle and its possible bearing on the cause of duodenal and gastric ulcer. Br J Surg* 1923; 11: 7-26.
- [14] Gould EA, Winship T, Philbin PH, Kerr HH. *Observations on a „sentinel node“ in cancer of the parotid. Cancer* 1960; 13: 77-78.
- [15] Cabañas RM. *An approach for the treatment of penile carcinoma. Cancer* 1977; 39: 456-466.
- [16] Krag DN, Weaver DL, Alex JC, Fairbank JT. *Surgical resection and radiolocalization of the sentinel lymph node in breast cancer using a gamma probe. Surg Oncol* 1993; 2: 335-339.
- [17] Morton DL, Wen DR, Wong JH, Economou JS, Cagle LA, Storm FK, Foshag LJ, Cochran AJ. *Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. Arch Surg* 1992; 127: 392-399.
- [18] Turner RR, Ollila DW, Krasne DL, Giuliano AE. *Histopathologic validation of the sentinel lymph node hypothesis for breast carcinoma. Ann Surg* 1997; 226: 271-278.
- [19] Wydra D, Sawicki S, Emerich J, Romanowicz G. *Evaluation of sentinel node detection in vulvar cancer. Nucl Med Rev Cent East Eur* 2005; 8: 128-130.
- [20] Barranger E, Grahek D, Cortez A, Talbot JN, Uzan S, Daraï E. *Laparoscopic sentinel lymph node procedure using a combination of patent blue and radioisotope in women with cervical carcinoma. Cancer* 2003; 97: 3003-3009.
- [21] Bats AS, Clement D, Larousserie F, Lefrere-Belda MA, Faraggi M, Froissart M, Lecuru F. *Sentinel lymph node biopsy improves staging in early cervical cancer. Gynecol Oncol* 2007; 189-193.
- [22] Sawicki S, Kobierski J, Cytawa W, Wydra D. *Sentinel lymph node detection with the use of SPECT-CT in endometrial cancer - analysis of two cases. Ginekol Pol* 2012; 83: 703-707.
- [23] Joosten JJ, Strobbe LJ, Wauters CA, Pruszczynski M, Wobbes T, Ruers TJ. *Intraoperative lymphatic mapping and the sentinel node concept in colorectal carcinoma. Br J Surg* 1999; 86: 482-486.
- [24] Ichikura T, Morita D, Uchida T, Okura E, Majima T, Ogawa T, Mochizuki H. *Sentinel node concept in gastric carcinoma. World J Surg* 2002; 26: 318-322.

- [25] Veronesi U, Paganelli G, Galimberti V, Viale G, Zurrada S, Bedoni M, Costa A, de Cicco C, Geraghty JG, Luini A, Sacchini V, Veronesi P. *Sentinel-node biopsy to avoid axillary dissection in breast cancer with clinically negative lymph-nodes. Lancet* 1997; 349(9069): 1864-1867.
- [26] Neumayer L, Meterissian S, McMasters K; Evidence Based Reviews in Surgery Group. *Canadian Association of General Surgeons and American College of Surgeons Evidence Based Reviews in Surgery. 23. ASCO recommended guidelines for sentinel lymph node biopsy for early-stage breast cancer. Evidence-based medicine. A new approach to teaching the practice of medicine. Can J Surg* 2007; 50: 482-484.
- [27] Mansel RE, Fallowfield L, Kissin M, Goyal A, Newcombe RG, Dixon JM, Yiangou C, Horgan K, Bundred N, Monypenny I, England D, Sibbering M, Abdullah TI, Barr L, Chetty U, Sinnott DH, Fleissig A, Clarke D, Ell PJ. *Randomized multicenter trial of sentinel node biopsy versus standard axillary treatment in operable breast cancer: the ALMANAC Trial. J Natl Cancer Inst* 2006; 98: 599-609.
- [28] Schilling C, Stoeckli SJ, Haerle SK, i wsp. *Sentinel European Node Trial (SENT): 3-year results of sentinel node biopsy in oral cancer. Eur J Cancer* 2015; 51: 2777-2784.
- [29] Jimenez-Heffernan A, Ellmann A, Sado H, Huić D, Bal C, Parameswaran R, Giammarile F, Pruzzo R, Kostadinova I, Vorster M, Almeida P, Santiago J, Gambhir S, Sergieva S, Calderon A, Young GO, Valdes-Olmos R, Zaknun J, Magboo VP, Pascual TN. *Results of a prospective multicenter international Atomic Energy Agency sentinel node trial on the value of SPECT/CT over planar imaging in various malignancies. J Nucl Med* 2015; 56: 1338-1344.
- [30] Lee SK, Lee JH, Bae SY, Kim J, Kim M, Lee HC, Jung YY, Kil WH, Kim SW, Lee JE, Nam SJ, Choe JH, Kim JH, Kim JS. *Lateral neck sentinel lymph node biopsy in papillary thyroid carcinoma, is it really necessary? A randomized, controlled study. Surgery* 2015; 157: 518-525.
- [31] Shersher DD, Liptay MJ. *Status of sentinel lymph node mapping in non-small cell lung cancer. Cancer J* 2015; 21: 17-20.
- [32] Nagaraja V, Eslick GD, Cox MR. *Sentinel lymph node in oesophageal cancer-a systematic review and meta-analysis. J Gastrointest Oncol* 2014; 5: 127-141.
- [33] Huynh KT, Bilchik AJ. *Sentinel lymph node biopsy and nodal ultrastaging in colorectal cancer. Cancer J* 2015; 21: 11-16.
- [34] Van Trappen PO, Gyselman VG, Lowe DG, Ryan A, Oram DH, Bosze P, Weekes AR, Shepherd JH, Dorudi S, Bustin SA, Jacobs IJ. *Molecular quantification and mapping of lymph-node micrometastases in cervical cancer. Lancet* 2001; 9249:15-20.
- [35] Dargent D, Martin X, Roy M, Mathevet P. *Identification of a sentinel node with laparoscopy in cervical cancer. Proc SGO Meeting* 2000; abstract 44: 128.
- [36] Pluta M, Rob L, Charvat M, Chmel R, Halaska M Jr, Skapa P, Robova H. *Less radical surgery than radical hysterectomy in early stage cervical cancer: a pilot study. Gynecol Oncol* 2009; 113: 181-184.
- [37] Demkow T. *Badanie węzła wartowniczego w nowotworach narządów układu moczowo-płciowego. W: „Biblioteka chirurga onkologa”. T1: „Węzeł chłonny wartowniczy”. Wyd. Via Medica, Gdańsk 2014; s.147.*
- [38] Rogers LJ, Luesley DM. *Stage IA2 cervical carcinoma: how much treatment is enough? Int J Gynecol Cancer* 2009; 19: 1620-1624.
- [39] Daraï E, Rouzier R, Ballester M, Barranger E, Coutant C. *Sentinel lymph node biopsy in gynaecological cancers: the importance of micrometastases in cervical cancer. Surg Oncol* 2008; 17: 227-235.
- [40] Bats A, Mathevet P, Buenerd A, Orliaguet I, Mery E, Zerdoud S, Le Frère-Belda MA, Froissart M, Querleu D, Martínez A, Leblanc E, Morice P, Daraï E, Marret H, Gillaizeau F, Lécuru F. *The sentinel node technique detects unexpected drainage pathways and allows nodal ultrastaging in early cervical cancer: insights from the multicenter prospective SENTICOL study. Ann Surg Oncol* 2013; 20: 413-422.
- [41] Cibua D, Abu-Rustum NR, Dusek L, Slama J, Zikán M, Zaal A, Sevcik L, Kenter G, Querleu D, Jach R, Bats AS, Dyduch G, Graf P, Klat J, Meijer CJ, Mery E, Verheijen R, Zweemer RP. *Bilateral ultrastaging of sentinel lymph node in cervical cancer: Lowering the false-negative rate and improving the detection of micrometastases. Gynecol Oncol* 2012; 127: 462-466.
- [42] Slama J, Dundr P, Dusek L, Fischerova D, Pinkavova I, Zikan M, Vrzackova P, Kojanova M, Cibula D. *Sentinel lymph node status in patients with locally advanced cervical cancers and impact on neoadjuvant chemotherapy. Gynecol Oncol* 2012; 125: 303-306.

- [43] Tax C, Rovers MM, de Graaf C, Zusterzeel PL, Bekkers RL. *The sentinel node procedure in early stage cervical cancer, taking the next step; a diagnostic review. Gynecol Oncol* 2015;139: 559-567.
- [44] Psychogios G, Mantsopoulos K, Bohr C, Koch M, Zenk J, Iro H. *Incidence of occult cervical metastasis in head and neck carcinomas: development over time. J Surg Oncol* 2013; 107: 384-387.
- [45] Wierzbicka M, Mielcarek-Kuchta D. „Węzeł wartowniczy w kontrolowanych badaniach”. W: Jeziorski (red.), „Biblioteka Chirurga Onkologa”, Via Medica, Gdańsk 2014; s. 97.
- [46] Wydra D, Sawicki S, Wojtylak S, Bandurski T, Emerich J. *Sentinel node identification in cervical cancer patients undergoing transperitoneal radical hysterectomy: a study of 100 cases. Int J Gynecol Cancer* 2006; 16: 649-654.
- [47] Radziszewski J, Kowalewska M, Jędrzejczak T, Kozłowicz-Gudzinska I, Nasierowska-Guttmejer A, Bidziński M, Siedlecki JA. *The accuracy of the sentinel lymph node concept in early stage squamous cell vulvar carcinoma. Gynecol Oncol* 2010; 116: 473-477.
- [48] Altgassen C, Hertel H, Brandstädt A, Köhler C, Dürst M, Schneider A; AGO Study Group. *Multicenter validation study of the sentinel lymph node concept in cervical cancer: AGO Study Group. J Clin Oncol* 2008; 26: 2943-2951.
- [49] Devaja O, Mehra G, Coutts M, Montalto SA, Donaldson J, Kodampur M, Papadopoulos AJ. *A prospective single-center study of sentinel lymph node detection in cervical carcinoma: is there a place in clinical practice? Int J Gynecol Cancer* 2012; 22: 1044-1049.
- [50] Kato H, Todo Y, Suzuki Y, Ohba Y, Minobe S, Okamoto K, Yamashiro K, Sakuragi N. *Re-consideration of lymphadenectomy for stage Ib1 cervical cancer. J Obstet Gynaecol Res* 2012; 38: 420-426.
- [51] Śniadecki M, Sawicki S, Wojtylak S, Liro M, Wydra D. *Kliniczne znaczenie mikroprzerzutów w węzłach chłonnych w raku szyjki macicy. Ginekol Pol* 2013; 84: 788-793.
- [52] Śniadecki M, Sawicki S, Wojtylak S, Liro M, Wydra D. *Clinical feasibility and diagnostic accuracy of detecting micrometastatic lymph node disease in sentinel and non-sentinel lymph nodes in cervical cancer: outcomes and implications. Ginekol Pol* 2014; 85:10-13.
- [53] Schwartz GF, Giuliano AE, Veronesi U. *Proceedings of the consensus conference on the role of sentinel lymph node biopsy in carcinoma of the breast. April 19-22, 2001. Philadelphia. Pennsylvania. Cancer* 2002; 94: 2542-2551.
- [54] Cibula D, Abu-Rustum N, Dusek L, Zikán M, Zaal A, Sevcik L, Kenter GG, Querleu D, Jach R, Bats AS, Dyduch G, Graf P, Klat J, Lacheta J, Meijer CJ, Mery E, Verheijen R, Zweemer RP. *Prognostic significance of low volume sentinel lymph node disease in early-stage cervical cancer. Gynecol Oncol* 2012; 124: 496-501.
- [55] Horn L, Hentschel B, Fischer U, Peter D, Bilek K. *Detection of micrometastasis in pelvic lymph nodes in patients with carcinoma of the cervix uteri using step sectioning: frequency, topographic distribution and prognostic impact. Gynecol Oncol* 2008; 111: 276-281.
- [56] Pal A, Provenzano E, Duffy S, Pinder SE, Purushotham AD. *A model for predicting non-sentinel lymph node metastatic disease when the sentinel lymph node is positive. British J Surg* 2008; 95: 302-309.
- [57] Mittendorf E, Kelly K, Boughey J, i wsp. *Incorporation of sentinel lymph node metastasis size into a nomogram predicting nonsentinel lymph node involvement in breast cancer patients with a positive sentinel lymph node. Ann Surg* 2012; 255: 109-115.
- [58] Gortzak-Uzan L, Jimenez W, Nofech-Mozes S, Ismiil N, Khalifa MA, Dubé V, Rosen B, Murphy J, Laframboise S, Covens A. *Sentinel lymph node biopsy vs. pelvic lymphadenectomy in early stage cervical cancer: is it time to change the gold standard? Gynecol Oncol* 2010; 116: 28-32.
- [59] Janczewski G, Osuch-Wójcikiewicz E (red.). *Rak krtani i gardła dolnego. Alfa-medica press, Bielsko-Biała* 2002.
- [60] Hermanek P, Hutter RVP, Sobin LH, Wittekind C. *Classification of isolated cells and micrometastasis. Cancer* 1999; 86: 2668.
- [61] Van Diest PJ, Peterse HL, Borgstein PJ, Hoekstra O, Meijer CJ. *Pathological investigation of sentinel lymph nodes. Eur J Nucl Med* 1999; 26: S43-S49.
- [62] Treseler P. *Pathologic examination of the sentinel lymph node: what is the best method? Breast J* 2006; 12: S143-S151.
- [63] Slama J, Drazdakova M, Dundr P, Fischerova D, Zikan M, Pinkavova I, Freitag P, Pavlista D, Zima T, Cibula D. *High-risk human papillomavirus DNA in the primary tumor, sentinel and nonsentinel pelvic lymph nodes in patients with early stage cervical cancer: a correlation with histopathology. Int J Gynecol Cancer* 2009; 19: 703-707.

- [64] Häfner N, Gajda M, Altgassen C, Hertel H, Greinke C, Hillemanns P, Schneider A, Dürst M. *HPV16-E6 mRNA is superior to cytokeratin 19 mRNA as a molecular marker for the detection of disseminated tumour cells in sentinel lymph nodes of patients with cervical cancer by quantitative reverse-transcription PCR. Int J Cancer* 2007; 120: 1842-1846.
- [65] Lou HM, Zhu T, Shao F, Yang ZY, Fang XH, Feng JG. [Detection of micrometastases and its clinical significance in sentinel and non-sentinel lymph nodes from early cervical carcinoma]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 2013; 35: 434-438.
- [66] Patel V, Martin D, Malhotra R, Marsh CA, Doçi CL, Veenstra TD, Nathan CA, Sinha UK, Singh B, Molinolo AA, Rusling JF, Gutkind JS. *DSG3 as a biomarker for the ultrasensitive detection of occult lymph node metastasis in oral cancer using nanoconstructed immunoarrays. Oral Oncol* 2013; 49: 93-101.
- [67] Yamazaki T, Tomita S, Ichikawa K, Ono Y, Inaba F, Fukasawa I, Imai Y, Imura J, Fukui H, Fujimori T, Inaba N. *P16-immunostaining pattern as a predictive marker of lymph node metastasis and recurrence in early uterine cervical cancer. Pathobiology* 2006; 73: 176-182.
- [68] Huang LW, Lee CC. *P16INK4A overexpression predicts lymph node metastasis in cervical carcinomas. J Clin Pathol* 2012; 65: 117-121.
- [69] Fader AN, Edwards RP, Cost M, Kanbour-Shakir A, Kelley JL, Schwartz B, Sukumvanich P, Comerci J, Sumkin J, Elishaev E, Rohan LC. *Sentinel lymph node biopsy in early-stage cervical cancer: utility of intraoperative versus postoperative assessment. Gynecol Oncol* 2008; 111: 13-7.
- [70] Ogawa S, Kobayashi H, Amada S, Yahata H, Sonoda K, Abe K, Baba S, Sasaki M, Kaku T, Wake N. *Sentinel node detection with (99m)Tc phytate alone is satisfactory for cervical cancer patients undergoing radical hysterectomy and pelvic lymphadenectomy. Int J Clin Oncol* 2010; 15: 52-58.
- [71] Martínez A, Zerdoud S, Mery E, Bouissou E, Ferron G, Querleu D. *Hybrid imaging by SPECT/CT for sentinel lymph node detection in patients with cancer of the uterine cervix. Gynecol Oncol* 2010; 119: 431-435.
- [72] Martínez A, Mery E, Filleron T, Boileau L, Ferron G, Querleu D. *Accuracy of intraoperative pathological examination of SLN in cervical cancer. Gynecol Oncol* 2013; 130: 525-9.
- [73] Lécuru F, Mathevet P, Querleu D, Leblanc E, Morice P, Daraï E, Marret H, Magaud L, Gillaizeau F, Chatellier G, Dargent D. *Bilateral negative sentinel nodes accurately predict absence of lymph node metastasis in early cervical cancer: results of the SENTICOL study. J Clin Oncol* 2011; 29: 1686-1691.
- [74] van de Lande J, Davelaar EM, von Mensdorff-Pouilly S, Water TJ, Berkhof J, van Baal WM, Kenemans P, Verheijen RH. *SCC-Ag, lymph node metastases and sentinel node procedure in early stage squamous cell cervical cancer. Gynecol Oncol* 2009; 112: 119-125.
- [75] Grueneisen J, Schaarschmidt BM, Heubner M, Aktas B, Kinner S, Forsting M, Lauenstein T, Ruhlmann V, Umutlu L. *Integrated PET/MRI for whole-body staging of patients with primary cervical cancer: preliminary results. Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2015; 42: 1814-1824.
- [76] Sironi S, Buda A, Picchio M, Perego F, Moreni R, Pellegrino A, Colombo M, Mangioni C, Messa C, Fazio F. *Lymph node metastasis in patients with clinical early-stage cervical cancer: detection with integrated FDG PET/CT. Radiology* 2006; 238: 272-279.
- [77] Driscoll DO, Halpenny D, Johnston C, Sheehy N, Keogan M. *18F-FDG-PET/CT is of limited value in primary staging of early stage cervical cancer. Abdom Imaging* 2015; 40: 127-133.
- [78] Grueneisen J, Nagarajah J, Buchbender C, Hoffmann O, Schaarschmidt BM, Poeppel T, Forsting M, Quick HH, Umutlu L, Kinner S. *Positron emission tomography/magnetic resonance imaging for local tumor staging in patients with primary breast cancer: a comparison with positron emission tomography/computed tomography and magnetic resonance imaging. Invest Radiol* 2015; 50: 505-13.
- [79] Rob L, Pluta M, Strnad P, Hrehorcak M, Chmel R, Skapa P, Robova H. *A less radical treatment option to the fertility-sparing radical trachelectomy in patients with stage I cervical cancer. Gynecol Oncol* 2008; 111(2 Suppl): S116-20.
- [80] Stelmachów J, Osuch B. Powikłania po rozszerzonym usunięciu macicy. W: Śpiewankiewicz B (red.). Powikłania pooperacyjne w ginekologii, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2009; strony 165-177.
- [81] Bats AS, Buénerd A, Querleu D, Leblanc E, Daraï E, Morice P, Marret H, Gillaizeau F, Mathevet P, Lécuru F; SNTICOL collaborative group. *Diagnostic value of intraoperative examination of sentinel lymph node in early cervical cancer: a prospective, multicenter study. Gynecol Oncol* 2011; 123: 230-5.
- [82] Leidenius M, Krogerus L, Toivonen T, Leppänen E, von Smitten K. *The sensitivity of axillary staging when using sentinel node biopsy in breast cancer. Eur J Surg Oncol* 2003; 29: 849-853.

- [83] Pluta P, Nejc D, Piekarski J, Pasz-Walczak G, Jakubik J, Berner A, Sęk P, Bilski A, Durczyński A, Jeziorski A. *Intraoperative palpation of the axilla as a part of sentinel node biopsy in breast cancer patients. Nowotwory Journal of Oncology* 2008; 58: 147-150.
- [84] Conway WC, Faries MB, Nicholl MB, Terando AM, Glass EC, Sim M, Morton DL. *Age-related lymphatic dysfunction in melanoma patients. Ann Surg Oncol* 2009; 16: 1548-1552.
- [85] Cândido EB, Silva-Filho AL, Triginelli SA, Pedrosa MS, Macarenco R, Porto L, Traiman P. *Histopathological and immunohistochemical (cytokeratins AE1/AE3) study of the parametrium of patients with early stage cervical cancer. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2008; 141: 58-63.
- [86] Okamoto S, Niikura H, Yoshinaga K, Nagase S, Takano T, Ito K, Yaegashi N. *Detection of micrometastases in cervical cancer with a system that evaluates both sentinel and nonsentinel lymph nodes. Int J Gynecol Cancer* 2009; 19: 708-711.
- [87] Fregnani JH, Latorre MR, Novik PR, Lopes A, Soares FA. *Assessment of pelvic lymph node micrometastatic disease in stages IB and IIA of carcinoma of the uterine cervix. Int J Gynecol Cancer* 2006; 16: 1188-1194.
- [88] Popa I, Plante M, Renaud MC, Roy M, Têtu B. *Negative sentinel lymph node accurately predicts negative status of pelvic lymph nodes in uterine cervix carcinoma. Gynecol Oncol* 2006; 103: 649-653.
- [89] Marchiolè P, Buénerd A, Scoazec JY, Dargent D, Mathevet P. *Sentinel lymph node biopsy is not accurate in predicting lymph node status for patients with cervical carcinoma. Cancer* 2004; 100: 2154-2159.
- [90] Tinga DJ, Timmer PR, Bouma J i wsp. *Prognostic significance of single versus multiple lymph node metastases in cervical carcinoma stage IB. Gynecol Oncol* 1990; 39: 175-180.
- [91] Mitani Y, Fujii J, Michitoshi M, Ishizu S, Matakudo M. *Lymph node metastases of carcinoma of the cervix. Am J Obstet Gynecol* 1962; 84: 515-522.
- [92] Zaal A, Zweemer RP, Zikán M, Dusek L, Querleu D, Lécuru F, Bats AS, Jach R, Sevcik L, Graf P, Klát J, Dyduch G, von Mensdorff-Pouilly S, Kenter GG, Verheijen RH, Cibula D. *Pelvic lymphadenectomy improves survival in patients with cervical cancer with low-volume disease in the sentinel node: a retrospective multicenter cohort study. Int J Gynecol Cancer* 2014; 24: 303-311.
- [93] Cibula D, Zikan M, Slama J, Fischerova D, Kocian R, Germanova A, Burgetova A, Dusek L, Dundr P, Gregova M, Nemejcova K. *Risk of micrometastases in non-sentinel pelvic lymph nodes in cervical cancer. Gynecologic Oncology* 2016; 143: 83-86.
- [94] Gasparri ML, Bellati F, Pernice M, Di Donato V, Morano G, Marchetti C, Donfrancesco C, Antonilli M, Benedetti Panici P. *Surgical treatment of an isolated omental cervical cancer recurrence: report of a case and review of the literature. Tumori* 2014; 100: 52-4.
- [95] Bochenek A. Układ naczyń chłonnych. W: Anatomia człowieka. Red. Łasiński W. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL. 2009, 474-479.
- [96] Ercoli A, Delmas V, Iannone V, Fagotti A, Fanfani F, Corrado G, Ferrandina G, Scambia G. *The lymphatic drainage of the uterine cervix in adult fresh cadavers: anatomy and surgical implications. Eur J Surg Oncol* 2010; 36: 298-303.
- [97] Höckel M, Horn LC, Tetsch E, Einkenkel J. *Pattern analysis of regional spread and therapeutic lymph node dissection in cervical cancer based on ontogenetic anatomy. Gynecol Oncol* 2012; 125: 168-174.
- [98] Ouldamer L, Marret H, Acker O, Barillot I, Body G. *Unusual localizations of sentinel lymph nodes in early stage cervical cancer: a review. Surg Oncol* 2012; 21: e153-157.
- [99] Nathanson SD. *Insights into the mechanisms of lymph node metastasis. Cancer* 2003; 98: 413-423.
- [100] Rossi P, Horowitz I, Johnstone P, Jani AB. *Lymphadenectomy for patients with cervical cancer: is it of value? J Surg Oncol* 2009; 100: 404-406.
- [101] Daraï, Lavoué V, Rouzier R, Coutant C, Barranger E, Bats AS. *Contribution of the sentinel node procedure to tailoring the radicality of hysterectomy for cervical cancer. Gynecol Oncol* 2007; 106: 251-256.
- [102] Fagundes H, Perez CA, Grigsby PW, Lockett MA. *Distant metastases after irradiation alone in carcinoma of the uterine cervix. Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1992; 24: 197-204.
- [103] Khunamornpong S, Lekawanvijit S, Settakorn J, Sukpan K, Suprasert P, Siriaunkgul S. *Prognostic model in patients with early-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix: a combination of invasive margin pathological characteristics and lymphovascular space invasion. Asian Pac J Cancer Prev* 2013; 14: 6935-6940.

- [104] Schmid MP, Franckena M, Kirchheiner K, Sturdza A, Georg P, Dörr W, Pötter R. *Distant metastasis in patients with cervical cancer after primary radiotherapy with or without chemotherapy and image guided adaptive brachytherapy*. *Gynecol Oncol* 2014; 133: 256-262.
- [105] van der Vorst JR1, Hutteman M, Gaarenstroom KN, Peters AA, Mieog JS, Schaafsma BE, Kuppen PJ, Frangioni JV, van de Velde CJ, Vahrmeijer AL. *Optimization of near-infrared fluorescent sentinel lymph node mapping in cervical cancer patients*. *Int J Gynecol Cancer* 2011; 21: 1472-1478.
- [106] Cibula D, Oonk MH, Abu-Rustum NR. *Sentinel lymph node biopsy in the management of gynecologic cancer*. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2015; 27: 66-72.
- [107] Madru R, Tran TA, Axelsson J, Ingvar C, Bibic A, Ståhlberg F, Knutsson L, Strand SE. *(68)Ga-labeled superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) for multi-modality PET/MR/Cherenkov luminescence imaging of sentinel lymph nodes*. *Am J Nucl Med Mol Imaging* 2013; 4: 60-69.
- [108] Papadia A, Mohr S, Imboden S, Lanz S, Bolla D, Mueller MD. *Laparoscopic indocyanine green sentinel lymph node mapping in pregnant cervical cancer patients*. *J Minim Invasive Gynecol* 2015; pii: S1553-4650(15)01619-2.
- [109] Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. *TNM Classification of Malignant Tumors. Seventh Edition*. Wyd. pol. pod red. J. Piekarskiego, Via Medica, Gdańsk 2010; ss. 161-165.
- [110] Silva LB, Silva-Filho AL, Traiman P, Triginelli SA, de Lima CF, Siqueira CF, Barroso A, Rossi TM, Pedrosa MS, Miranda D, Melo JR. *Sentinel node detection in cervical cancer with (99m)Tc-phytate*. *Gynecol Oncol* 2005; 97: 588-595.
- [111] Martínez A, Mery E, Ferron G, Querleu D. *Incidence of micrometastases in histologically negative para-aortic lymph nodes in advanced cervical cancer patients*. *Gynecol Oncol* 2010; 119: 76-80.
- [112] Sakuragi N, Satoh C, Takeda N, Hareyama H, Takeda M, Yamamoto R, Fujimoto T, Oikawa M, Fujino T, Fujimoto S. *Incidence and distribution pattern of pelvic and paraaortic lymph node metastasis in patients with Stages IB, IIA, and IIB cervical carcinoma treated with radical hysterectomy*. *Cancer* 1999; 85: 1547-1554.
- [113] Zand B, Euscher ED, Soliman PT, Schmelzer KM, Coleman RL, Frumovitz M, Jhingran A, Ramondetta LM, Ramirez PT. *Rate of para-aortic lymph node micrometastasis in patients with locally advanced cervical cancer*. *Gynecol Oncol* 2010; 119: 422-425.
- [114] Martínez A, Mery E, Ferron G, Querleu D. *Incidence of micrometastases in histologically negative para-aortic lymph nodes in advanced cervical cancer patients*. *Gynecol Oncol* 2010; 119: 76-80.
- [115] Du XL, Sheng XG, Jiang T, Li QS, Yu H, Pan CX, Lu CH, Wang C, Song QQ. *Sentinel lymph node biopsy as guidance for radical trachelectomy in young patients with early stage cervical cancer*. *BMC Cancer* 2011; 2; 11: 157.
- [116] Slama J, Dunder P, Dusek L, Cibula D. *High false negative rate of frozen section examination of sentinel lymph nodes in patients with cervical cancer*. *Gynecologic Oncology* 2013; 129: 384-388.
- [117] Paredes P, Vidal-Sicart S, García S, Pahisa J, Torné A, Ordi J, Fuertes S, Ortega M, Pons F. *Usefulness of the sentinel node in the treatment and staging of initial cervix cancer*. *Rev Esp Med Nucl* 2004; 23: 253-258.
- [118] Kato H, Todo Y, Minobe SI, Suzuki Y, Nakatani M, Ohba Y, Yamashiro K, Okamoto K. *Previous conization on patient eligibility of sentinel lymph node detection for early invasive cervical cancer*. *Int J Gynecol Cancer* 2011; 21: 1491-1494.
- [119] Seong SJ, Park H, Yang KM, Kim TJ, Lim KT, Shim JU, Park CT, Lee KH. *Detection of sentinel lymph nodes in patients with early stage cervical cancer*. *J Korean Med Sci* 2007; 22: 105-109.
- [120] Wuntakal R, Papadopoulos AJ, Montalto SA, Perovic M, Coutts M, Devaja O. *Location of sentinel lymph node in cervical carcinoma and factors associated with unilateral detection*. *Int J Gynecol Cancer* 2015; 25:1663-1668.
- [121] Andikyan V, Khoury-Collado F, Denesopolis J, Park KJ, Hussein YR, Brown CL, Sonoda Y, Chi DS, Barakat RR, Abu-Rustum NR. *Cervical conization and sentinel lymph node mapping in the treatment of stage I cervical cancer: is less enough?* *Int J Gynecol Cancer* 2014: 113-117.
- [122] Brar H, Hogen L, Covens A. *Cost-effectiveness of sentinel node biopsy and pathological ultrastaging in patients with early-stage cervical cancer*. *Cancer* 2017; e-pub ahead of print; doi: 10.1002/cncr.30509.
- [123] NCCN *Cervical cancer guidelines. Version 1.2017*. http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/cervical.pdf; s. 24-25; NCCN.org. Dostęp: 04.03.2017r.
- [124] Li D, Cai J, Kuang Y, Cao J, Wang Z. *Surgical-pathologic risk factors of pelvic lymph node metastasis in stage Ib1-IIb cervical cancer*. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2012; 91: 802-809.

- [125] Abati A, Liotta LA. *Looking forward in diagnostic pathology: the molecular superhighway. Cancer* 1996; 78: 1-3.
- [126] Benedetti-Panici P, Maneschi F, D'Andrea G, Cutillo G, Rabitti C, Congiu M, Coronetta F, Capelli A. *Early cervical carcinoma: the natural history of lymph node involvement redefined on the basis of thorough parametrectomy and giant section study. Cancer* 2000; 88: 2267-2274.
- [127] Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL. *AJCC Cancer Staging Manual (7th Edition). Cervix Uteri*. Springer Verlag, 2010; pp. 395-402.

12. Wykaz tabel, rycin, wykresów i fotografii

Wykaz tabel

Tabela 1. Charakterystyka epidemiologiczna raka szyjki macicy [2,9].	18
Tabela 2. Cechy wyizolowanych komórek nowotworu i mikroprzerzutu [60].	24
Tabela 3. Stwierdzenia i kontrowersje dotyczące roli mikroprzerzutów w węzłach chłonnych w raku szyjki macicy.	25
Tabela 4. Powikłania związane z wycięciem węzłów chłonnych (zakres rozszerzonego usunięcia macicy) [80].	28
Tabela 5. Dotychczasowe badania, w których u chorych wykonano ultracienkie skrawanie wszystkich węzłów chłonnych (w tym <i>SLN</i> i <i>nSLN</i>) i oznaczenie w hematoksylinie i eozynie, immunohistochemicznie lub w inny sposób. Prace dotyczą stadiów raka wg klasyfikacji <i>FIGO</i> , w których ujęto przypadki IA2 i IB1 [20,52,65,70,71,86-90].	30
Tabela 6. Szacowane odsetki stwierdzania przerzutów do węzłów chłonnych dla różnych stadiów raka szyjki macicy wg klasyfikacji <i>FIGO</i> [39-42,100].	35
Tabela 7. Przegląd metod znakowania węzłów chłonnych stosowanych obecnie rutynowo w Polsce w przypadku nowotworów ginekologicznych.	37
Tabela 8. Kryteria włączenia i wyłączenia pacjentek z badania.	39
Tabela 9. Charakterystyka pacjentek i raka szyjki macicy u 27 chorych (grupa n6).	43
Tabela 10. Szczegółowe przedstawienie danych o <i>stagingu</i> każdej chorej w grupie badanej (n6 = 27).	45
Tabela 11. Wartości cech decydujące o <i>stagingu</i> (cecha N) w grupie 11 chorych z co najmniej jednym makroprzerzutem, N1(MAC), mikroprzerzutem (bez makroprzerzutu, N1mi, oraz wyizolowanymi komórkami nowotworu N0i(+)) w węzłach chłonnych według systemu <i>TNM (UICC)</i> .	47
Tabela 12. Charakterystyka usuniętych węzłów chłonnych w badanej grupie n6 (27 chorych).	47
Tabela 13. Rozkład zmian wtórnych w węzłach chłonnych w badanej grupie (n6 = 27 chorych).	47
Tabela 14. Przypadki ze zdarzeniami w węzłach chłonnych zamieszczone w Tabeli 10, rozbudowanej o wielkość guza nowotworowego oraz informację z <i>ultrastagingu</i> , z podaniem strony identyfikacji <i>SLN</i> , stan <i>SLN</i> i <i>nSLN</i> (wg kryterium dominacji zmiany na daną stronę i węzły chłonne), oraz wykrycia zmian nowotworowych w <i>SLN/nSLN</i> z uwzględnieniem strony wybarwienia i podaniem liczby tych węzłów chłonnych.	48
Tabela 15. Zależność pomiędzy typem histologicznym nowotworu a obecnością „zdarzeń” w węzłach chłonnych w badanej grupie chorych (n6 = 27).	52
Tabela 16. Zależność pomiędzy typem histologicznym nowotworu a obecnością „zdarzeń” w pozawartowniczych węzłach chłonnych (<i>nSLNs</i>) w badanej grupie chorych (n6 = 27).	52
Tabela 17. Stan węzłów chłonnych pozawartowniczych (<i>nSLN</i>) w zależności od typu histologicznego nowotworu z uwzględnieniem izolowanych <i>MIC</i> (bez	

współistniejących makroprzerzutów, <i>MAC</i>) w badanej grupie chorych (n6 = 27).	52
Tabela 18. Zależność pomiędzy stopniem złośliwości histologicznej nowotworu (<i>grade</i>) a obecnością „zdarzeń” w węzłach chłonnych w badanej grupie chorych (n6 = 27).	53
Tabela 19. Zależność występowania zmian nowotworowych w <i>nSLN</i> (<i>MAC</i> lub <i>MIC</i> , <i>ITC</i>) od stopnia złośliwości histologicznej nowotworu w badanej grupie chorych (n6 = 27).	53
Tabela 20. Stan węzłów chłonnych pozawartowniczych (<i>nSLN</i>) w zależności od stopnia złośliwości histologicznej nowotworu (<i>grade</i>) z uwzględnieniem izolowanych <i>MIC</i> (bez współistniejących makroprzerzutów, <i>MAC</i> , ani wyizolowanych komórek nowotworu, <i>ITC</i>) w badanej grupie chorych (n6 = 27).	53
Tabela 21. Zależność pomiędzy wielkością guza nowotworowego a obecnością „zdarzeń” w węzłach chłonnych (<i>MAC</i> , <i>MIC</i> , <i>ITC</i>) we wszystkich przypadkach z podziałem na przypadki bez i ze zmianami nowotworowymi w węzłach chłonnych w badanej grupie chorych (n6 = 27).	54
Tabela 22. Zależność pomiędzy wielkością guza nowotworowego a obecnością „zdarzeń” w węzłach chłonnych pozawartowniczych (<i>nSLN</i>) w podgrupie 11 chorych.	54
Tabela 23. Zależność występowania mikroprzerzutów (<i>MIC</i>) w węzłach chłonnych pozawartowniczych (<i>nSLN</i>) od wielkości guza nowotworowego w grupie 11 chorych ze zmianami wtórnymi w węzłach chłonnych.	55
Tabela 24. Częstość występowania i zależność pomiędzy naciekaniem przestrzeni okołonaczyniowej limfatycznej (<i>LVSI</i>) a obecnością „zdarzeń” w węzłach chłonnych w grupie badanych chorych (n6 = 27).	58
Tabela 25. Zależność pomiędzy naciekaniem przestrzeni okołonaczyniowej limfatycznej (<i>LVSI</i>) a obecnością „zdarzeń” w węzłach chłonnych z podziałem na ich stopień ważności w grupie 11 chorych, u których stwierdzono zmiany nowotworowe.	58
Tabela 26. Zależność pomiędzy naciekaniem przestrzeni okołonaczyniowej limfatycznej (<i>LVSI</i>) a stanem węzłów chłonnych pozawartowniczych (<i>nSLN</i>).	59
Tabela 27. Zależność pomiędzy naciekaniem przestrzeni naczyń krwionośnych i chłonnych (<i>LVSI</i>) a izolowaną obecnością mikroprzerzutów w węzłach chłonnych pozawartowniczych (<i>nSLN</i>).	59
Tabela 28. Liczba znalezionych węzłów chłonnych u wszystkich chorych w grupie n3 = 40 w zależności od skutecznego zastosowania koncepcji <i>SLN</i>	60
Tabela 29. Wielkość guza i realizacja koncepcji węzła chłonnego wartowniczego (<i>SLN</i>) dla grup n3 i n6.	60
Tabela 30. Zestawienie wykrytych zmian nowotworowych z użyciem <i>ultrastagingu</i> histopatologicznego.	61
Tabela 31. Szczegółowy wykaz cechy obecności mikroprzerzutów (<i>MIC</i>) i wyizolowanych komórek nowotworu (<i>ITC</i>) w węzłach chłonnych	

wartowniczych (<i>SLN</i>) i pozawartowniczych (<i>nSLN</i>) wraz z oznaczeniem przypadków czcionką pogrubioną, w których nastąpiły zmiany cechy N w grupie badanej ($n_6 = 27$).....	62
Tabela 32. Zmiany w klasyfikacji po <i>ultrastagingu</i> w grupie $n_6 = 27$ chorych ze skutecznym wybarwieniem węzła chłonnego wartowniczego (<i>SLN</i>).	63
Tabela 33. Współwystępowanie makroprzerzutów (<i>MAC</i>) w węzłach chłonnych wartowniczych (<i>SLN</i>) z mikroprzerzutami (<i>MIC</i>) w węzłach chłonnych pozawartowniczych (<i>nSLN</i>).....	63
Tabela 34. Zdarzenia decydujące o <i>stagingu</i> u 11 chorych, u których wykryto <i>SLN</i> , w podziale na węzły chłonne wartownicze (<i>SLN</i>) i pozawartownicze (<i>nSLN</i>) w odniesieniu do wyizolowanych komórek nowotworu (<i>ITC</i>).....	64
Tabela 35. Analiza współwystępowania dodatnich węzłów chłonnych wartowniczych (<i>SLN</i>) pod względem makro (<i>MAC</i>) lub/i mikroprzerzutów (<i>MIC</i>) ze zmianami nowotworowymi w węzłach chłonnych pozawartowniczych (<i>nSLN</i>).....	64
Tabela 36. Analiza współwystępowania dodatnich węzłów chłonnych wartowniczych (<i>SLN</i>) pod względem makro (<i>MAC</i>) lub/i mikroprzerzutów (<i>MIC</i>) z izolowanymi mikroprzerzutami w węzłach chłonnych pozawartowniczych (<i>nSLN</i>).....	64
Tabela 37. Etapy opracowania preparatu tkankowego w <i>ultrastagingu</i>	65

Wykaz rycin

Rycina 1. Schematyczne przedstawienie węzła chłonnego wraz z rozróżnieniem zmian nowotworowych na makroprzerzut, mikroprzerzut i wyizolowane komórki nowotworu.	24
Rycina 2. Ogólny zarys dróg szerzenia się raka szyjki macicy z guza pierwotnego.	33
Rycina 3. Diagram przedstawiający proces kwalifikowania chorych do różnych grup w badaniu (N, n1-8).....	40
Rycina 4. Rozkład zmian nowotworowych w węzłach chłonnych miednicy, kierując się kryterium dominacji zmiany $MAC > MIC > ITC$	50
Rycina 5. Schematyczne przedstawienie wzorcowego opracowania materiału histopatologicznego po operacji.	65

Wykaz wykresów

Wykres 1. Współczynnik standaryzowany dla zachorowań na nowotwór złośliwy szyjki macicy (którego głównym przedstawicielem jest rak szyjki macicy, kod rozpoznania C53 wg Międzynarodowej Klasyfikacji Chorób ICD10) w ciągu 13 lat analizowanego okresu (od 2001r. do 2013r.) oraz współczynnik standaryzowany dla zgonów dla rozpoznania C53 w Polsce w ciągu 13 lat (od 2001r. do 2013r.). Legenda: Skośne linie – linie trendu liniowego, gdzie współczynnik R^2 jest bardzo wysoki, co dobrze świadczy o dopasowaniu modelu do danego szeregu czasowego. Współczynnik „a”
--

($y = ax + b$) ma w obu przypadkach wartość minusową – w takiej sytuacji z każdym rokiem wartość obu wskaźników spada o odpowiednią wartość. Dane źródłowe dostępne na stronie internetowej KRN – raport dla współczynników standaryzowanych zachorowań i zgonów dla kobiet, każdego wieku, dla wszystkich województw (www.onkologia.org.pl).	17
Wykres 2. Zależność pomiędzy głębokością naciekania (w milimetrach, wyrażonej jako mediana) a stwierdzeniem jakiegokolwiek zmiany nowotworowej w węzłach chłonnych; test t-studenta dla dwóch średnich $p=0,310$; test F wariancji $p=0,858$	55
Wykres 3. Krzywa ROC ilustrująca wartość decyzyjną punktu odcięcia głębokości naciekania równa 8 mm dla „zdarzeń” w węzłach chłonnych.	56
Wykres 4. Zależność pomiędzy głębokością naciekania a obecnością przerzutu (cecha N1) i <i>ITC</i> w przynajmniej jednym <i>nSLN</i> . ANOVA, test Kruskala-Wallisa $p=0,2498$ - brak statystycznej istotności.	57
Wykres 5. Zależność pomiędzy głębokością naciekania a obecnością izolowanych <i>MIC</i> w <i>nSLN</i> (cecha N1) i <i>ITC</i> w przynajmniej jednym <i>nSLN</i> . Test U Manna-Whitneya $p=0,926236$, brak statystycznej istotności.	57
Wykres 6. Liczba znalezionych węzłów chłonnych bez i ze skutecznym zastosowaniem koncepcji węzła chłonnego wartowniczego (<i>SLN</i>). Test dla dwóch średnich; $p=0,046$ (Test wariancji F – $p=0,060$ – wariancje są równe).	60

Wykaz fotografii

Fotografia 1. Niewielki węzeł chłonny zawierający mikroprzerzut, który ma ok. 1,6 mm w największym wymiarze. Powiększenie 40x, barwienie z przeciwciałem CK AE1/AE3.	51
Fotografia 2. A. Izolowane skupiska nowotworu (<i>ITC</i>) oraz zmiana, która znajduje się na granicy izolowanego <i>ITC</i> i mikroprzerzutu (nieco ponad 0,2 mm) w zatoce międzygrudkowej węzła chłonnego. Powiększenie 400x, barwienie z przeciwciałem CK AE1/AE3; B. Przerzut raka płaskonabłonkowego ponad 0,2 mm. Powiększenie 400x, barwienie hematoksyliną i eozyną.	51
Fotografia 3. Mikroprzerzut raka w węzle chłonnym, w powiększeniu 200x; A. Barwienie hematoksyliną i eozyną; B. Barwienie z użyciem przeciwciał CK AE1/AE3.	61

Załącznik 1. Klasyfikacje zaawansowania raka szyjki macicy wg systemu *TNM* oraz *FIGO*.

Guz pierwotny (T)		
TNM <i>Kategorie</i>	FIGO <i>Stadia</i>	Określenia chirurgiczno-patologiczne
TX		Guz pierwotny nie może być oceniony
T0		Nie ma oznak pierwotnego guza
Tis		Rak in situ (rak przedinwazyjny)
T1	I	Rak szyjki macicy ograniczony do szyjki (bez względu na naciekanie trzonu macicy)
T1a	IA	Inwazyjny rak stwierdzany tylko mikroskopowo; inwazja podścieliska na maksymalną głębokość 5,0 mm mierzona od podstawy nabłonka i poziome szerzenie się na 7,0 mm lub mniej; naciekanie przestrzeni naczyń chłonnych lub/i krwionośnych nie wpływa na klasyfikację
T1a1	IA1	Głębokość naciekania podścieliska ≤ 3.0 mm i szerzenie się poziome ≤ 7.0 mm
T1a2	IA2	Głębokość naciekania podścieliska > 3.0 mm i ≤ 5.0 mm z poziomym szerzeniem się ≤ 7.0 mm
T1b	IB	Klinicznie widoczna zmiana ograniczona do szyjki macicy lub zmiana mikroskopowa większa niż T1a/IA2
T1b1	IB1	Klinicznie widoczna zmiana ≤ 4.0 cm w największym wymiarze
T1b2	IB2	Klinicznie widoczna zmiana > 4.0 cm w największym wymiarze
T2	II	Rak szyjki macicy nacieka poza macicę ale nie naciąka ściany miednicy ani jednej trzeciej dolnej części pochwy
T2a	IIA	Guz bez naciekania przymacicz
T2a1	IIA1	Klinicznie widoczna zmiana ≤ 4.0 cm w największym wymiarze
T2a2	IIA2	Klinicznie widoczna zmiana > 4.0 cm w największym wymiarze
T2b	IIB	Guz z naciekaniami przymacicz
T3	III	Guz nacieka ścianę miednicy i/lub jedną trzecią dolną część pochwy /lub powoduje wodonercze albo zaprzestanie funkcjonowania nerki
T3a	IIIA	Guz nacieka jedną trzecią dolną część pochwy, nie nacieka ściany miednicy
T3b	IIIB	Guz nacieka ścianę miednicy i/lub powoduje wodonercze albo zaprzestanie funkcjonowania nerki
T4	IV	Guz nacieka błonę śluzową pęcherza moczowego lub odbytnicy i/lub szerzy się poza miednicę (obrzęk ujścia moczowodu jest niewystarczający do zaklasyfikowania guza jako T4)
T4a	IVA	Guz nacieka błonę śluzową pęcherza moczowego lub odbytnicy (obrzęk ujścia moczowodu jest niewystarczający do zaklasyfikowania guza jako T4)
T4b	IVB	Guz nacieka poza prawdziwą miednicę
Regionalne węzły chłonne (N)		
NX		Regionalne węzły chłonne nie mogą być ocenione
N0		Nie ma przerzutów do regionalnych węzłów chłonnych
N1		Przerzuty do regionalnych węzłów chłonnych
Przerzuty odległe (M)		
M0		Nie ma przerzutów odległych
M1		Przerzuty odległe (wliczając rozsiew otrzewnowy; naciekanie adobojczykowych, śródpiersiowych lub przyaortalnych węzłów chłonnych; i płuca, wątroby, lub kości)