

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO – TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2012

Klára Birkášová

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO – TECHNOLOGICKÁ
KATEDRA BIOLOGICKÝCH a BIOCHEMICKÝCH VĚD

EpCAM a jeho role u nádorových onemocnění

AUTOR PRÁCE: Klára Birkášová
VEDOUcí PRÁCE: Mgr. Zuzana Svobodová

2012

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO – TECHNOLOGICKÁ
DEPARTMENT OF BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL SCIENCES

EpCAM and its role in cancer

AUTHOR: Klára Birkášová
SUPERVISOR: Mgr. Zuzana Svobodová

2012

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavřené licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 ods. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 22. 6. 2012

Birkášová Klára

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat Mgr. Zuzaně Svobodové, za odborné vedení a cenné rady v průběhu vytváření mé bakalářské práce.

Souhrn

EpCAM molekula je glykosylovaný transmembránový protein, jenž se fyziologicky vyskytuje v mnoha epiteliálních tkáních, kde napomáhá těsnému spojení v mezibuněčném prostoru epitelových buněk. Dále je možné tuto molekulu detekovat na nádorově změněných buňkách, kdy exprimování EpCAM molekuly na jejich povrchu je součástí patologického procesu vedoucího ke vzniku řady nádorových onemocnění jako jsou kolorektální karcinom, adenokarcinom jícnu, karcinom, žaludku, pankreatu, ledvin, močového měchýře a urotelu, prostaty, prsu, ovarií, endometria, děložního hrdla, oblasti hlavy a krku, estenzineuroblastom, cholangiokarcinom, bronchogenní karcinom, melanom.

Cirkulující nádorové buňky (CTC), tedy buňky vyskytující se v periferní krvi nesoucí určité znaky některých typů nádorů, se v současné době jeví jako vhodný prognostický marker u těchto typů nádorů: karcinom prostaty, ovarií, prsu, jícnu, žaludku, kolorekta, ledvin, močového měchýře a urotelu, bronchogenní karcinom, melanom.

Detekce a identifikace CTC založená na výskytu EpCAM molekuly na povrchu těchto buněk má význam především v onkologické diagnostice a prognostice. Mezi metody používané k detekci patří klasické metody jako histologie a imunohistochemie, cytometrické metody jakož i metody inovativní EPISPOT, PCR, FISH či immunoassaye stejně jako metody nové používající mikrofluidní technologie. Mezi komerční produkty specializované pro detekci CTC patří např. CellSearch System či AdnaTest BreastCancerSelect.

Klíčová slova: EpCAM, CTC, nádor, metastáze, tumor markery

Summary

EpCAM molecule is glycosylated transmembrane protein occurring physiologically in epithelial tissues and which enables tight intercellular connections between the epithelial cells. EpCAM molecule expression occurs during the pathological process on surface of cancer cells such as colorectal carcinoma, adenocarcinoma of the esophagus, breast, stomach, pancreas, kidney, bladder and urothelial, prostate, breast, ovarian, endometrial, cervical, head and neck, esthesioneuroblastoma, cholangiocarcinoma, bronchogenic carcinoma, melanoma.

Circulating tumor cells (CTC) are viable tumour-detached cells circulating in bloodstream which express cell surface specific proteins that are characteristic for various types of cancer. At present, CTCs are considered as an appropriate prognostic marker for these cancers: prostate cancer, ovarian, breast, esophagus, stomach, colorectal, kidney, urinary urothelial and bladder, lung cancer, and melanoma.

Development of methods for CTC detection and/or identification based on EpCAM molecule expressing cells might significantly help in cancer diagnostics and prognostics. Among the methods used for CTC detection belong classical methods as histology, immunohistochemistry, and cytometric methods as well as innovative methods like EPISPOT, PCR, FISH or immunoassay, and in addition newly developed methods based on microfluidic technologies. Among commercial systems dedicated to the CTC detection based on EpCAM positive cells capture belongs CellSearch System or AdnaTest BreastCancerSelect.

Keywords: EpCAM, CTC, tumor, metastasis, tumor markers

Obsah

1. Úvod.....	9
2. Základní pojmy u nádorových onemocnění.....	9
2.1. Nádor a metastáze	9
2.2. Cirkulující nádorové buňky.....	11
3. EpCAM molekula a její role v organismu	11
4. Metody detekce cirkulujících nádorových buněk	13
4.1. Histologie a imunohistochemie	14
4.2. Cytometrické metody	14
4.3. Epiteliální imunospot	15
4.4. Polymerázová řetězová reakce.....	15
4.5. Fluorescenční in situ hybridizace	16
4.6. Mikrofluidní zařízení pro CTC detekci.....	17
4.7. CellSearch System	17
4.8. AdnaTest BreastCancerSelect	17
5. Využití detekce CTC u nádorových onemocnění	19
5.1. EpCAM v diagnostice.....	19
5.2. Maligní nádory hlavy a krku	20
5.3. Karcinomy gastrointestinálního traktu	21
5.4. Karcinomy vylučovací soustavy.....	28
5.5. Karcinomy mužského pohlavního systému	30
5.6. Karcinomy gynekologické oblasti.....	32
5.7. Karcinom plic	36
5.8. Kožní nádory	37
5.9. Minimální reziduální onemocnění MRD	39
6. Závěr.....	42
7. Seznam použité literatury	43

1. Úvod

Rakovina se vyskytuje mezi lidmi od nepaměti. Jeden z prvních důkazů rakoviny jsou zkamenělé kostní nádory v mumii ve starověkém Egyptě a starověké rukopisy.

Původ slova rakovina je připisován řeckému lékaři Hippokratovi (460 – 370 př. n. l.), jež je považován za „otce medicíny“. Hippokrates používal pojmy „carcinomas“ a „karcinoma“ k popisu toho, jak se vředy přetváří na nádory. v řečtině tato označení vycházejí ze slova „rak“. Hippokratovy uvedené pojmy vznikly pravděpodobně na základě pozorování tvaru nádoru prsu, jehož dlouhé výběžky podobné račím nohám pronikají do zdravé tkáně. Římský lékař Celsus (28 – 50 př. n. l.) později přeložil řecký termín do latiny jako „cancer“. Galén, další římský lékař (130 – 200 př. n. l.), pro označení zhoubných nádorů používal slovo „oncos“ (řecky rak), za což vděčí současný medicínský obor zvaný onkologie. Dodnes se používá název rakovina jako obecné označení všech zhoubných nádorů, i když část z nich nepřipomíná raka ani vzdáleně. [1]

2. Základní pojmy u nádorových onemocnění

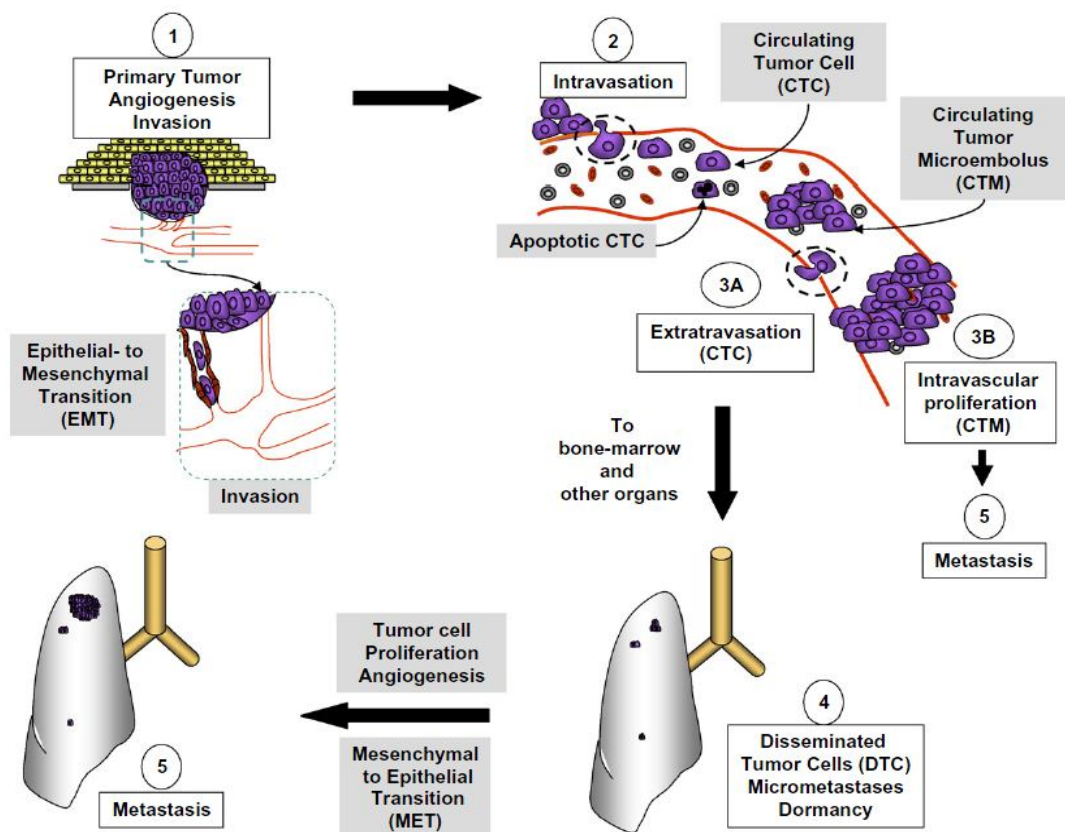
2.1. Nádor a metastáze

Nádor je patologický útvar tvořený tkání, jejíž růst se vymkl kontrole organismu a roste na něm nezávisle. Maligní zhoubný nádor při svém růstu ničí okolní tkáně, zakládá dceřiná ložiska metastázy a má rovněž celkové účinky na organismus. Benigní nezhoubný nádor roste ohraničeně a metastázy nezakládá, může však utlačovat okolní struktury, což je nebezpečné například v mozku. Některé benigní nádory se mohou po čase zvrhnout v nádory zhoubné malignizace.

Nádory mohou vzniknout v jakékoliv tkáni a orgánu, přičemž nejčastější jsou v oblastech, kde dochází i za normálních okolností ke značnému množení buněk či k jejich stimulaci, například pohlavními hormony v trávicím ústrojí, průduškách, prsech, ženských pohlavních ústrojích, prostatě a podobně. K nejdůležitějším nádorům u lidí patří zhoubné epitelové nádorové karcinomy. Primárním nádorem je myšlen prvotní vznik v určitém orgánu, jeho další rozsev do organismu a vznik sekundárních nádorů určitého orgánu se označuje jako metastázy. Ty vznikají šířením nádorových buněk nebo choroboplodných zárodků krví, lymfou nebo přímým rozsevem. [2]

První zmínka o volných nádorových buňkách pochází z roku 1869. Asworth popsal případ rakoviny, kdy ještě po smrti pacienta byly v jeho krvi objeveny buňky připomínající nádorové. Tyto buňky se po uvolnění z nádoru šířily jak krevní, tak i lymfatickou cestou a po jejich extravazaci do cílového orgánu mohlo dojít ke vzniku mikrometastáz (MMTS) s následnou tvorbou makroskopických metastáz. [9]

Proces vedoucí ke vzniku nádorů a metastáz zahrnuje aktivní molekulární „přeslech“ (cross-talk) v rámci mikroprostředí nádoru, roli bílkovinně vázaných nádorů, jako je urokináza typu aktivátoru plazminogenu (UPa), fibrinogenu a komplexní signalizaci, jako je Akt1/PKB, které regulují invazi a apoptózu. z toho plyne schéma s následujícími kroky: nádorové růstové buňky, angiogeneze, dělení nádorových buněk, epiteliální přechod na mezenchymální (EMT), pohyblivost, pronikání do cév, přežití v řečišti a embolizace, možná extravazace, mezenchymální přechod na epiteliální (MET), tvorba mikrometastáz a růst makrometastáz. [19, 32]



Obrázek 1: Vývoj metastáz [19]

2.2. Cirkulující nádorové buňky

Cirkulující nádorové buňky (CTC; circulating tumor cells) jsou tedy ty buňky, jež se vyskytují v krvi a mají antigenní anebo genetické znaky určitého typu nádoru. CTC jsou často detekovány v krvi pacientů s rakovinou. pro detekci CTC se používají různé metodiky s proměnnou citlivostí a specifíčností. Záchyt CTC koreluje s nepříznivými klinickými výsledky. Jejich přítomnost přispívá k relapsu onemocnění. Genetické a fenotypové profilování CTC se často liší od primárního nádoru, a tedy je vhodné ho použít k výběru nejefektivnější cílené terapie. [3]

Množství nádorových buněk cirkulujících v periferní krvi se zdá být vhodným prognostickým faktorem a ukazatelem progresu a rozsahu onemocnění, především u melanomu, karcinomu prsu, prostaty a kolorekta. [13]

3. EpCAM molekula a její role v organizmu

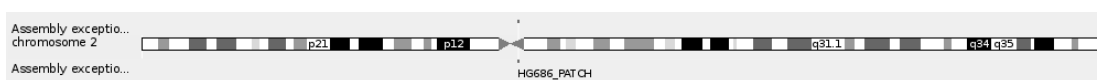
Epiteliální buněčná adhezní molekula (EpCAM, Epithelial cell adhesion molecule) byla popsána v roce 1979 jako dominantní antigen v lidské tkáni karcinomu tlustého střeva. Vzhledem k tomu, že byl EpCAM nezávisle identifikován mnoha výzkumnými skupinami, dostal EpCAM různá označení. [22]

Tato synonyma jsou: TACSTD1 (tumor-associated calcium signal transducer), BerEp4, CD326, CO17-1A, 17-1A, EGP (epiteliální glykoprotein), EGP 2, EGP 34, EGP 40, GA733-2 (hlavní gastrointestinální tumor protein), KS1/4, KSA, Ly74, M1S2, M4S1, MIC18, MK-1, TROP 1 (buněčný povrch glykoproteinu), hEGP-2, 323/A3, HEA125, MH99, MOC31, VU-1D9. [5, 22] v poslední době se ovšem výhradně používá název EpCAM (CD 326). [22]

EpCAM je glykosylovaný, 30 – 40 kDa membránový protein typu I, který je exprimován v různých lidských epiteliálních tkáních, karcinomech, progenitorových a kmenových buňkách. Protein EpCAM se skládá z 314 aminokyselin (AA), z toho 265 AA tvoří extracelulární domény, 23 AA transmembránové domény s epidermálním růstovým faktorem (EGF), tyreoglobulinu a 26 AA intracelulární domény, která je nazvána EpICD. Míra glykosylace EpCAM molekuly je odlišná u nádorové a zdravé tkáně a pohybuje se mezi 34-42kDa. [5, 20]

Gen pro EpCAM molekulu je umístěn na chromozomu 2: 47, 572, 297-47, 614, 740

a má 6 přepisů (EpCAM-001 až EpCAM-006), které se liší různou délkou a biotypy. [7] Gen EpCAM/TACSTD1 se skládá z 9 exonů a dosud na něm nebyly pozorovány žádné mutace. [5] Gen EpCAM kóduje antigen související s karcinomem a je členem rodiny, která zahrnuje nejméně dva druhy membránových proteinů typu I. Tento antigen je exprimován na většině normálních epiteliálních buněk a gastrointestinálních karcinomech, funguje jako holotyp na vápníku nezávislých molekulových buněčných adhezí. Antigen je používán pro cílenou imunoterapii lidských karcinomů. Mutace v tomto genu vedou k vrozeným enteropatiím. [6]



Obrázek 2: Chromosome 2: 47,572,297-47,614,740 [8]

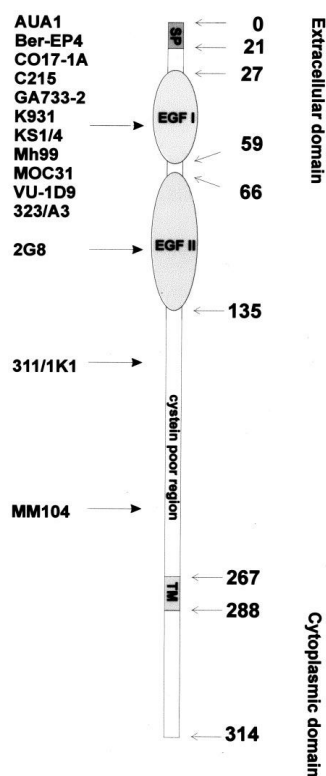
EpCAM u normální zdravé tkáně napomáhá velmi těsnému spojení v mezibuněčném prostoru epitelových buněk, zejména se jedná o jednoduchý epitel a bazální membránu buněk, kde se lokalizuje na plazmatickou, basolaterální membránu. U nádorové tkáně je EpCAM molekula homogenně rozložena na celém povrchu nádorové buňky. [5, 20]

Množství exprimované EpCAM molekuly se u nádorově změněných buněk značně mění, již ve fázi dysplazie dochází k její silné expresi na povrchu buňky, to je typické u malignit. [5] EpCAM molekula je známa jako nádorový antigen, jenž souvisí s četnými aplikacemi v diagnostice, prognóze a léčbě rakoviny. [22]

Během několika posledních let se klade důraz na výzkum molekulární funkce EpCAM. Díky vysoké úrovni exprese EpCAM je umožněno zavádění nových terapeutických postupů na šíření nádorových buněk a nádorových kmenových buněk různého původu. [4]

V Imunoterapii jsou využívány známé protilátky charakteristické svým vazebným místem proti epiteliální adhezni molekule EpCAM. Viz tabulka [24]

Známé protilátky proti EpCAM [24]	
Protilátka	Epitop
AUA1	EGF- doména I
Ber-EP4	EGF- doména I
CO 17-1A	EGF- doména I
C215	EGF- doména I
ESA, EGP-2, EGP 40	Nestanoven
FU-MK-1	Nestanoven
GA733-2	EGF- doména I
HEA 125	Nestanoven
K928	Nestanoven
K931	EGF- doména I
KSA, KS-1, KS1/4	EGF- doména I
MM104	Cystein chudé oblasti
MH99	EGF- doména I
MOC31	EGF- doména I
MT201	Nestanoven
VU-1D9	EGF- doména I
2G8	EGF- doména II
311-1K1	Cystein chudé oblasti
323/A3	EGF- doména I



Obrázek 3: Schéma molekulární struktury EpCAM s vyznačenými místy vazby specifických protilátek [24]

4. Metody detekce cirkulujících nádorových buněk

I přes velké pokroky v oblasti výzkumu a léčby je stále rakovina druhou příčinou úmrtí. Primární nádory mají jen zřídka smrtelné následky, zatímco metastazující onemocnění představují okolo 90% úmrtí v důsledku solidních nádorů. Proto je důležitý rozvoj citlivých metod umožňující detekci rakovinného šíření, zejména při často se vyskytujících karcinomech. [17]

Cirkulující nádorové buňky neboli maligní buňky cirkulující v periferní krvi pacientů se solidními nádory, je možné detekovat na základě jejich povrchových markerů nebo přítomnosti nukleových kyselin. Stanovení na základě průkazu DNA je vhodné především u nádorů se specifickými genetickými abnormalitami (detekce fúzních genů, mutace Ras, či p53), častěji se provádí stanovení na základě kvantitativní PCR v reálném čase mRNA, kdy je cílový transkript exprimován specificky v nádorových buňkách. [13] Techniky pro separaci CTC jsou založeny na rozdílné hustotě a velikosti od normálních buněk. [17] Techniky pro rozpoznání jednotlivých nádorových buněk jsou citlivé řádově

10^4 až 10^6 zdravých buněk a tím mohou přispět k dřívějšímu záchytu metastáz. [9] V následujícím výčtu je uveden základní přehled nejčastěji využívaných metod pro detekci CTC.

4.1. Histologie a imunohistochemie

V polovině 50. let bylo pomocí histologických metod vyšetřeno na přítomnost CTC asi 5000 pacientů s rakovinou. CTC byly detekovány téměř u 100 % případů. Ovšem ukázalo se, že často docházelo k záměně hematopoetických buněk (zvláště megakaryocytů) s nádorovými buňkami.

Pomocí imunohistochemie, metody, která byla objevena v 80. letech, je umožněna detekce jedné nádorové buňky mezi 10 000 – 100 000 nenádorovými buňkami za pomoci obarvení preparátu monoklonálními protilátkami proti antigenům specifických pro nádorové buňky. [9] Imunohistochemicky je možné stanovit v histologických vzorcích primárního nádoru EpCAM. [21] Nevýhodou je však omezený počet hodnocených buněk a riziko zkřížené reakce s jinými epitopy. Navíc metoda nedosahuje citlivosti PCR. [9]

4.2. Cytometrické metody

Průtoková a laserová skenovací cytometrie jsou metody na bázi protilátkové technologie s pozitivní selekcí leukocytů pomocí anti-CD45. Zatímco průtoková cytometrie je proces, během kterého jednotlivé buňky v suspenzi procházejí průtokovou komůrkou a po interakci s monochromatickým laserovým paprskem dochází k lomu a odrazu světla, tím je možné provést analýzu vybrané cílové buněčné populace. [14] Pak laserová skenovací cytometrie spojuje možnosti průtokové cytometrie, fluorescenční mikroskopie a analýzy obrazu. Umožňuje tak kvantifikovat fluorescenční značení na přisedlých buňkách v tkáňové kultuře nebo dokonce na tkáňových řezech. [15]

Výhodou metod je, že nevyžadují lýzu buněk, a to umožňuje poznat jejich morfológickou charakterizaci, počet a molekulární povahu. [17] Cirkulující nádorové buňky je možné detekovat průtokovou cytometrií, většinou na základě povrchových znaků epiteliálních buněk nebo adhezivních molekul (EpCAM). před tuto metodu je možné předřadit koncentrační krok založený na izolaci buněk pomocí paramagnetických částic. [13]

Nicméně tyto metody jak průtoková, tak i laserová skenovací cytometrie, jsou omezovány nízkou koncentrací CTC v krvi, což vyžaduje velké množství vzorků.

I přes tento nedostatek se průtoková i laserová skenovací cytometrie v současné době používá k detekci CTC, protože tyto metody jsou rychlé, kvantitativní a mohou současně analyzovat více parametrů, jako je velikost, obsah DNA, specifické antigeny a mohou identifikovat živé buňky od neživých. [17] ke zvýšení citlivosti metody lze provést obohacení vzorku, nejčastěji za použití imunomagnetických metod, ve kterých je na paramagnetickou látku navázána monoklonální protilátka (např. již výše uvedená anti-CD45 proti leukocytům). [18]

4.3. Epiteliální imunospot

Zkráceně EPISPOT je protilátková technologie založená na imunoenzymatických testech na panelu různých nádorových buněk. Je běžnou metodou pro monitorování imunitní odpovědi. Principem je identifikace konkrétních proteinů vylučovaných jednotlivými živými epiteliálními nádorovými buňkami s vyhodnocením imunochemicky nebo imunofluorescenčně. Tento test je jedinečným pro detekci rakovinné buňky na základě vylučování proteinů, nebyl dosud použit ve velkých klinických studiích. [17]

4.4. Polymerázová řetězová reakce

Obecně PCR je jednoduchá a rychlá metoda umožňující detekci vybrané sekvence DNA, její mnohonásobné amplifikace za použití specifických oligonukleotidů a DNA polymerázy. Typický průběh PCR zahrnuje 35 – 40 cyklů. [9]

V důsledku nestability mRNA, která je rychleji degradována v periferní krvi, se v současné době považuje za lepší cíl pro detekci CTC kvantitativní PCR v reálném čase (QRT-PCR) nebo PCR pomocí reverzní transkriptázy (RT-PCR). [17]

QRT-PCR je variantou PCR umožňující přímou kvantifikaci PCR-produktu v průběhu reakce. QRT-PCR se provádí prostřednictvím detekce a kvantifikace fluorescenčního signálu. [57] Tato metoda je vhodná pro monitorování minimální zbytkové choroby zodpovědné za relaps onemocnění, a zároveň umožňuje předpovědět progresi onemocnění a účinnost léčby. [12]

Reverzně transkripční polymerázová řetězová reakce (RT-PCR) je založena na principu amplifikace molekul mRNA, které nelze použít jako templát k PCR, proto se izolovaná RNA musí převést do komplementární DNA (cDNA) retrovirovou zpětnou transkriptázou s následnou amplifikovanou PCR a 2 specifickými primery. [57] Použití RT-PCR v současné době je nejcitlivější způsob identifikace cirkulujících nádorových

buněk u pacientů s rakovinou. [11]

PCR je sice metoda podstatně citlivější než histopatologie, imunohistochemie nebo průtoková cytometrie, jde však o techniku do značné míry destruktivní. po provedení analýzy již není možné zpětné ověření morfologické povahy buněk, ani jejich množství. v posledním bodu může být velice užitečná různě modifikovaná kvantitativní PCR (QRT-PCR). Přes velkou citlivost RT-PCR má tato technika nízkou specifičnost vzhledem k expresi některých transkriptů normálních krevních buněk, a to vede k falešně pozitivním výsledkům. v případě RT-PCR je nevýhodou oproti histologii a imunohistochemii podstatně snížená možnost provádění retrospektivních studií. Materiál bývá většinou konzervován formaldehydem a parafinem a vzhledem k velice nízké kvalitě RNA se nehodí pro zpracování touto metodou. [10, 17]

4.5. Fluorescenční in situ hybridizace

Fluorescenční in situ hybridizace (FISH) je molekulární cytogenetická metoda, která využívá alespoň dvou chromosomových sond značených fluorescenčně pro stanovení cirkulujících epitelových buněk. Slouží pro potvrzení konečného maligního charakteru CTC a pro podrobnější studium jejich biologického chování. Karcinomy jsou spojeny s chromozomálními abnormalitami, přítomností numerických aberací a protonkogenů. Stanovení genetických změn prokazuje maligní charakter CTC a je tím spojené s progresivní rakovinou. [23]

Přesnější variantou je komparativní genomová hybridizace (CGH), která určuje nebalancované změny, definuje v genomu oblasti, které mají vztah ke vzniku nádoru a dovolují rychle odhalit geny ležící v těchto oblastech. [16]

Jelikož FISH analýzy vyžadují vysoké rozlišení zobrazení jednotlivých buněk a jejich využití v diagnostice je omezené pro časovou a technickou náročnost, Sieben a spol., demonstroval provedení FISH uvnitř mikrofluidních zařízení. Plně automatizovaný FISH systém lze využít v rutinní molekulární typizaci pro genomové analýzy nádorových buněk. Mikrofluidní systém je založen na samostatně sestavených magnetických částicích pro buněčné třídění. Tento přístroj je schopen zachytit velmi vzácné buňky, jako jsou cirkulující nádorové buňky, v biologických vzorcích (krev, kostní dřeň). Zachycené buňky mohou být analyzovány světelnou oblastí a fluorescenční mikroskopií při velkém zvětšení. [20]

4.6. Mikrofluidní zařízení pro CTC detekci

Řada výzkumných skupin se zabývá vývojem mikrofluidního zařízení tzv. lab-on-chipu, který v sobě integruje separační i detekční složky a jeho design je navržen na míru určité aplikaci, v tomto případě pro záchyt a identifikaci cirkulujících nádorových buněk (CTC). Takováto mikrofluidní zařízení mohou být založena na principu afinitní mikrochromatografie, magnetické buněčné separace, porézní mikrofluidní separace anebo dielektroforézy. [59] Například autoři Nagrath a spol. vyvinuli mikrofluidní čip, na kterém záchyt CTC buněk z plné krve pacienta probíhá v komůrce s mikroposty potažené specifickými anti-EpCAM protilátkami, a k identifikaci je použito fluorescenčního značení a nasnímané obrázky jsou podrobeny obrazové analýze. Pro odstranění interference způsobené přítomností leukocytů ve vzorku se využívá negativní selekce pomocí protilátky anti-CD45. [58] Předností těchto mikrofluidních technologií je využití malých objemů vzorků, rychlého zpracování paralelní analýzy vzorků. Prozatím jsou mikrofluidní čipové technologie pro CTC detekci ve fázi výzkumu a vývoje. [58, 59]

4.7. CellSearch System

Jedním z komerčních produktů zabývajících se detekcí CTC je semiautonomní přístroj CellSearch System od firmy Veridex (Raritan, NJ). Záchyt buněk je založen na magnetických částic potažených anti-EpCAM specifickou protilátkou. Zachycené buňky jsou identifikovány fluorescenčně značenou monoklonální protilátkou specifickou pro leukocyty (CD45), cytokeratiny 8, 18 a 19 a jádro je zvýrazněno fluorescenční barvičkou DAPI. Tato metoda slouží pro detekci CTC u pacientů s metastazujícími karcinomy prsu, kolorekta a prostaty. [58]

4.8. AdnaTest BreastCancerSelect

AdnaTest BreastCancerSelect (AdnaGen, Langenhagen, NJ) je dalším z přístrojů vyvinutých pro CTC detekci, a který je založený na záchytu buněk pomocí imunomagnetických částic potažených různými protilátkami proti povrchovým antigenům. Poté následuje šetrná mRNA extrakce zajišťující integritu a kvantitu získané RNA. Test je vhodný pro detekci karcinomů prsu a tlustého střeva. [58]

Přehled metod detekce cirkulujících nádorových buněk (CTC) a diseminovaných nádorových buněk (DTC) konkrétně u karcinomu prsu [58]:

Název testu	Princip	Markery pro identifikaci	Výsledek testu
<i>CellSearch</i>	Imunomagnetické separace buněk pomocí anti-EpCAM selekce	Pro záchyt EpCAM; cytokeratiny (pozitivní identifikace); CD45 (negativní selekce)	Mikroskopické stanovení počtu buněk
<i>AdnaTest (BreastCancerSelect)</i>	Pomocí směsi 3 protilátek epiteliálních povrchových antigenů; RT-PCR	Epiteliální antigen GA 733-2 (mRNA); HER2 (mRNA); MUC1 (mRNA); aktin (negativní selekce destiček)	Stanovení relativního množství mRNA (CTC-asociované)
<i>Membránový mikrofiltrační test</i>	Zachycení pomocí membránového filtru; elektrolyza na filtru; RT-PCR	---	Stanovení relativního množství mRNA (CTC-asociované)
<i>Mikrofluidní CTC čip</i>	Mikroposty potažené protilátkou; laminární mikrofluidika	Pro záchyt EpCAM; fluorescenční barvení jádra; cytokeratin (pozitivní identifikace); CD45 (negativní selekce)	Mikroskopické stanovení počtu buněk
<i>FAST</i>	FAST skenovací technologie; Imunofluorescence	cytokeratiny	Mikroskopické stanovení počtu buněk
<i>EPISPOT</i>	Imunoenzymatické testy na panelu různých nádorových buněk; kultivace CTC buněk	MUC1; cytokeratin 19; CD45 (negativní selekci)	Stanovení produkce specifických epiteliálních proteinů u kultivovaných CTC
<i>LSC</i>	Laserová skenovací cytometrie; imunofluorescence	EpCAM; CD45 (negativní selekci)	Mikroskopické stanovení počtu buněk

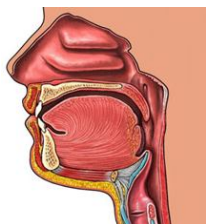
5. Využití detekce CTC u nádorových onemocnění

Výskyt metastáz u pacientů se solidními nádory velmi negativně ovlivňuje jejich prognózu. Současné zobrazovací techniky však nemají dostatečnou rozlišovací schopnost pro zachycení časných stadií metastatického procesu. Klasická TNM (tumor – nodus – metastáza) klasifikace rozděluje pacienty do několika skupin na základě statutu primárního nádoru, lymfatických uzlin a vzdálených metastáz. v rámci těchto skupin lze pro každého jednotlivého pacienta stanovit míru rizika vzniku metastatického ložiska, případně relapsu nemoci po odstranění primárního nádoru. Nicméně, jedná se pouze o statické vyjádření pravděpodobnosti založené na výsledcích rozsáhlých studií. [9] Detekce CTC může mít význam v prognostice, ale protože se vyskytují jen v nízkém počtu, nelze tyto buňky snadno odhalit. [56] Proto se v posledních letech s rozvojem nových molekulárně-biologických metod soustřeďuje pozornost na včasné rozpoznání diseminace nádorových buněk. [9]

5.1. EpCAM v diagnostice

V lidských tkáních je adhezivní molekula EpCAM exprimována především v epitelu a neoplazii odvozené od epitelu, čehož se využívá v rozlišení jednotlivých tkání. Prokázalo se, že EpCAM může být použit, jako indikátor rozlišující mezi epitelovou neoplastickou tkání a neepitelovou neoplastickou tkání. Dále je možno použít molekulu EpCAM jako marker pro histologické odlišení epiteliálních neoplazií. v závislosti na orgánu existují různé podtypy s různými vlastnostmi a intenzitou. [22]

5.2. Maligní nádory hlavy a krku



Obrázek 4: Oblast výskytu nádorů hlavy a krku [37]

Do skupiny nádorů hlavy a krku patří nádory rtů, dutiny ústní, jazyka, dutiny nosní, paranazálních dutin, epifaryngu, orofaryngu, hypofaryngu, laryngu, slinných žláz a ušní nádory. Jejich závažnost je dána lokalizací ve funkčně a esteticky exponované krajině. Často bývá v různém stupni postižena řeč, polykání a dýchání. Maligní nádory hlavy a krku zůstávají dlouho bez příznaků nebo často připomínají nezávažná chronická zánětlivá onemocnění. Pravděpodobnost metastazování těchto karcinomů do krčních uzlin je poměrně vysoká. v závislosti na lokalizaci nádorů se prognóza horší od rtů směrem k hypofaryngu. [30,33]

Maligní nádory hlavy a krku představují u mužů asi 6 %, u žen asi 2 % všech zhoubných nádorů. Incidence nejčastějšího typu nádoru ze všech maligních nádorů hlavy a krku, karcinom laryngu, byla v roce 2005 v ČR 9,4/100 000 mužů a 0,8/100 000 žen. Výskyt částečně závisí na geografické poloze a stoupá od severu k jihu. Nejnižší hodnoty byly zjištěny ve Švédsku, nejvyšší ve Francii. [30, 33, 45]

Většina maligních tumorů hlavy a krku vychází z povrchového epitelu, a proto je zde nejčastějším histologickým typem nádoru dlaždicobuněčný (spinoelulární) karcinom. Představuje až 90 % všech tumorů. v nazálních a paranazálních dutinách se vyskytuje spinoelulární karcinom nebo adenokarcinom. Mimo spinoelulární karcinomy (verukózní) jsou v této oblasti popisovány vřetenobuněčné karcinomy a nediferencované karcinomy.

Ke sledování průběhu onemocnění a efektu terapie (nikoliv při screeningu či primární diagnostice) lze použít kombinace sérových nádorových markerů: karcinoembryonální antigen (CEA), antigen skvamózních buněk (SCCA), tkáňový polypeptidový antigen (TPA) a cytokeratinové antigeny (CYFRA 21-1). [30,33]

V dlaždicovém epitelu dutiny ústní je exprese EpCAM spolehlivým ukazatelem rozvoje nádorového onemocnění. Dysplastické tkáně totiž vykazují vysokou expresi

EpCAM ve srovnání se zdravou tkání, která je EpCAM negativní. [22] Stejně tak v dlaždicovém epitelu laryngu koresponduje exprese EpCAM molekuly s výskytem daných dysplastických oblastí. [24]

Autoři Jatana a spol. a Hristozová a spol. ve svých pracích uvedli, že na základě nových technologických postupů a pozitivních výsledků z izolování CTC v periferní krvi u karcinomů hlavy a krku, je v budoucnu možná využitelnost CTC jako prognostického markeru u těchto nádorů. [81, 82]

5.2.1. *Neepitelový karcinom estezineuroblastom (ENB)*

Estezineuroblastom, neboli olfaktorický neuroblastom, je neurogenní tumor vycházející z čichového epitelu kranálně od střední nosní skořepky. Vyskytuje se velmi vzácně, tvoří jen asi 1–5 % všech nádorů nosu a vedlejších dutin nosních a postihuje převážně mladé jedince do 35 let. [31] Například Broich a spol. za posledních 20 let zaznamenali pouze asi 1000 nových případů. Recidiva je možná i po 10 letech ukončení léčby, proto je důležité dlouhodobé monitorování pacienta. [27]

Estezineuroblastom, jako neepitelový karcinom patřící mezi maligní nádory hlavy a krku, je výjimkou, u něhož byla prokázána tvorba adhezivní molekuly EpCAM. [22] Detekce CTC se u tohoto typu nádoru neprovádí.

5.3. Karcinomy gastrointestinálního traktu

5.3.1. *Karcinom jícnu*



Obrázek 5: Imunologické barvení EpCAM molekuly v různých tkáňových řezech. Silná exprese proteinu EpCAM byla patrná v mělkých oblastech nádoru, ale v hlubších oblastech invazivního nádoru je exprese snížena (zvětšení 40x). [38]

Karcinom jícnu neboli ezofagu je maligní onemocnění vznikající maligní transformací dlaždicového (skvamózního, epidermoidního) epitelu jícnu (epidermoidní karcinom) nebo metaplastického epitelu Barretova jícnu či mucinózních žláz lokalizovaných ve stěně jícnu (adenokarcinom). Karcinomy jsou lokalizovány především v distální části. Nejčastějším

příznakem onemocnění je dysfagie a váhový úbytek. Výsledky léčby karcinomu jícnu jsou velmi neuspokojivé. Operační výkon mívá jen zřídka kurativní charakter. Zavedením novějších zobrazovacích metod, jako je endoskopie, PET či PET/CT zlepšilo korelaci klinického a pooperačního stagingu. [30, 33]

Onemocnění se nejčastěji manifestuje ve věku 50-60 let. v ČR byla incidence v roce 2009 u mužů 490 (9,5/100 000) a u žen 105 (1,96/100 000). Celosvětově je to osmé nejčastější nádorové onemocnění. Relativní incidence plynule narůstá s věkem. [30, 33, 44, 45]

Byly popsány četné molekulárně biologické markery v nádorové tkáni – např. epidermal growth factor receptor (EGFR), transforming growth factor α (TGF- α), p53, E-kadherin, Bcl-2, a další, jejichž prognostický význam byl však posouzen kontroverzně a současně příliš neposkytují spolehlivou prognostickou předpověď. [32]

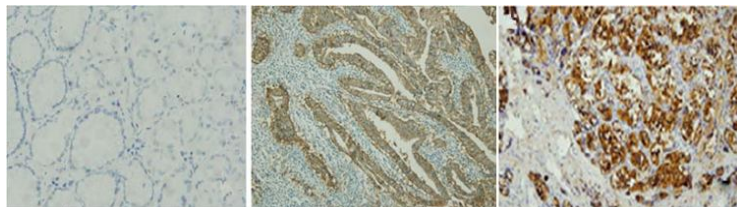
Dlaždicový epitel jícnu je pro EpCAM jednoznačně negativní, cylindrický epitel Barretova jícnu zobrazuje difúzi a slabou expresi EpCAM. z biopsie Barrettova jícnu imunohistochemickým barvením pomocí mAb-KS1 byla prokázána heterogenita EpCAM. [24] Autoři Kumble a spol. z předběžných výsledků zjistili vysokou expresi EpCAM molekuly u adenokarcinomu jícnu a jeho pozitivní korelaci s progresí tohoto onemocnění.[26]

Autor Zhian a spol. ve své práci uvedl, že CTC jsou užitečné k hodnocení mikrometastáz karcinomu jícnu a současně umožňují predikci recidivy u takto postižených pacientů. [73]

5.3.2. Karcinom žaludku



Obrázek 6:
Žaludek a jeho epitel [46]



Obrázek 7: Imunohistochemicky obarvené preparáty zvětšené 200x. A) Normální sliznice je EpCAM negativní. B) Tkáň karcinomu žaludku, hnědě jsou označeny EpCAM pozitivní oblasti tkáně. C) Špatně diferencovaná tkáň karcinomu žaludku vykazuje silný, střední nebo slabý EpCAM imunologický signál ve většině epitelových buněk. [40]

Karcinom žaludku je maligní onemocnění, které se vyvíjí na základě maligní transformace buněk cylindrického epitelu žaludeční sliznice. Karcinom žaludku nejčastěji

postihuje kardii a malou kurvaturu, často také gastroezofageální přechod. Onemocnění probíhá v mnoha případech zpočátku asymptomaticky. Později se objevuje nechut' k jídlu až anorexie, patologická únava, nauzea až zvracení s krví, tlakové bolesti v epigastriu. Prognóza onemocnění závisí na rozsahu onemocnění. [30, 33]

Podle epidemiologických studií incidence a mortalita na karcinom žaludku ve vyspělých zemích klesá, přesto je toto onemocnění jednou z nejčastějších příčin smrti. Největší výskyt je v Číně, Japonsku, Jižní Americe a ve východní Evropě. v ČR se v roce 2009 diagnostikovalo 1659 nových onemocnění. Jde o onemocnění vyššího věku s maximem výskytu mezi 75-80 lety, přičemž muži jsou postiženi asi dvakrát častěji. [30, 33, 44, 45]

Vyšetření nádorových markerů (CAE, CA 19-9, CA 72-4) v séru má význam jen ke kontrole průběhu terapie. Vzhledem k neexistujícímu screeningovému vyšetření se onemocnění ve většině případů diagnostikuje v pokročilém stadiu. [30, 33]

EpCAM vědci navrhli k časnému zachytu rozvoje žaludečních metaplazií pomocí antigenu Ki-67 nebo protilátek FU-MK1 či 323/A3, jelikož je detekovatelný už na hranici normálních a metaplastických buněk, které ještě nevykazují metaplastický fenotyp. [24]

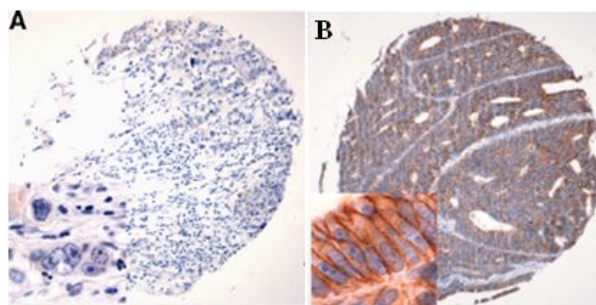
Vysoká tvorba EpCAM se zaznamenala u adenokarcinomu žaludku [22]. Ovšem ve zdravé tkáni epitelu žaludku se EpCAM nevyskytuje (výjimku tvoří bazální vrstvy krypt). Tedy, ztráta EpCAM, jako epiteliální adhezivní molekuly, může reflektovat ztrátu epiteliální diferenciaci, což je špatným prognostickým znakem. Slabá úroveň exprese E-kadherinu v karcinomu žaludku zvyšuje roli EpCAM v adhezivních buněčných spojích, následkem je ztráta buněčné adheze, a to podporuje tvorbu metastáz. [24]

Autoři Takeuchi a spol. a Hiraiwa a spol. ve svých pracích poukazují na využitelnost CTC jako prognostického markeru karcinomu žaludku. Změnu počtu CTC v periferní krvi je tedy možné využít k hodnocení stádia tumoru, prognostice výskytu vzdálených metastáz a sledování léčebných účinků chemoterapií. [60, 62]

5.3.3. Karcinom tlustého střeva



Obrázek 8: Intestinum crassum [55]



Obrázek 9: Ep-CAM barvení dvou lidských vzorků tlustého střeva z tkáňových mikročipů. (A) Vzorek zdravé tkáně tlustého střeva. (B) Vzorek karcinomu tlustého střeva. Výstupek zachycuje detailnější pohled na membráně lokalizovaný obarvený produkt. [39]

Kolorektální karcinom je nejčastějším nádorem trávicího ústrojí a celosvětově patří stále mezi nejčastější nádory vůbec. [30, 33, 44, 45] Termínem kolorektální karcinom se označují maligní onemocnění vznikající maligní transformací cylindrického epitelu tlustého střeva (vzestupný, příčný, sestupný tračník a esovitá klička) a rekta. Pokročilé nádory vedou ke ztrátě váhy, malnutrici a anemizaci. Hlavními akutními komplikacemi jsou obstrukce a perforace střeva, což vede ke krvácivým stavům. [30, 33]

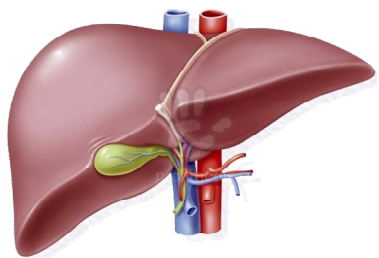
Z analýzy věkově specifikované incidence nádorů kolorekta vyplývá počáteční nárůst onemocnění u osob 35. roku života, strmější nárůst kolem 50. roku a maximum dosahuje incidence ve věku 70-74 let. v ČR bylo v roce 2009 hlášeno 8205 (78,09/100 000) onemocnění. Obdobný vývoj je sledovatelný i u mortality. [30, 33, 44, 45]

Při kolorektálním karcinomu může být zvětšená hladina karcinoembryonálního antigenu (CEA). Jeho přítomnost při nádoru není obligátní (senzitivita je jen 50-60%), proto se využívá především k monitorování pacientů po operaci. Jako vedlejší využívaný marker je CA 19-9. [30, 33]

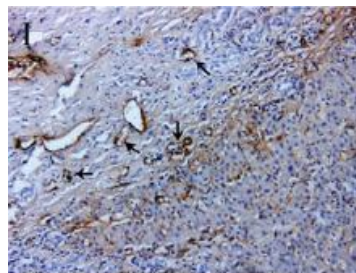
Autoři Takeuchi a spol. a Cohen a spol. ve svých pracích poukazují na využitelnost CTC jako prognostického markeru kolorektálního karcinomu. [60, 61] Je totiž známo, že u pacientů s kolorektálním karcinomem se prokázala přítomnost EpCAM v primárním nádoru, jenž koreloval s metastázemi v játrech, kůži, peritoneu a lymfatických uzlinách. [22] EpCAM je značně exprimován ve vysoce proliferativních buňkách střevního epitelu (výjimku tvoří apikální membrány směřující k lumenu). Vývoj adenomů je doprovázen zvýšeným projevem EpCAM a jeho nadměrná exprese (mAb GA733), téměř 100%, je často prokázána u kolorektálního karcinomu. [22, 24] O něco nižší expresi (80%)

vykazovaly velmi vzácně se vyskytující medulární karcinomy tlustého střeva. Ztráta EpCAM v léčbě kolorektálního karcinomu byla spojena s omezenou buněčnou adhezí, migračním potenciálem a vznikajícím tumorem. Nadměrná exprese EpCAM může tedy inhibovat přilnavost metastáz. [22]

5.3.4. Karcinom jater, žlučníku a žlučových



Obrázek 10:
Játra, žlučník, žlučovody [47]



Obrázek 11: Imunohistochemická analýza EpCAM, VEGF (vaskulární endoteliální růstový faktor), CD34 u HCC nádorů. Šipky značí pozitivní skvrny MVD. Zvětšení 200x. [41]

5.3.4.1. Hepatocelulární karcinom (HCC)

Je maligní nádor tvořený buňkami s hepatocelulární diferenciací. Metastázy nacházíme nejčastěji v plicích, v nadledvinách či v kostech. HCC představuje 90 % všech primárních maligních nádorů jater. Jejich velká regenerační schopnost zastírá klinickou symptomatologii až do pokročilejších stádií onemocnění. Nejvýznamnějším příznakem je jaterní cirhóza.

Nejčastěji se HCC vyskytuje ve věku 55-80 let. Ročně se ve světě diagnostikuje okolo 1 milionu nových případů. HCC se vyznačuje velkými geografickými rozdíly ve výskytu. Zatímco ve východní Asii je nejčastější příčinou úmrtí na malignitu, v Evropě a Severní Americe představuje 1 až 2,5 % všech malignit. v ČR bylo v roce 2009 nahlášeno 549 (10,65/100 000) nových onemocnění u mužů a 284 (5,31/100 000) u žen. I přes pokroky v diagnostice a léčbě je dosud diagnóza hepatocelulárního karcinomu spojena se špatnou prognózou a špatným přežitím. [30, 33, 44, 45]

Z laboratorních vyšetření pro karcinomy jater je na prvním místě α -fetoprotein (AFP), jehož senzitivita je kolem 60 %. Dalším onkomarkerem je des-gamma-carboxy protrombin, který odpovídá přítomnosti mikrovaskulárních trombóz. I když jeho specifita se blíží 100 % a senzitivita přesahuje 70 %, zatím nezískal v běžné praxi širší uplatnění. [30, 33]

EpCAM je exprimován v hepatocytech embryonálních jater a v dozrávajících jaterních buňkách. Zcela chybí v dospělých hepatocytech. *De novo* exprese EpCAM při regenerování nebo při množení hepatocytů se vysvětluje tím, že tyto kmenové buňky nahrazují poškozené buňky. Snížení mezibuněčné adheze E-kadherinu je nutné pro proliferaci. EpCAM exprese byla nejvýraznější u akutní a chronické hepatitidy. Bylo prokázáno, že všechny hepatocelulární karcinomy (HCCs), včetně pseudoalveolárního typu jsou na EpCAM negativní. Nemocná jaterní tkáň jeví silné známky EpCAM exprese (mAb 17-1A) v typickém epitelu a atypickém epitelu žlučových cest. [24]

Autor Xu a spol. ve své práci uvedl, že na základě nových technologických postupů a pozitivních výsledků z izolování CTC v periferní krvi u HCC, je v budoucnu možná využitelnost CTC jako prognostického markeru hepatocelulárního karcinomu. [75]

5.3.4.2. Karcinomy hepatobiliárního ústrojí

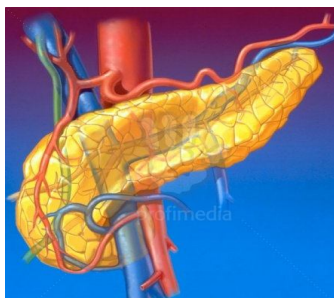
Dělíme je podle místa vzniku na karcinomy žlučníku, karcinomy žlučodů a karcinomy žlučových cest. Karcinomy žlučníku a žlučových cest patří mezi onemocnění se špatnou prognózou a jedinou kurativní léčbou je chirurgická resekce. [30, 33]

Hepatobiliární nádor je v euroamerickém regionu relativně vzácný, jeho incidence se pohybuje kolem 2-3/100 000 obyvatel. Nejčastějším nádorovým onemocněním hepatobiliárního systému je karcinom žlučníku, manifestuje se nejčastěji ve věku 70-80 let a častěji postihuje ženy. [30, 33, 44, 45]

Pro karcinomy hepatobiliárního ústrojí platí zvýšení aktivity obstrukčních enzymů (např. alkalické fosfatázy), to se může projevit i u anikterických pacientů. Karcinom žlučníku může provázet zvýšení karcioembryonálního antigenu (CEA) v séru a také nádorových markerů CA 19-9 a CA 50. [30, 33]

EpCAM značí buňky pluripotentní a progenitorové buněk žlučových cest a hepatocytů. [24] Téměř ve všech typech karcinomu žlučníku (cholengiokarcinom) se vyskytuje EpCAM. [22] Autoři Ustwani a spol. ve své práci poukazují na možnost využití CTC jako prognostického markeru karcinomů žlučníku a žlučodů, ovšem zároveň podotýká, že je nutná prospektivní validace na pacientech. v současné době vědci provádí prospektivní studie k zjištění výchozích hodnot a změn u CTC během chemoterapie, tím je pak možno u pacientů s karcinomy žlučníku určit optimální CTC cut-off v predikci klinických výsledků. [74]

5.3.5. *Karcinom pankreatu*



Obrázek 12: Pankreas [48]

Pankreas má funkci endokrinní a exokrinní. Jako karcinomy označujeme pouze nádory z exokrinního parenchymu, které tvoří 95% případů (z toho duktální karcinom asi 80 % případů). Endokrinní tumory slinivky představují asi 5%. Karcinom pankreatu bývá dlouho asymptomatický. Nejčastější příznaky jsou nespecifické například v podobě nechutenství spojené s odporem k masu a kovovou příchutí v ústech. Známkou již pokročilého nádoru je ascites. U pokročilých stavů se setkáváme s hmatnou metastatickou tzv. Virchowovou uzlinou. Prognóza nemocných s karcinomem pankreatu je špatná. Většina nemocných umírá v během prvního roku. [30, 32]

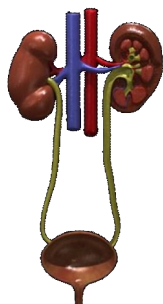
V ČR bylo v roce 2009 hlášeno celkem 1968 karcinomů pankreatu (18,73 /100 000). Incidence tohoto onemocnění má vzrůstající tendenci. Nejčastější výskyt je u osob ve věku 55-85 let. Mortalita na karcinom pankreatu je vzhledem ke špatné prognóze téměř identická s jeho incidencí. [30, 33, 44, 45]

Při diagnostickém laboratorním vyšetření onkomarkerů je typická elevace CEA a CA 19-9 se senzitivitou 67 %. CA 19-9 je prognosticky výhodnější u malých nádorů. Časná diagnostika karcinomu pankreatu pouze pomocí nádorových markerů není proto možná. [30, 32]

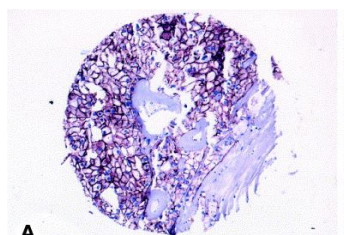
V karcinomu pankreatu se detekovala vysoká exprese EpCAM (<95%). [22] Největší proliferací index projevoval EpCAM v silně obarveném duktálním prostoru dospělého pankreatu. v každém buněčném prostoru koreluje frekvence proliferace buněk se zvýšenou expresí EpCAM (mAb KS1/4). Jeho největší exprese byla zaznamenána na hranici interkalárních duktálních buněk, v interlobulárních kanálcích a na hlavních žilních kanálcích. Langerhansovy ostrůvky vykazují podstatně menší intenzitu exprese EpCAM. v inzulinomu se detekovaly na tkáňových řezech imunohistochemicky zvýšené hladiny exprese EpCAM. [24]

Autoři Takeuchi a spol. a Mudan a spol. ve své práci uvedli, že CTC nejsou využitelné jako prognostický marker karcinomu pankreatu, protože CTC nebyly detekovány v periferní krvi. Hlavním důvodem je, že játra tyto nádorové buňky z krevního oběhu zachycují. [60, 63]

5.4. Karcinomy vylučovací soustavy



Obrázek 13: Močová soustava [49]



A
Obrázek 14: Pozitivní imunologické barvení EpCAM u chromofobních buněk renálního karcinomu [42]

5.4.1. Renální karcinom

Nejčastějším maligním nádorem ledvin je adenokarcinom (85% zhoubných nádorů ledvin) vznikající z buněk proximálních tubulů. Jeho nejčastějším příznakem je hematurie, bolest v bederní krajině a hmatný nádor. [30, 32]

Adenokarcinom ledviny tvoří zhruba 3 % maligních nádorů dospělé populace. Nádor lze detekovat ve všech věkových skupinách, s největším výskytem v 6-7. dekádě věku. Celosvětově ve vyspělých zemích incidence nádorů ledvin stoupá. v absolutních číslech

je ČR ve světě na prvním místě, aniž je znám důvod prvenství. Podle údajů SVOD bylo v ČR v roce 2009 hlášeno 1808 nově diagnostikovaných nádorů ledviny u mužů a 1028 u žen, incidence tak činila 26,99/100 000 obyvatel, mortalita 10,9/100 000 obyvatel. [30, 32, 44, 45]

Na nádor ledviny je nutno pomyslet u všech pacientů se zvýšenou sedimentací (nebo CRP) a subfebrilních nejasného původu. Zatím nejsou dostupné nádorové markery s dostatečnou senzitivitou a specifitou. [30, 32]

Pro diferenciální diagnostiku renálního karcinomu je možné použít EpCAM detekci. [22] Přesto projev EpCAM ve zdravých a nádorových ledvinách popisuje jen několik málo studií. Zdravé renální tubuly jsou obecně na EpCAM velmi pozitivní, zatímco jasné buňky karcinomu ukazují větší heterogenetickou strukturu. Pět z dvanácti případů byly pozitivní

na EpCAM (mAb Ber-EP4). [24]

Autoři Bluemke a spol. a Stenzl a spol. ve svých pracích poukazují na využitelnost CTC jako prognostického markeru renálního karcinomu. Ovšem pro přesnější identifikaci a charakterizaci cílových cirkulujících buněk u tohoto typu karcinomu jsou nutná další studia. [76, 77]

5.4.2. Karcinom močového měchýře a urotelu

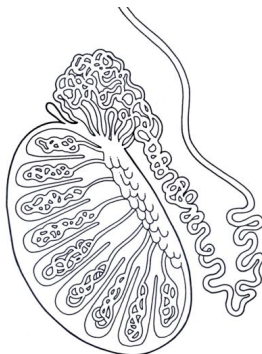
Nejčastějšími nádory močového měchýře jsou nádory z přechodného epitelu – urotelu. Většinou mívají charakter papilokarcinomů, jsou neostré a obtížně rozlišitelné. Vzácně se vyskytují maligní epitelové nádory – adenokarcinomy a uroteliální karcinom z přechodného epitelu, který je v ureterech, dutém systému ledvin a v části uretery. Příznaky jsou masivní hematurie, polakisurie, dysurie, renální insuficience a bolesti v bederní krajině. [30, 33]

Nádory močového měchýře představují v celosvětovém měřítku podle údajů WHO asi 3 % všech malignit a jsou čtvrtým nejčastěji se vyskytujícím nádorovým onemocněním. Postihují muže a ženy v poměru 2-3:1. Incidence (25/100 000 obyvatel) má v ČR stejně jako v dalších průmyslových zemích Evropy stoupající tendenci a choroba postihuje častěji mladší věkové skupiny. [30, 33, 44, 45]

Přímo v karcinomu močového měchýře s heterogenetickým projevem byla identifikována vysoká exprese EpCAM, která je spojena s celkově horší prognózou, než tumor na EpCAM negativní. Went a spol. zjistil, že výrazně vysokou expresi EpCAM má uroteliální karcinom PT-2 4, spíše než neinvazivní uroteliální karcinom. [22] Urotel, neboli přechodný epitel močového měchýře, je jen mírně pozitivní na EpCAM (mAb AUA1/FU-MK1). v dysplastických lézích urotelu a karcinomu z přechodných buněk se shledala zvýšená exprese EpCAM, i přes antigenní heterogenitu existující mezi nádory stejného stupně a v rámci toho samého nádoru. [24] Autoři Stenzl a spol. ve své práci uvádějí, že díky zavádění nových technologických postupů detekce CTC z plné krve lze použít CTC jako prognostický marker uroteliálního karcinomu a karcinomu močového měchýře. Stanovení počtu CTC je také vhodné ke sledování průběhu léčby. [77]

5.5. Karcinomy mužského pohlavního systému

5.5.1. Karcinom varlat



Obrázek 15: Schematicky znázorněné varle [50]

Nádory varlat vznikají v 95 % všech případů z transformované zárodečné (germinální) buňky, s dobrou kurativní prognózou i v pokročilejším stadiu. Varlata jsou u mužů nejčastější lokalizací zárodečných nádorů. Jejich nejčastějším příznakem je změna velikosti varlete. [30, 33]

V ČR bylo v roce 2009 hlášeno celkem 491 (9,52/100 000) nových případů. Jejich počet se signifikantně zvyšuje, za posledních 30 let více než dvojnásobně. Toto onemocnění postihuje hlavně bílou rasu. Nádory varlat představují asi 1,5-2 % všech malignit u mužů. v ČR byla v roce 2009 mortalita na nádory varlat 0,74/100 000 Nádory varlat jsou v 70 % diagnostikovány ve věkové skupině 20-40 let. [30, 33, 44, 45]

Nádorové markery jsou u germinálních nádorů vysoce senzitivní a specifické, jejich stanovení je významné nejen v primární diagnostice ale i v průběhu léčby a při pravidelných kontrolách po ukončení terapie. Jedná se o α -fetoprotein, β -choriogonadotropin, laktátdehydrogenázu. [30, 33]

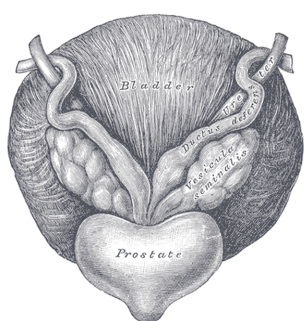
Ve tkáních mužského pohlavního ústrojí, odhalují některé buňky varlat expresi EpCAM pomocí protilátek HEA 125: spermatogonie vykazuje slabou expresi EpCAM, epididymis (řasinkové, bazální a kubické buňky) vykazuje střední expresi EpCAM a semenné vajíčky mají pozitivní expresi EpCAM.

Kommos a spol. došel k závěru, že kromě použití této protilátky, je možné imunohistochemické barvení EpCAM v testikulárních nádorech, které je užitečné v diferenciální diagnostice, kdy je obtížné morfologické rozlišování. Pomocí protilátky HEA 125 demonstrovali reaktivitu EpCAM v případech seminomu, embryonálního

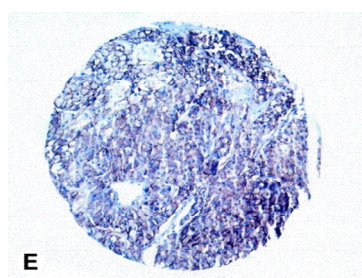
karcinomu, nádoru žloutkového vaku, teratomu, ovšem u nádoru nezralých granulózních buněk, nádoru Sertoliho buněk, primárního a metastatického karcinomu Leydigových buněk, choriokarcinomu, „sex cord“ gonadálních stromálních nádorů varlete byla reaktivita EpCAM negativní. [24]

Autor Fizazi a spol. ve své práci uvedl, že CTC z periferní krve u pacientů s karcinomem varlat lze izolovat pomocí aktivity telomerázy a tedy v budoucnu by byla možnost využití CTC jako prognostického markeru tohoto karcinomu. [78]

5.5.2. Karcinom prostaty



Obrázek 16: Prostata [51]



Obrázek 17: Pozitivní imunologické barvení EpCAM u hormonálně refrakterním karcinomu prostaty [42]

Jako karcinom prostaty bývá klinicky nejčastěji označován adenokarcinom prostaty s abnormálním nekoordinovaným růstem epiteliálních prostatických buněk se ztrátou jejich původní funkce a vyznačujícím se lokálně invazivním růstem a schopností zakládat vzdálené metastázy. Typickým znakem karcinomu prostaty je jeho hormonální (androgenní) dependence. Duktální adenokarcinom, acinózní adenokarcinom, karcinom z přechodného epitelu a další netypické nádory mají ještě nepříznivější prognózu,

ale jejich výskyt je velmi vzácný. Mezi celkové příznaky například patří anemie, únavnost, nechutenství, úbytek hmotnosti, febrilie, hyperkalcemie a diseminovaná intravaskulární koagulopatie. [30, 33]

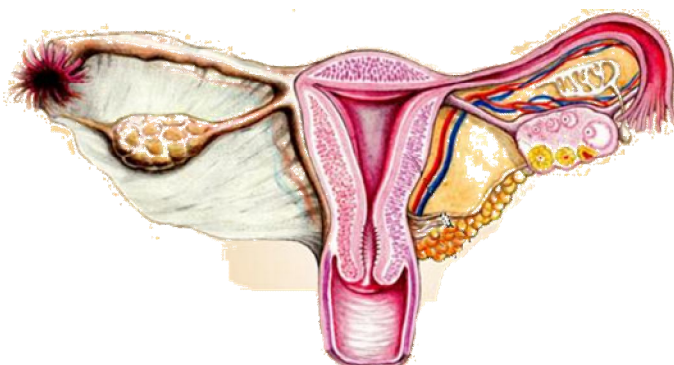
Zhoubné nádory prostaty jsou druhou nejčastější malignitou mužů (týká se především 50. roku). Karcinom prostaty lze označit jako nejzávažnější onkologické onemocnění mužské euroamerické populace konce 20. a začátku 21. století. v roce 2009 bylo v ČR hlášeno 6154 nových onemocnění karcinomem prostaty. [30, 33, 44, 45]

V současné době je jedním z nejužitečnějších onkologických markerů prostatický specifický antigen (PSA), využívající se jak v celoplošném screeningu, v diagnostice,

tak i monitoringu úspěšnosti léčby. Jde o marker orgánově specifický, nikoli nádorově. Jeho koncentrace koreluje s věkem pacienta a objemem prostaty. [30, 33] Pomoci by také měla detekce CTC, které autoři Okegawa a spol. a Scher a spol. ve svých pracích označují jako vhodný prognostického marker karcinomu prostaty. [69, 70]

Ve zdravé prostatě byla barvením zjištěna pozitivita EpCAM (mAb 323/A3). V benigním prostatickém epitelu byla prokázána nízká imunoreaktivita EpCAM (mAb 323/A3). U karcinomu prostaty byla identifikována silná exprese EpCAM (asi 90%), u acinárního adenokarcinomu prostaty, u hormonálně refrakterního adenokarcinomu prostaty byla exprese EpCAM ještě vyšší (více jak 98%), než u neléčených adenokarcinomů prostaty. Sekreční, bazální a duktální buňky prostaty vykazují střední expresi EpCAM s použitím protilátky HEA 125. Míra EpCAM positivity nekoreluje s klinickými důsledky pro pacienta. [22, 24]

5.6. Karcinomy gynekologické oblasti



Obrázek 18: Pohlavní soustava ženy [43]

Detekce nádorových buněk z výpotků od pacientek s diagnózou gynekologických nádorových onemocnění je založena na zkoumání jak morfologie, tak i fenotypu buněk. Mezi různými antigeny nádorových onemocnění hraje EpCAM ústřední roli při identifikaci primárního nádoru. Je však třeba brát v potaz, že peritoneální propírání, i když ne příliš často, může způsobit falešně pozitivní výsledky barvení EpCAM, jelikož normální tubulární epitelové buňky jsou EpCAM pozitivní. Proto je nutné, aby byly všechny vzorky pečlivě morfologicky hodnoceny. [22]

5.6.1. *Karcinom Ovarií*

Zhoubné novotvary vaječníků tvoří velmi heterogenní skupinu. Nádor může vzniknout z kteréhokoli typu buněk přítomného v ovariální tkáni. Asi 70-90% maligních nádorů ovarií se odvozuje od zárodečného epitelu povrchu ovarií, nazvaného tedy epiteliální nádory. Tento typ vyskytující se hlavně po 50. roce věku, se obecně nazývá karcinom ovaria. [30, 33]

Ovariální karcinom je druhým nejčastějším nádorem ženských pohlavních orgánů, je však na prvním místě v mortalitě. Jejich počet se za posledních 20 let signifikantně zvýšil. V roce 2009 byla incidence onemocnění 20,77/100 000 žen, v absolutních hodnotách 1111 žen, mortalita 13,16/100 000 žen, v absolutních hodnotách 704 žen. [30, 33, 44, 45]

V laboratorní diagnostice se využívají nádorové markéry, sledovat lze vzestup hodnot CA 125, AFP, hCG. [30, 33]

Ve zdravých ovariích, oocytech vykazuje adhezivní molekula EpCAM (Ab HEA 125) slabou expresi a folikulární epitelové buňky jsou zcela negativní. Ve vejcovodech, na buňkách řasinkového a neřasinkového epitelu, byla zaznamenána pouze nízká reaktivita. [24]

Zkoumáním projevu EpCAM u karcinomu ovarií se prokázala její stabilně vysoká exprese ve všech čtyřech podtypech ovariálního karcinomu a v různých fázích tohoto onemocnění (FIGO I – III, metastázy, ascites, rekurentní karcinom ovarií) a je totožná s primárním nádorem. Navíc zvýšená exprese EpCAM u ovariálního karcinomu byla shledána hlavně v pokročilejších stádiích nemoci. [22] Negativita na EpCAM se naopak potvrdila v metastazujících ovariálních karcinomech a v nádorech zárodečných buněk. Pomocí protilátek AUA1 a Ber-EP4 se prokázalo, že vzácné karcinomy jasných buněk (clear cell) ovarií exprimují EpCAM. Cherchi a spol. prokázali za pomoci mAb Ber-EP4 v ovariálním karcinomu 50% EpCAM reaktivitu v serózním typu a 79% EpCAM reaktivitu v mucinózním typu. [24]

Autoři Fan a spol. a Aktas a spol. ve svých pracích uvedli, že CTC mohou být detekovány ve většině epitelových ovariálních nádorů a mohou pomoci lépe predikovat prognózu onemocnění. [79, 80]

5.6.2. **Karcinomy endometria**

V děložním těle dochází poměrně často k malignímu bujení, které je reprezentováno karcinomem endometria (přibližně 98 %). [30, 33]

Karcinom endometria je nyní nejčastěji se vyskytujícím nádorem ženského genitálního ústrojí a jeho četnost se dále zvyšuje. Incidence v ČR byla v roce 2006 33,1/100 000 žen. Příznivým trendem je nízká mortalita této nemoci (6,7/100 000 v roce 2004). [30, 44, 45]

Při adenokarcinomu endometria může být zvýšená hladina CA 125, ovšem jeho zvýšení v tomto případě není obligátní. Proto CA 125 lze využít při monitoringu léčby a postterapeutické kontrole, nikoli k primárnímu stanovení nemoci. [30, 33]

V karcinomu endometria se projevila intenzivní až silná tvorba EpCAM, a to z 88 % až 100 % [22]

5.6.3. **Karcinom děložního hrdla**

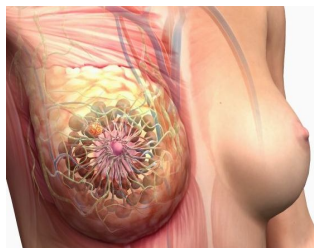
Karcinom děložního hrdla je epitelový nádorový proces vycházející z oblasti povrchového a cylindrického epitelu hrdla. Vzniku onemocnění předchází období vývoje dysplastických změn označovaných jako cervikální intraepiteliální neoplazie (CIN I-III). Za nejdůležitější etiologický faktor se v současnosti považuje infekce humánním papilomavirem (HPV). Výsledky léčby pokročilých invazivních karcinomů nejsou příliš optimistické, proto je nutno klást důraz na prevenci a časný záchyt onemocnění. [30, 33]

Karcinom děložního hrdla představuje třetí nejčastější gynekologickou malignitu žen. Mortalita na tuto chorobu klesá, díky zvyšujícímu se procentu časných záchytů. V ČR v roce 2009 byl celkový počet žen zemřelých na toto onemocnění 366, incidence byla 19,16/100 000 žen. [30, 33, 44, 45]

Základním markerem pro cervikální karcinom je antigen *squamous cell carcinoma* SCC. Význam markerů pro primární diagnostiku onemocnění nebyl prokázán. [30, 33]

Normální, maturující dlaždicový epitel děložního čípku neexprimuje EpCAM (mAb 323/A3). Zato byl EpCAM prokázán pomocí mAb Ki67 v CIN ve všech stupních. Exprese EpCAM je adekvátní k vysoké proliferační aktivitě nediferencovaných buňkách jednotlivých stupňů CIN. Silná exprese EpCAM byla zaznamenána u většiny cervikálních dlaždicových karcinomů a adenokarcinomů. [24]

5.6.4. *Karcinom prsu*



Obrázek 19: Karcinom prsu [52]

Termínem karcinom prsu jsou označovány různé histologické formy maligních nádorů vznikajících z epitelálních buněk mléčné žlázy. Jednotlivé typy se liší klinickým a radiologickým nálezem, biologickými vlastnostmi a aktivitou. Ovšem, mají společné to, že infiltrují maligními buňkami prsní žlázu, mají schopnost invaze do okolních struktur a tvorby vzdálených metastáz. Výskyt metastáz svědčí o horší prognóze přežití. [30, 33]

Karcinom prsu je nejčastějším zhoubným onemocněním u žen. Tvoří téměř 20 % ze všech maligních onemocnění žen. Růst incidence zhoubných nádorů prsu se týká převážně věkových skupin žen nad 50 let. Mortalita v posledních letech mírně klesá. V ČR bylo v roce 2009 hlášeno 5975 nových onemocnění (111,69/100 000) u žen a zemřelo 2126 žen v důsledku karcinomu prsu. [30, 33, 44, 45]

Mezi nejčastěji sledované onkomarkery patří karcinoembryonální antigen (CEA) a CA 15-3. CEA se vyskytuje ve 40-50% případů s přítomností vzdálených metastáz. Marker CA 15-3 může být zvýšený i v případě lokálního onemocnění. [30, 33]

V normální lidské prsní žláze je EpCAM exprimován v lumenálním epitelu. Cortney a spol provedli imunohistologické barvení za pomoci mAb 323/A3 benigního nádoru prsu, které bylo negativní, zatímco v biopsii karcinomu prsu se EpCAM prokázal v pěti případech ze sedmi. Pomocí mAb 17-1A imunohistochemické studie biopsií prsů ukázaly, že EpCAM se exprimoval ve většině karcinomů, zejména na parafinových bločcích. [24] Vysoká exprese byla popsána v primárním nádoru prsu (98%). Went a spol. rozlišili, že zvýšená tvorba EpCAM je v duktálním karcinomu prsu (81%) oproti lobulárnímu karcinomu prsu (45%). v některých typech nádorů byla exprese EpCAM spojena s pokročilým stádiem nemoci, a tak se prokázala souvislost s celkově horší prognózou. [22] Spizzo a jeho kolegové uvedli, že detekce pomocí mAb ESA prokázala zvýšenou expresi EpCAM u invazivního karcinomu prsu. Exprese EpCAM jednoznačně koreluje

s chorobou a celkovým přežitím nezávisle na velikosti nádoru, nodálním stavu, stupni vyjádření histologických a hormonálních receptorů. [24]

Autoři Botteri a spol., Pierga a spol. a Cristofanilli a spol. ve svých pracích poukazují na využitelnost CTC jako prognostického markeru karcinomu prsu. Detekovaný počet CTC v plné krvi je měřítkem objemu tumoru a jeho biologických funkcí. [67, 68, 69]

5.7. Karcinom plic



Obrázek 20: Karcinom plic [53]

Termínem bronchogenní karcinomy se označují jak nádory průdušek, tak nádory vznikající v plicním parenchymu. Jejich klinický obraz je velmi podobný, a proto je nelze od sebe přesně oddělit. v anglické literatuře se označují termínem *lung cancer*.

Bronchogenní karcinomy se dělí na malobuněčné (25-30%), v anglické literatuře *small cell lung cancer* (SCLC), jež jsou rychle rostoucí, časně metastazující do kostí, jater, centrálního nervového systému, nadledvin; a nemalobuněčné (70-75%), v anglické literatuře *non-small cell lung cancer* (NSCLC), rostoucí pomaleji, s pozdějším nástupem metastazování. [30]

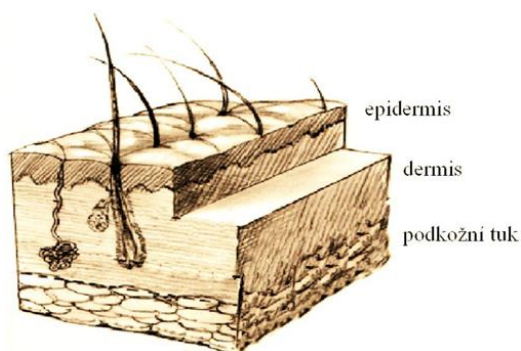
Bronchogenní karcinom bývá obvykle diagnostikován ve věku 35-85 let. Podle SVOD z roku 2005 v ČR se u mužů s incidencí 93/100 000 karcinom plic stal nejčastější příčinou úmrtí ze zhoubných nádorů. U žen s incidencí 31,34/100 000 se tento karcinom dostal na 3. místo. Tyto hodnoty přibližně odpovídají i současné době. [30, 33, 44, 45]

Jednotlivé histologické typy nádorů plic vykazují různou expresi nádorových markerů. Nejvyšší senzitivitu SCLC dosahuje neurospecifická enoláza (NSE), pro NSCLC je vhodná především CYFRA 21-1 (fragment cytokeratinu 19). Z dalších tumormarkerů jsou vhodné: SCCA pro epidermoidní tumory, CEA pro adenokarcinomy, nověji je zaváděn

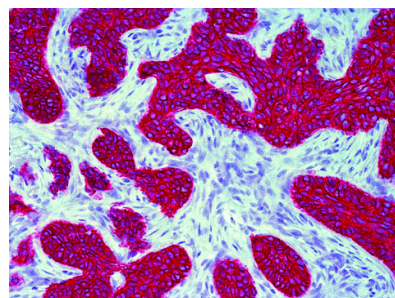
ProGRP (Progastrin-releasing peptid) pro SCLC, Chromogranin A a CA 125 jsou využívány méně často. Sérové nádorové markery jsou využívány především pro monitorování průběhu onemocnění a hodnocení odpovědi na léčbu. [34]

Zdravá plicní tkáň, řasinkový bronchiální epitel, alveolární kanálky a alveolární epitelové buňky I. a II. typu vykazují nízkou expresi EpCAM molekuly. [24] U bronchogenního karcinomu byla naopak zaznamenána vysoká tvorba EpCAM (asi 95%), podobně tomu je i při hyperplazii, dysplazii a plicní fibróze. Velkobuněčný karcinom a SCLC mají jen o něco nižší expresi EpCAM (83-85%) než adenokarcinom plic. [22, 24] EpCAM exprese dobře koreluje s diferenciací SCLC, s jeho velikostí a lokalizací, a zároveň rozlišuje, zda se jedná o metastázy z lymfatických uzlin a zda o primární nádor. Mezoteliom, na rozdíl od SCLC, EpCAM neexprimuje, to lze dokázat pomocí protilátky MOC31. Ber-EP4 protilátka byla použita u pacientů po resekci malobuněčných karcinomů plic k detekci malých buněčných nádorových deposit v regionálních lymfatických uzlinách. [24] Mimo jiné také proto autoři Maheswaran a spol., Hou a spol. a Krebs a spol. ve svých pracích poukazují na využitelnost CTC jako prognostického markeru u bronchogenního karcinomu. [64, 65, 66]

5.8. Kožní nádory



Obrázek 18:
Základní anatomická stavba kůže [54]



Obrázek 21: Imunohistochemická detekce EpCAM molekuly za pomoci Ber-EP4 protilátky. Buňky parenchymatózního nádoru karcinomu perianálních bazálních buněk EpCAM vysoce exprimovaly (zvětšení 400x). [28]

Kožní nádory jsou nejčastější nádory vůbec. Mnoho z nich patří k benigním, neohrožujícím celkové zdraví a ani život nemocného. Maligní nádory rostou rychle, mají sklon k exulceraci, někdy krvácejí, metastazují. Mikroskopická stavba jeví výrazné atypie od mateřské tkáně s četnými mitózami. Nejčastějšími maligními kožními nádory jsou

bazocelulární a spinocelulární karcinom. Zvláštní skupinu z kožních nádorů pak tvoří maligní melanom. Jedná se o neuroektodermální nádor, vycházející z melanocytů, jež může vzniknout v kterékoli tkáni. Ovšem v naprosté většině případů se však vyskytuje na kůži. Metastazuje do lymfatických uzlin bez nálezu primárního ložiska na kůži. [30, 33]

Podle údajů ze SVOD bylo v ČR v roce 2005 hlášeno celkem 16675 (163,2/100 000) případů. Jejich počet se oproti předchozím rokům signifikantně zvýšil. Konkrétně maligní melanom se v současné době považuje za jeden z nádorů s nejrychlejším vzestupem incidence a jedná se zejména o bělošskou populaci. [30, 33, 44, 45]

Z laboratorních vyšetření v séru může mít určitý prognostický význam zvýšení hladiny laktátdehydrogenázy či nárůst hladiny některého ze sledovaných markerů (S-100 protein, tyrozináza, MART-1, MELAN-A, MAGE, MIA, NSE a další). [36] Zde by detekce CTC mohla být značným přínosem pro prognostiku metastazujícího melanomu kůže, jak deklarují ve svých pracích autoři Koyanagy a spol. a Reynolds a spol. [71, 72]

Co se týče exprese EpCAM a kůže - v kůži, keratinocytech a melanocytech je EpCAM negativní, ovšem potní žlázy (ekrinní a apokrinní žlázy a apokrinní kanálky) a proliferativní oblast vlasového folikulu jsou EpCAM pozitivní. Kožní nádory vykazují aktivitu adhezivní molekuly EpCAM (mAb Ber-EP4) u bazálního karcinomu (BCC), karcinomu Merkelových buněk a u smíšeného nádoru kůže (chondroidní syringomyelie) a právě pomocí mAb Ber-EP4 je možné BCC karcinom identifikovat a rozlišit tak i jemu velmi podobný perianální karcinom. U SCC, dlaždicového interepiteliálního neoplazii a aktinické keratózy je EpCAM negativní. [24, 28]

5.9. Minimální reziduální onemocnění MRD

Význam detekce minimální zbytkové choroby v současnosti stoupá se zaváděním nových léčebných postupů. Minimální zbytkovou chorobu autoři definovali jako přítomnost nádorových buněk v období kompletní klinické remise. Jde tedy o množství nádorových buněk, které nelze prokázat konvenčními metodami. Mluví se o ní zpravidla v průběhu nebo po ukončení protinádorové léčby. [25] Podle doporučení UICC (Unie pro mezinárodní kontrolu rakoviny) musíme jednoznačně rozlišovat mikrometastázy ($\leq 0,2$ cm největší průměr) od izolovaných (diseminovaných nebo cirkulujících) nádorových buněk. Mikrometastázy jsou diagnostikovány výhradně histologickým vyšetřením a podle lokalizace označeny dodatkem „mi“ – např. pN (mi), pM1 (mi). [32]

Podstatou diagnózy minimální zbytkové nemoci je průkaz specifické odlišnosti mezi nádorovými a zdravými buňkami. Tento rozdíl je nutné zjistit v době záhytu onemocnění, kdy je pro všechny vyšetření k dispozici dostatek nádorových buněk. Proto je nutné provést co nejpodrobnější imunologické, cytogenetické a molekulárně biologické vyšetření nádoru, i když zdánlivě nepřinese nic nového ke zpřesnění diagnózy, ale může zachytit například chromozomální aberaci nebo aberantní expresi antigenu. Poté, v době remise je snaha o průkaz tohoto rozdílu vysoce senzitivními a specifickými metodami jako jsou molekulární biologické a imunologické metody. [25]

K detekci minimální reziduální choroby u solidních tumorů lze použít několika metodických postupů, které se liší svojí specificitou, nákladností, pracností ale hlavně svou sensitivitou. Nejcitlivější je metoda založená na principu reverzně-transkriptázové polymerázové řetězové reakce v reálném čase, tzv. real-time RT-PCR, která je vhodná

pro stanovení nádorových buněk epiteliálního původu, jako je EpCAM nebo jeho znaků v kompartmentech mesenchymálního původu tj. v kostní dřeni, krvi a v lymfatickém systému. [26]

Ovšem dosud není jednotný názor na to, jak se zachovat u prokázaného minimálního reziduálního onemocnění a zda ho léčit. Je však jasné, že jen nepatrné malé množství nádorových buněk může dát vznik relapsu. [25]

Přehled exprese EpCAM v lidských karcinomech			
Orgány	EpCAM pozitivita (%)	Orgány	EpCAM pozitivita (%)
Močový měchýř, urotheliální buňka CA in situ (CIS)	100	Žaludek, (adeno-)CA	97,5
Močový měchýř, urotheliální CA (pT – 2 4)	52	Ledviny, chromofóbní CA	93
Močový měchýř, urotheliální CA (pTa)	36	Ledviny, CA jasných buněk	21
Prsa, primární nádor	98	Ledviny, onkocytom	30
Prsa, metastáze	100	Ledviny, papilární CA	69
Prsa, ductální CA	81	Plíce, aCA	94,7
Prsa, lobulární CA	45	Plíce, adenoskvamózní CA	54,6
		Plíce, bronchioalveolární CA	96,7
Tlusté střevo, medulární CA	99,7	Plíce, CA velkých buněk	84,9
Tlusté střevo, mucinózní CA	80	Plíce, neuroendokrinní CA	83,9
Tlusté střevo, prstenové CA (signet-ring cell)	100	Plíce, spinocelulární CA	82,7
Endometrium, endometrický CA	96	Ovaria, aCA	100
Endometrium, serózní CA	91	Ovaria, Brenner nádor	67
Jícen, aCA	100	Ovaria, endometrický CA	88
Jícen, SCC	86	Ovaria, mucinózní CA	100
Estezioneuroblastom	100	Ovaria, serózní CA	100
Žlučník, aCA	100	Karcinom prostaty	> 98
Hepatocelulární aCA	15	Děložní čípek, SCC	67
Pankreas, aCA	96		
Tenké střevo, aCA	100		

Zkratky: CA – karcinom, aCA – adenokarcinom, SCC – spinocelulární karcinom [22]

Expresse EpCAM ve tkáni zdravé anebo dysplastické a v karcinomu (CA)			
Epitel (druhy)	Expresse EpCAM		
	Normální tkáň	Premaligní tkáň	Karcinom
<i>Sliznice dutiny ústní</i>	(-)	Dysplazie (+++)	(+++)
<i>Dlaždicový epitel hlasivek</i>	(+++)	Dysplazie (+++)	(+++)
<i>Jícen</i>	Cylindrické bb (-)	Metaplazie BE (+++)	
<i>Žaludek</i>	Dlaždicový epitel (-), V kryptách (+++)		V kryptách (+++)
<i>Tlusté střevo</i>	(-), mukóza (+++)	Adenomy ↑	↑ Kolorektální CA
<i>Játra</i>	(-), regenerační/ proliferační bb (+++)	(+++)	CHC (+++), HCC (-)
<i>Pankreas</i>	(+++)		↑
<i>Ledviny</i>	(+++)		Heterogenní CA jasných bb
<i>Močový měchýř</i>	(+++)		↑
<i>Varlata</i>	(+++)		(+++)
<i>Prostata</i>	(+++)		↑
<i>Prsní žláza</i>	(+++)		↑
<i>Vaječníky</i>	(+)		(+++) (↑serózní a mucinózní)
<i>Děložní čípek</i>	(-)	Dysplazie: (+++)	
<i>Plíce</i>	(+)		SCC (+++) Mezotel (-) Metastatické lymfatické uzliny z NSCLC (+++)
<i>Kůže</i>	Dlaždicový epitel (-) Potní žlásky/ proliferační dlaždicové bb (+++)		BCC (+++) Bazodlaždicové epitel (+++) SCC (-)

*Výsvětlivky: (+++) silně pozitivní; (+) slabě pozitivní; (-) negativní; ↑ zvýšení;
bb – buňky; BE – Barrettův jícen; CA – karcinom; BCC – bazální buňky karcinomu; HCC – hepatocelulární karcinom; CHC – chronická hepatitida; SCC – spinocelulární karcinom; NSCLC – nemalobuněčný karcinom plic [24]*

6. Závěr

Podstatou bakalářské práce bylo zpracování údajů týkajících se vzájemné souvislosti EpCAM molekuly s detekcí CTC a jejich vztahu k jednotlivým nádorovým onemocněním. Zároveň jsou v této rešerši zpracované metody ke stanovení CTC a povrchové molekuly EpCAM (histologie a imunohistochemie, cytometrické metody, EPISPOT, PCR, FISH, CellSearch Systém, AdnaTest BreastCancerSelect, mikrofluidní čipy).

Shromážděné informace poukazují, že EpCAM je stabilní antigen a jeho exprese v ascitu, metastázích a rekurentních nemocích v nemnohých případech často koreluje s nádorovými buňkami odpovídajícího karcinomu (tj. například ovariální nebo kolorektální karcinom). EpCAM se také hojně vyskytuje v membránách kmenových nádorových buněk, proto může být ideálním kandidátem nádorového antigenu pro záchyt a následnou detekci cirkulujících a metastázových nádorových buněk pomocí mikročipové technologie. Techniky pro imunohistochemické EpCAM detekce včetně cytologie a protilátkových panelů dosáhly velmi vysoké citlivosti a tak mohou být zařazeny do běžných postupů. [22] EpCAM je vhodný prognostický marker nádorových onemocnění, slouží například k určení stádia onemocnění pacienta a ke sledování účinků terapie.

EpCAM molekula byla prokázána v histologických preparátech řady nádorových onemocnění, jako jsou kolorektální karcinom, karcinom jícnu (adenokarcinom), žaludku, pankreatu, ledvin, močového měchýře a urotelu, prostaty, prsu, ovarií (mimo nádor zárodečných buněk), endometria, děložního hrdla, oblasti hlavy a krku, estenzineuroblastom, cholangiokarcinom, bronchogenní karcinom, melanom. Heterogenitu pak vykazoval karcinom varlat a EpCAM zcela negativní byl hepatocelulární karcinom.

Detekce CTC se ukázala být vhodným prognostickým markerem vyskytujícím se v krvi pacientů s nádorovým onemocněním. Jedná se zejména o karcinom prostaty, ovarií, prsu, jícnu, žaludku, kolorekta, ledvin, močového měchýře a urotelu, bronchogenní karcinom, melanom. U nádorů karcinomu hlavy a krku, hepatocelulárního karcinomu, cholangiokarcinomu a karcinomu varlat jsou CTC a jejich prognostický potenciál cílem výzkumu řady vědeckých skupin. Naproti tomu u estenzineuroblastomu a karcinomu pankreatu se detekce CTC neosvědčila, proto jsou zde voleny jiné diagnostické postupy.

7. Seznam použité literatury

- [1] Dostupné z: <http://www.cancer.org/Cancer/CancerBasics/TheHistoryofCancer/the-history-of-cancer-what-is-cancer> [cit. 2012-03-01].
- [2] VOKURKA M. *Velký lékařský slovník*. 5. aktualiz. vyd. Praha: Maxdorf, c2005, xv, 1001 s. ISBN 80-734-5058-5. 2004-2012.
- [3] MAVROUDIS D. Circulating cancer cells. *Annals of Oncology*. 2010-10-12, roč. 21, Supplement 7, s. 95-100.
- [4] Dostupné z: <http://www.epcam-symposium.de/welcome.htm> [cit 2012-03-01].
- [5] Dostupné z: <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/TACSTD1ID42459ch2p21.html> [cit. 2012-06-14].
- [6] Dostupné z: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=Graphics&list_uids=4072 [cit. 2012-03-01].
- [7] Dostupné z: http://vega.sanger.ac.uk/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=OTTHUMG00000128853;r=2:47572297-47614740;t=OTTHUMT00000250792 [cit. 2012-03-01].
- [8] Dostupné z: http://vega.sanger.ac.uk/Homo_sapiens/Location/View?db=core;g=OTTHUMG00000128853;r=2:47572297-7614740;t=OTTHUMT00000250792 [cit. 2012-03-01].
- [9] SEDLÁČEK J. a VYZULA R. Molekulární detekce volných nádorových buněk a mikrometastáz u karcinomu prsu a kolorekta pomocí RT-PCR specifické pro cytokeratiny 19 a 20. *Klinická onkologie: časopis České a Slovenské onkologické společnosti*. 2003, roč. 16, č. 5, s. 211-218.
- [10] WHARTON, R. Q., JONAS S., GLOVER C., et al. Increased Detection of Circulating Tumor Cells in the Blood of Colorectal Carcinoma Patients Using Two Reverse Transcription-PCR Assays and Multiple Blood Samples. *Clinical cancer research*. 1999, č. 5, s. 4158-63.
- [11] Dostupné z: <http://www.lfhk.cuni.cz/farmakol/interakce/micuda/mRNA.htm> [cit. 2012-03-01].
- [12] DUDOVÁ S. a HÁJEK R. Využití metody real-time PCR vybraných genů u mnohočetného myelomu. *Klinická onkologie: časopis České a Slovenské onkologické společnosti*. 2008, roč. 21, č. 1, s. 227-9.

- [13] Dostupné z: http://www.cskb.cz/res/file/doporuceni/TM/TM_dopor.pdf
[cit. 2012-03-01].
- [14] MARINOV I. *Průtoková cytometrie v klinické hematologii*. 2., přeprac. a rozš. vyd. Praha: Triton, 2008, 148 s. ISBN 978-80-7387-143-7.
- [15] Dostupné z: <http://www.library.sk/ar1-cav/epca/laserova-skenovaci-cytometrie-moznosti-a-vyuziti-v-imunologii> [cit. 2012-03-01].
- [16] JAROŠOVÁ M., POSPÍŠILOVÁ H., PLACHÝ R., a spol. Určování nebalancovaných genových změn metodou array komparativní genomové hybridizace (array CGH) u nádorů. *Klinická onkologie: časopis České a Slovenské onkologické společnosti*. 2006, roč. 19, č. 2, s. 342-6.
- [17] ZHE X., CHER M. and BONFIL R. Circulating tumor cells: finding the needle in the haystack. *Am J Cancer Res*. 2011, roč. 1, č. 6, s. 740-751.
- [18] REIFFERS J., GOLDMAN J. and ARMITAGE J. *Blood stem cell transplantation*. St. Louis: Mosby, 1998, s. 190.
- [19] PATERLINI-BRECHOT P. and BENALI N.. Circulating tumor cells (CTC) detection: Clinical impact and future directions. *Cancer Letters*. 2007, roč. 253, č. 2, s. 180-204.
- [20] MUNZ M., BAEUERLE P. and GIRES O. The Emerging Role of EpCAM in Cancer and Stem Cell Signaling. *Cancer Research*. 2009-07-15, roč. 69, č. 14, s. 5627-5629.
- [21] *The 14th international conference on miniaturized systems for chemistry and life sciences: the proceedings of microtas 2010 conference*. San Diego, CA: Chemical, 2010, s. 785-787. ISBN 9780979806438.
- [22] PATRIARCA C., MACCHI R., MARSCHNER A., et al. Epithelial cell adhesion molecule expression (CD326) in cancer: a short review. *Cancer Treatment Reviews*. 2012, roč. 38, č. 1, s. 68-75.
- [23] FEHM T., SOLOMAYER E., MENG S., et al. Methods for isolating circulating epithelial cells and criteria for their classification as carcinoma cells. *Cytotherapy*. 2005, roč. 7, č. 2, s. 171-185.
- [24] WINTER M., NAGTEGAAL I., KRIEKEN J., et al. The Epithelial Cell Adhesion Molecule (Ep-CAM) as a Morphoregulatory Molecule Is a Tool in Surgical Pathology. *Am J Pathol*. 2003, roč. 163, č. 6, s. 2139-48.

- [25] ECKSCHLAGER T. a PRŮŠA R. *Laboratorní vyšetření v onkologii*. 1. vyd. Praha: Triton, 2002, s. 240-245. ISBN 80-7254-186-2.
- [26] Dostupné z: <http://lem.ocol.cz/cs/info/minimalni-rezidualni-choroba> [cit. 2012-03-13].
- [27] DULGUEROV P., ALLAL A. and CALCATERRA T. Esthesioneuroblastoma: a meta-analysis and review. *The Lancet Oncology*. 2001, roč. 2, č. 11, s. 683-690.
- [28] KREUTER A., BECHARA F., STÜCKER M., et al. Perianal basal cell carcinoma - unusual localization of a frequent tumor. *JDDG:Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*. 2012, roč. 10, č. 1, s. 59-61.
- [29] HASE T., SATO M., YOSHIDA K., et al. Pivotal role of epithelial cell adhesion molecule in the survival of lung cancer cells. *Cancer science*. 2011, roč. 102, č. 8, s. 1493-1500.
- [30] ADAM Z., KREJČÍ M. a VORLÍČEK J. *Speciální onkologie: příznaky, diagnostika a léčba maligních chorob*. 1. vyd. Praha: Galén, 2010. ISBN 978-80-7262-648-9.
- [31] URBANOVÁ M. Varovné příznaky v ORL oblasti – příznaky onkologických onemocnění. *Zdravotnické noviny:Lékařské listy*. 2010, č. 3, s. 3-7.
- [32] BECKER H. *Chirurgická onkologie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2005, s. 27 ISBN 80-247-0720-9.
- [33] ADAM Z., VORLÍČEK J. a VANÍČEK J. *Diagnostické a léčebné postupy u maligních chorob*. 1. vyd. Praha: Grada, 2002, 604 s. ISBN 80-716-9792-3.
- [34] ŠIMÍČKOVÁ M. a NEKULOVÁ M. Využití tumorových markerů v diagnostice a terapii karcinomů plic. In: *Labor Aktuell: časopis pro klienty Roche Diagnostics v České a Slovenské republice*. 2005.
- [35] NEKULOVÁ M., ŠIMÍČKOVÁ M. a VALÍK D. Nádorové markery a epigenetické faktory. *Klinická biochemie a metabolismus: časopis České společnosti klinické biochemie*. 2006, 14 (35), č. 3, 152–156.
- [36] FIKRLE T. and PIZINGER K. Maligní melanom. *Onkologie*. 2010, č. 4, s. 225-228.
- [37] Dostupné z: <http://www.rakovinahlavvyakrku.cz/> [cit. 2012-04-08].
- [38] KIMURA H., KATO H., FARIED A., et al. Prognostic significance of EpCAM expression in human esophageal cancer. *International journal of oncology*. 2007, roč. 30, č. 1, s. 171-179.

- [39] WENT P., VASEI M, BUBENDORF L., et al. Frequent high-level expression of the immunotherapeutic target Ep-CAM in colon, stomach, prostate and lung cancers. *British Journal of Cancer*. 2006-01-16, roč. 94, č. 1, s. 128-135.
- [40] WENQI D., LI W., SHANSHAN C., et al. EpCAM is overexpressed in gastric cancer and its downregulation suppresses proliferation of gastric cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2009, roč. 135, č. 9, s. 1277-1285.
- [41] SHAN Y. -f., HUANG Y. -l., XIE Y. -k., et al. Angiogenesis and clinicopathologic characteristics in different hepatocellular carcinoma subtypes defined by EpCAM and α -fetoprotein expression status. *Medical Oncology*. 2011, roč. 28, č. 4, s. 1012-1016.
- [42] WENT P., LUGLI A., MEIER S., et al. Frequent *EpCam* protein expression in human carcinomas. *Human Pathology*. 2004, roč. 35, č. 1, s. 122-128.
- [43] Dostupné z: <http://galenus.cz/rozmnozovani-pohlavi-zena.php> [cit. 2012-04-10].
- [44] DUŠEK L., MUŽÍK J., KUBÁSEK M., a spol. Epidemiologie zhoubných nádor v České republice. *Masarykova univerzita*. 2005. Verze 7.0 [2007], ISSN 1802 – 8861.
- [45] DUŠEK L. *Czech cancer care in numbers 2008-2009*. 1st ed. Prague: Grada, 2009 ISBN 978-80-247-3244-2.
- [46] Dostupné z: <http://www.anatomie-online.com/Seiten/archiv003.html> [cit. 2012-04-30].
- [47] Dostupné z: http://www.sciencephoto.com/image/127033/530wm/C0063918-Liver,_drawing-SPL.jpg [cit. 2012-05-04].
- [48] Dostupné z: <http://www.profiimedia.cz/fotografie/obrazek-ukazuje-slinivky-brisni-aorty-tepny-vynikajici/0005943066/> [cit. 2012-05-04].
- [49] Dostupné z: <http://www.turbosquid.com/FullPreview/Index.cfm/ID/362776> [cit. 2012-05-04].
- [50] Dostupné z: http://msjensen.cehd.umn.edu/webanatomy_archive/Images/Reproductive/testis2.gif [cit. 2012-05-04].
- [51] GRAY H. *Anatomy of the human body*. 20th ed. New York: Bartleby.com, 2000, s. 1160. ISBN 1587341026. 2004-2012.
- [52] BRISEÑO C. Mediziner rütteln an Brustkrebs-Dogma. *Der Spiegel: das deutsche Nachrichten-Magazin*. Hamburg: SPIEGEL-Verlag, 2011, č. 7.
- [53] Dostupné z: <http://www.thegeminigeek.com/wp-content/uploads/2009/06/lung-cancer.jpg> [cit. 2012-05-04].

- [54] Dostupné z: http://www.liposukce.cz/editor/image/stranky3_galerie/obrazek_57.jpg
[cit. 2012-05-04].
- [55] Dostupné z: http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/mobileimages/topics/largeintestine_lafs.png [cit. 2012-05-04].
- [56] Dostupné z: http://cancer.scripps.edu/biology_ctc.aspx [cit. 2012-05-17].
- [57] ŠMARDA J. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005, 188 s. ISBN 80-210-3841-1.
- [58] ROSS J. and SLODKOWSKA E. Circulating and Disseminated Tumor Cells in the Management of Breast Cancer. *American Journal of Clinical Pathology*. 2009-07-15, roč. 132, č. 2, s. 237-245.
- [59] CHEN J., LI J. and SUN Y. Microfluidic approaches for cancer cell detection, characterization, and separation. *Lab on a Chip*. 2012, roč. 12, č. 10, s. 1753-1767.
- [60] TAKEUCHI H. and KITAGAWA Y. Circulating tumor cells in gastrointestinal cancer. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences*. 2010, roč. 17, č. 5, s. 577-582.
- [61] COHEN S., PUNT C., IANNOTTI N., et al. Relationship of Circulating Tumor Cells to Tumor Response, Progression-Free Survival, and Overall Survival in Patients With Metastatic Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2008-05-12, roč. 26, č. 19, s. 3213-3221.
- [62] CAO W., YANG W., LI H., et al. Using detection of survivin-expressing circulating tumor cells in peripheral blood to predict tumor recurrence following curative resection of gastric cancer. *Journal of Surgical Oncology*. 2011, roč. 103, č. 2, s. 110-115.
- [63] MUDAN S., GIAKOUSTIDIS A., THILLAINAYAGAM A., et al. Clinical utility of circulating tumor cell measurement in the diagnosis of *indeterminate* lesions of the pancreas. *Future Oncology*. 2010, roč. 6, č. 1, s. 177-179.
- [64] O'FLAHERTY J., GRAY S., RICHARD D., et al. Circulating tumour cells, their role in metastasis and their clinical utility in lung cancer. *Lung Cancer*. 2012, roč. 76, č. 1, s. 19-25.
- [65] HOU J.-M., KREBS M., LANCASHIRE L., et al. Clinical Significance and Molecular Characteristics of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor Microemboli in Patients With Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2012-02-09, roč. 30, č. 5, s. 525-532.

- [66] KREBS M., HOU J.-M., SLOANE R., et al. Analysis of Circulating Tumor Cells in Patients with Non-small Cell Lung Cancer Using Epithelial Marker-Dependent and -Independent Approaches. *Journal of Thoracic Oncology*. 2012, roč. 7, č. 2, s. 306-315.
- [67] AURILIO G., SCIANDIVASCI A., MUNZONE E., et al. Prognostic value of circulating tumor cells in primary and metastatic breast cancer. *Expert Review of Anticancer Therapy*. 2012, roč. 12, č. 2, s. 203-214.
- [68] PIERGA J.-Y., HAJAGE D., BACHELOT T., et al. High independent prognostic and predictive value of circulating tumor cells compared with serum tumor markers in a large prospective trial in first-line chemotherapy for metastatic breast cancer patients. *Annals of Oncology*. 2012-02-24, roč. 23, č. 3, s. 618-624.
- [69] YU M., STOTT S., TONER M., et al. Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization. *The Journal of Cell Biology*. 2011-02-07, roč. 192, č. 3, s. 373-382. ISSN 0021-9525. DOI: 10.1083/jcb.201010021.
- [70] SCHER H., JIA X., DE BONO J., et al. Circulating tumour cells as prognostic markers in progressive, castration-resistant prostate cancer: a reanalysis of IMMC38 trial data. *The Lancet Oncology*. 2009, roč. 10, č. 3, s. 233-239.
- [71] KOYANAGI K., O'DAY S., BOASBERG P., et al. Serial Monitoring of Circulating Tumor Cells Predicts Outcome of Induction Biochemotherapy plus Maintenance Biotherapy for Metastatic Melanoma. *Clinical Cancer Research*. 2010-04-14, roč. 16, č. 8, s. 2402-2408.
- [72] REYNOLDS S.-R., ALBRECHT J., SHAPIRO R.-L., et al. Changes in the presence of multiple markers of circulating melanoma cells correlate with clinical outcome in patients with melanoma. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2003-04, roč. 9, č. 4, s. 1497-1502.
- [73] LIU Z., JIANG M., ZHAO J., et al. Circulating Tumor Cells in Perioperative Esophageal Cancer Patients: Quantitative Assay System and Potential Clinical Utility. *Clinical Cancer Research*. 2007-05-15, roč. 13, č. 10, s. 2992-2997.
- [74] USTWANI O., IANCU D., YACOUB R., et al. Detection of circulating tumor cells in cancers of biliary origin. *Journal of gastrointestinal oncology*. 2012, roč. 3, č. 2, s. 97-104.

- [75] XU W., CAO L., CHEN L., et al. Isolation of Circulating Tumor Cells in Patients with Hepatocellular Carcinoma Using a Novel Cell Separation Strategy. *Clinical Cancer Research*. 2011-06-01, roč. 17, č. 11, s. 3783-3793.
- [76] BLUEMKE K., BILKENROTH U., MEYE A., et al. Detection of Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood of Patients with Renal Cell Carcinoma Correlates with Prognosis. *Cancer Epidemiology Biomarkers*. 2009-08-05, roč. 18, č. 8, s. 2190-2194.
- [77] SCHILLING D., TODENHÖFER T., TARAN F. -A., et al. Mechanismen der Tumorzell dissemination und Nachweis zirkulierender Tumorzellen beim Urothelkarzinom. *Aktuelle Urologie*. 2011, roč. 42, č. 02, s. 122-127.
- [78] FIZAZI K., MORAT L., CHAUVEINC L., et al. High detection rate of circulating tumor cells in blood of patients with prostate cancer using telomerase activity. *Annals of Oncology*. 2006-11-02, roč. 18, č. 3, s. 518-521.
- [79] FAN T., ZHAO Q., CHEN J., et al. Clinical significance of circulating tumor cells detected by an invasion assay in peripheral blood of patients with ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*. 2009, roč. 112, č. 1, s. 185-191.
- [80] AKTAS B., KASIMIR-BAUER S., HEUBNER M., et al. Molecular Profiling and Prognostic Relevance of Circulating Tumor Cells in the Blood of Ovarian Cancer Patients at Primary Diagnosis and After Platinum-Based Chemotherapy. *International Journal of Gynecological Cancer*. 2011, roč. 21, č. 5, s. 822-830.
- [81] JATANA K., LANG R., and CHALMERS J. Identification of circulating tumor cells: a prognostic marker in squamous cell carcinoma of the head and neck?. *Future Oncology*. 2011, roč. 7, č. 4, s. 481-484.
- [82] HRISTOZOVA T., KONSCHAK R., BUDACH V., et al. a simple multicolor flow cytometry protocol for detection and molecular characterization of circulating tumor cells in epithelial cancers. *Cytometry Part A*. 2012, 81A, č. 6, s. 489-495.

Údaje pro knihovnickou databázi

Název práce	EpCAM a jeho role u nádorových onemocnění
Autor práce	Klára Birkášová
Obor	Zdravotní laborant
Rok obhajoby	2012
Vedoucí práce	Mgr. Zuzana Svobodová
Anotace	EpCAM molekula je glykosylovaný membránový protein běžně se vyskytující v mnoha epiteliálních tkáních, kde napomáhá těsnému spojení v mezibuněčném prostoru epitelových buněk. Při patologickém stavu se pak vyskytuje u řady karcinomů. CTC, buňky vyskytující se v periferní krvi nesoucí určité znaky některých typů nádorů, jsou vhodným prognostickým markerem u řady typů karcinomů. Detekce CTC a EpCAM molekuly má význam především v onkologické prognostice. Proto se soustřeďuje pozornost na rozvoj nových molekulárně-biologických metod.
Klíčová slova	EpCAM, CTC, nádor, metastáze, tumor markery