

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2023

Viktorie Strnadová

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Diagnostika maligně transformovaných buněk  
Bakalářská práce

2023

Viktorie Strnadová

University of Pardubice  
Faculty of Chemical Technology

Diagnostics of Malignantly Transformed Cells  
Bachelor Thesis

2023

Viktorie Strnadová

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2022/2023

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Viktorie Strnadová**  
Osobní číslo: **C20367**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Téma práce: **Diagnostika maligně transformovaných buněk**  
Téma práce anglicky: **Diagnostics Of Malignantly Transformed Cells**  
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

## Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši na téma diagnostika maligně transformovaných buněk. V úvodní části práce se zaměřte na obecný popis maligní transformace buněk a definujte i charakteristické znaky maligně transformovaných buněk.
2. V hlavní části bakalářské práce se zaměřte na možnosti diagnostiky maligně transformovaných buněk, a to i z pohledu využití těchto diagnostických možností při studiu maligní transformace *in vitro*. Pokuste se vyzdvihnout zejména aktuální moderní diagnostické možnosti. V rámci bakalářské práce zmiňte také cirkulující nádorové buňky odvozené z epitelálních nádorů. Diskutujte jejich potenciální využití z pohledu studia maligní transformace buněk. V závěru práce zmiňte i aktuální *in vitro* studie, které se studiem maligní transformace zabývají.
3. Jako primární zdroj informací pro zpracování kompilačního textu bakalářské práce využijte odborné články publikované v recenzovaných zahraničních časopisech. Jejich vyhledávání provádějte prostřednictvím elektronických vědeckých databází, jako jsou např. *NCBI Pubmed*, *ScienceDirect*, *Web of Science*, *Scopus*, apod.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: **RNDr. Jiří Handl, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd  
Konzultant bakalářské práce: **Mgr. Pavlína Nývltová, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd  
Datum zadání bakalářské práce: **23. prosince 2022**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **30. června 2023**

**prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.** v.r.  
děkan

L.S.

**doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.** v.r.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem Diagnostika maligně transformovaných buněk jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 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 vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 26. 6. 2023

Viktorie Strnadová v. r.

## **PODĚKOVÁNÍ**

Mé poděkování patří RNDr. Jiřímu Handlovi, Ph.D. za vynikající komunikaci, vstřícnost při konzultacích, lidský přístup, cenné rady a celkové vedení při psaní této bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala svému příteli, přátelům a rodině za podporu a trpělivost po celou dobu studia.

## **ANOTACE**

Tato bakalářská práce je věnována nejdůležitějším metodám používaných v současnosti v rámci odhalení maligní transformace buněk epiteliálních nádorů. V první části jsou shrnuty charakteristiky maligních buněk a procesy využívané buňkou ve snaze potlačit nebo podpořit maligní transformaci. V hlavní části jsou popsány epiteliální nádory, cirkulující nádorové buňky a následně pak metody diagnostiky, které se používají pro odhalení nádorového onemocnění, včetně tumormarkerů. Práce je proložena aktuálními *in vitro* studii využívajícími nádorové buněčné linie. Na závěr práce jsou stručně popsány terapeutické možnosti léčby nádorových onemocnění.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Maligní transformace, epiteliální nádory, cirkulující nádorové buňky, diagnostické markery



## **TITLE**

Diagnostics of Malignantly Transformed Cells

## **ANNOTATION**

This bachelor's thesis is devoted to the most important methods currently used in the detection of malignant transformation cells of epithelial tumor cells. The thesis introduction summarises the characteristics of malignant cells and the processes used by the cell in an attempt to suppress or promote malignant transformation. Main discussion describes epithelial tumors and circulating tumor cells as well as explores diagnostic methods used to detect cancer, including tumor markers. *In vitro* studies are used in this thesis to exemplify the use of cancer cell lines in order to arrive at a conclusion for therapeutic options for cancer treatment.

## **KEYWORDS**

Malignant transformation, epithelial tumors, circulating tumor cells, diagnostic markers

# OBSAH

SEZNAM OBRÁZKŮ.....	11
SEZNAM TABULEK.....	11
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK.....	12
ÚVOD.....	15
1 Maligní transformace buněk.....	16
1.1 Charakteristika maligně transformovaných buněk.....	16
1.1.1 Angiogeneze a proliferace.....	16
1.1.2 Strážce genomu p53.....	17
1.1.3 Role reaktivních forem kyslíku při maligní transformaci buněk.....	18
1.2 Metastázy.....	19
1.2.1 Buněčná fúze.....	19
1.2.2 Epiteliálně-mezenchymální přechod.....	20
1.3 Obranné mechanismy buněk proti maligní transformaci.....	22
1.3.1 Programovaná buněčná smrt.....	22
1.3.2 Autofagie.....	25
1.3.3 Senescence.....	26
2 Vybrané epiteliální nádory.....	27
2.1 Nádor prsu.....	27
2.2 Nádor prostaty.....	28
2.3 Nádor plic.....	29
2.4 Nádor tlustého střeva.....	30
3 Cirkulující nádorové buňky.....	31
3.1 Heterogenita CTC.....	31
3.2 Jednotlivé CTC versus shluky CTC.....	31
3.3 Obohacování CTC.....	32

3.4	Izolace a detekce CTC.....	32
3.4.1	Komplikace spojené s detekcí CTC.....	33
3.4.2	CellSearch systém.....	33
3.4.3	Platforma RareCyte.....	34
3.5	Využití CTC v imunoterapii.....	35
3.6	<i>In vitro</i> kultivace CTC buněčných linií.....	36
4	Diagnostika.....	38
4.1	Emise indukovaná shlukováním.....	38
4.2	Proteiny jaderné matrix.....	39
4.3	Maligní výpotky.....	40
4.4	Diagnostické markery.....	41
4.4.1	Tumormarkery.....	41
4.4.2	Celulární markery cirkulující nádorových buněk.....	46
5	Terapie nádorových onemocnění.....	49
5.1	Chemoterapie.....	49
5.2	Radioterapie.....	50
5.3	Imunoterapie.....	50
	ZÁVĚR.....	52
	POUŽITÁ LITERATURA.....	53

## SEZNAM OBRÁZKŮ

<b>Obrázek 1:</b> Rozdíly mezi fyziologickou a nádorovou buňkou.....	16
<b>Obrázek 2:</b> Hlavní zdroje produkce ROS ve fyziologických a nádorových buňkách.....	18
<b>Obrázek 3:</b> Proces vzniku nádorových iniciativních buněk.....	20
<b>Obrázek 4:</b> Epiteliálně-mezenchymální přechod.....	21
<b>Obrázek 5:</b> Rozdílný mechanismus apoptózy a nekrózy.....	23
<b>Obrázek 6:</b> Vnitřní a vnější cesta apoptózy.....	24
<b>Obrázek 7:</b> Přehled možností využití CTC u karcinomu plic.....	30
<b>Obrázek 8:</b> Pracovní postup na platformě RareCyte.....	35
<b>Obrázek 9:</b> Mechanismus selektivního barvení luminogenem AIE.....	39
<b>Obrázek 10:</b> Přehled onemocnění diagnostikovaných pomocí CA 19-9.....	45

## SEZNAM TABULEK

<b>Tabulka 1:</b> Přehled panelu protilátek.....	41
<b>Tabulka 2:</b> Přehled tumormarkerů epiteliálních nádorů.....	42

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

<b>AIE</b>	emise indukována shlukováním
<b>Apaf-1</b>	apoptotický proteázový faktor 1
<b>BAD</b>	promotor smrti spojený s BCL2
<b>BAK</b>	antagonista 1
<b>BC</b>	karcinom prsu
<b>BCaP</b>	progrese rakoviny odvozené od BPH1
<b>BCL2</b>	B-buněčný lymfom 2
<b>BCL-xL</b>	B-buněčný lymfom extra velký
<b>BID</b>	agonista smrti interagující s doménou BH3
<b>BIM</b>	protein podobný BCL2
<b>BMIC</b>	buňky iniciující metastázy v mozku
<b>CA</b>	nádorový antigen
<b>CaP</b>	karcinom prostaty
<b>CEA</b>	karcinoembryonální antigen
<b>cFLIP</b>	buněčný inhibiční protein
<b>CfNA</b>	cirkulující bezbuněčná nukleová kyselina
<b>CK</b>	cytokeratin
<b>CRC</b>	kolorektální karcinom
<b>CT</b>	počítačová tomografie
<b>CTC</b>	cirkulující nádorové buňky
<b>CYFRA 21-1</b>	fragment cytokeratinu 19
<b>CYLD</b>	cylindromatóza
<b>Cytc</b>	cytochrom c

<b>DAMPs</b>	molekulární vzory spojené se signálem poškozené buňky
<b>DISC</b>	signální komplex vyvolávající smrt
<b>DNA</b>	deoxyribonukleová kyselina
<b>ECM</b>	extracelulární matrix
<b>EGFR</b>	receptor epidermálního růstového faktoru
<b>ELISA</b>	enzymová imunosorpční analýza
<b>EMA</b>	epiteliální membránový antigen
<b>EMT</b>	epiteliálně-mezenchymální přechod
<b>EpCAM</b>	adhezivní molekula epitelových buněk
<b>ER</b>	endoplazmatické retikulum
<b>ETC</b>	elektronový transportní řetězec
<b>FADD</b>	doména smrti asociovaná s Fas
<b>Fas</b>	transmembránový receptor
<b>FasL</b>	Fas ligand, transmembránový protein
<b>HE-4</b>	lidský nadvarlatový protein 4
<b>IAP</b>	inhibitory proteinů apoptózy
<b>ICC</b>	imunocytochemický panel
<b>IF</b>	imunofluorescence
<b>IFN-I</b>	interferon typu 1
<b>LUBAC</b>	lineární komplex ubikvitinačního řetězce
<b>MCL1</b>	myeloidní leukemický diferenciační protein
<b>MET</b>	mezenchymálně-epiteliální přechod
<b>MMP</b>	matrix metaloproteináza
<b>MPE</b>	maligní pleurální výpotek

<b>Mutp53</b>	mutantní protein p53
<b>NF-κB</b>	kináza
<b>NM</b>	jaderná matrix
<b>NOXA</b>	protein podobný BCL2
<b>NSCLC</b>	malobuněčný karcinom plic
<b>OS</b>	celkové přežití
<b>PAMPs</b>	molekulární vzory spojené s patogeny
<b>PDAC</b>	adenokarcinom pankreatu
<b>PET</b>	pozitronová emisní tomografie
<b>PFS</b>	přežití bez progresu
<b>PNI</b>	perineurální invaze
<b>PSA</b>	sérový prostatický antigen
<b>PUMA</b>	vazebná komponenta regulovaná p53 proteinem
<b>RIPK1</b>	proteinkináza 1 interagující s receptorem
<b>ROS</b>	reaktivní formy kyslíku
<b>RT</b>	radioterapie
<b>SCCA</b>	antigen dlaždicobuněčného karcinomu
<b>SCLC</b>	malobuněčný karcinom plic
<b>SMAC</b>	druhý aktivátor kaspázy uvolněný z mitochondrie do cytozolu
<b>SPLC</b>	druhý primární karcinom plic
<b>TNF</b>	tumor nekrotizující receptor
<b>TRADD</b>	doména smrti asociovaná s TNFR1
<b>U</b>	ubikvitinovaný RIPK1
<b>VIM</b>	vimentin na povrchu buněk

## ÚVOD

Nádorová onemocnění zůstávají jednou z největších výzev pro lidské zdraví. Světové organizace, které se touto problematikou zabývají, uvádějí, že v roce 2040 počet nových případů s nádorovým onemocněním bude kolem 30 milionů a počet úmrtí s nimi spojených překoná 16 milionů. Tato problematika může být zapříčiněna mnoha faktory, včetně genetických predispozic, geografickou lokací nebo špatným životním stylem.

V těle každého člověka dochází k maligní transformaci buněk každý den. Dále záleží na reakci organismu, případně zda dokáže maligně transformované buňky eliminovat nebo zabránit jejich vzniku. Eliminaci těchto buněk zajišťují mechanismy, které jsou schopny tělo bránit. Při jejich selhání se buňka maligně přemění a dochází k tvorbě nádoru. Zapouzdřený nádor, který vzniká jako jeden celek, je nádorem benigním, při kterém nedochází k tvorbě metastáz. Ovšem pokud nádor není celistvý, jedná se o nádor maligní, u kterého se velmi často objevuje riziko vzniku metastáz. Právě u těchto nádorů je velice důležité odhalení maligně změněných buněk, k čemuž lze využít nádorové markery, které jsou uvolňovány při procesu změny fyziologické buňky v buňku maligní. Maligní buňky se dají ohladit také *in vitro*, například pomocí barvení tkáně, které odliší fyziologickou tkáň od tkáně nádorové.

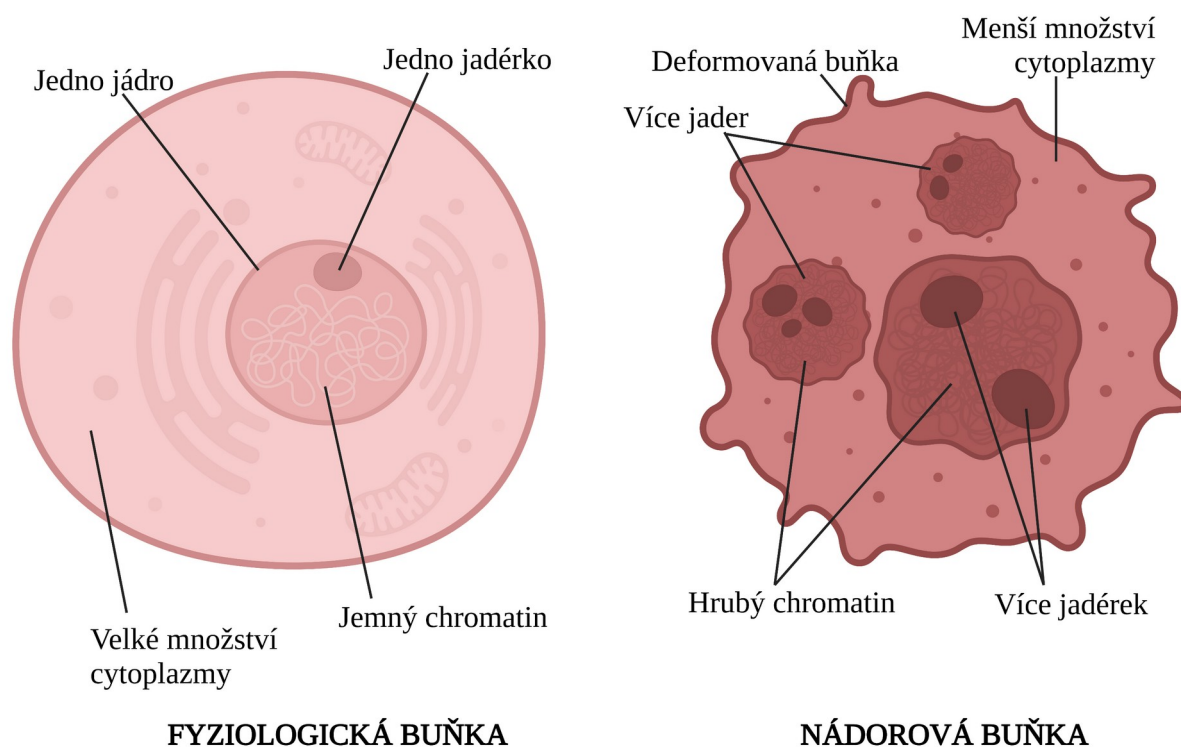
Nejčastějším typem nádorů jsou nádory epiteliální, jiným názvem karcinomy, na které je tato práce zaměřena. Zároveň je u většiny těchto karcinomů velká pravděpodobnost vzniku metastáz, proto je včasná diagnostika velice důležitá pro přežití pacienta. Odhalení těchto malignit probírá pomocí cirkulujících nádorových buněk, neboli vyšetření tekutou biopsií, která se stává stále více důležitou v klinické praxi. V posledních letech byly vyvinuty nové systémy, které pomáhají při detekci těchto buněk u pacientů s nádorovým onemocněním. Kvůli vzácnosti těchto buněk však stále nedošlo k dokonalosti jejich izolace a detekce. Na základě této problematiky se již řadu let provádí *in vitro* studie cirkulujících nádorových buněk s úspěšnými pokusy jejich kultivace. Kultivovatelné buněčné linie pomáhají odhalovat další vlastnosti těchto vzácných markerů, což se dále využívá pro testování terapeutických možností epiteliálních nádorů pacientů. Proto je diagnostika *in vitro* stejně důležitá jako *in vivo*, jelikož pomáhá zpomalit či zcela zamezit progresi karcinomů a zároveň přispívá v klinické praxi.



# 1 Maligní transformace buněk

## 1.1 Charakteristika maligně transformovaných buněk

Maligní transformace buněk se vyznačuje zejména nepřetržitým dělením. Tento děj může být jedním ze znaků nádorových buněk. V tomto případě se nekontrolovatelně proliferující buňky šíří tělem a napadají fyziologické tkáně (Abbott et al., 2019). Nádorová buňka se může lišit oproti fyziologické buňce i stavbou, množstvím jader a jadérek, strukturou chromatinu v jádře a množstvím cytoplazmy v buňce, což je naznačeno v obrázku 1 (Cremer et al., 2003).



**Obrázek 1: Rozdíly mezi fyziologickou a nádorovou buňkou.**

Vytvořeno v *BioRender.com*.

Vývoj a progres rakoviny probíhá prostřednictvím trvalé proliferace, vyhýbání se růstovým supresorům, rezistence vůči buněčné smrti, replikační nesmrtelnosti, angiogeneze, metastazování, přeprogramování metabolismu, či vyhýbání se imunitní destrukci (Abbott et al., 2019).

### 1.1.1 Angiogeneze a proliferace

V transformovaných buňkách dochází k poruchám metabolismu tak, aby co nejefektivněji podporovaly nekontrolovatelnou proliferaci. Přestavby buněčných metabolismů vedou k charakteristickým metabolickým fenotypům, které lze v diagnostice použít pro časnější

odhalení onemocnění či jako biomarkery odpovědi na léčbu. Jednou z nejznámějších metabolických změn v nádorových buňkách je zvýšená spotřeba glukózy, která je detekovatelná pomocí metody pozitronové emisní tomografie (PET) pro počáteční stanovení stádia rakoviny (Schmidt et al., 2021).

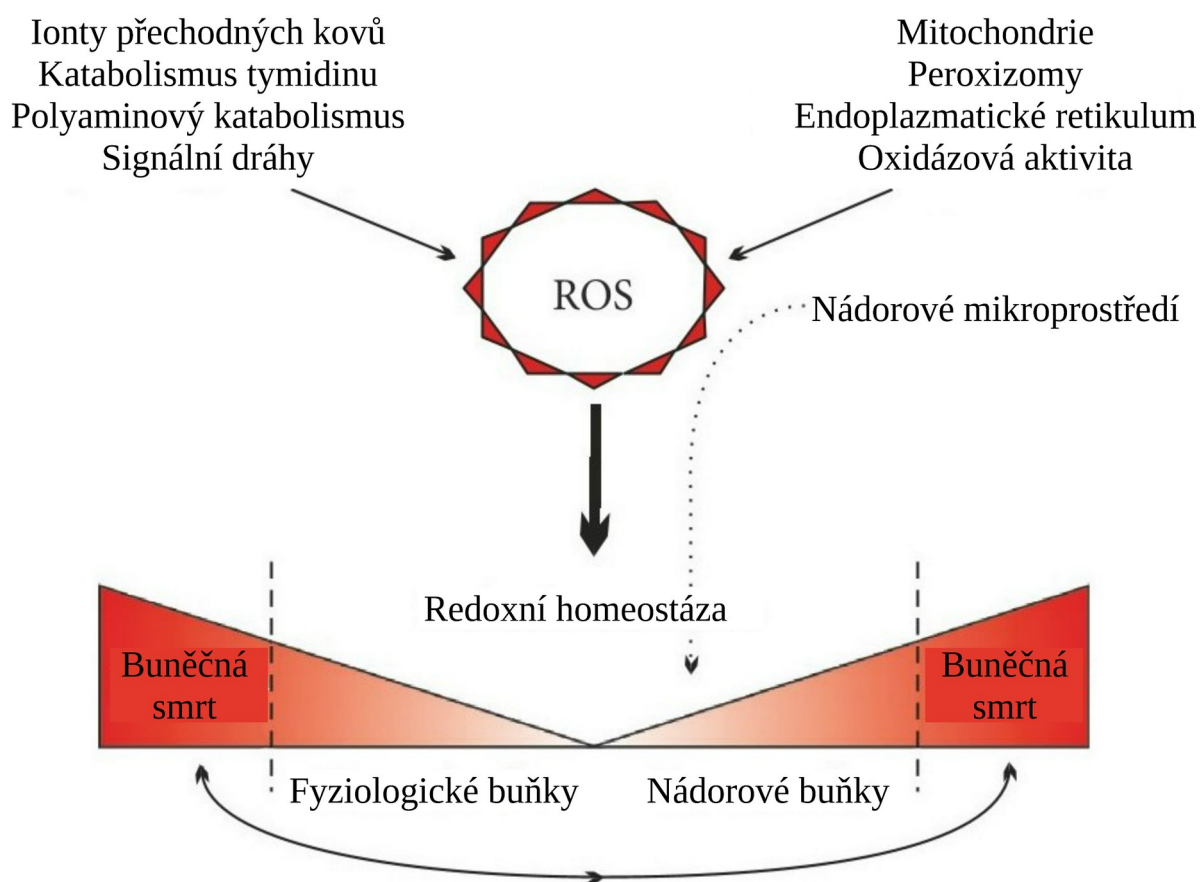
Dalším faktorem, který je pro nepřetržité dělení buněk zapotřebí, je proces angiogeneze. Je to děj, při kterém se z již existujících cév vytvářejí cévy nové a probíhá i ve fyziologické buňce. V nádorových tkáních se vyskytuje více forem angiogeneze. K jedné z nich dochází po vyloučení proangiogenních faktorů do extracelulární tekutiny, které aktivují endoteliální buňky. Pro vytvoření funkční cévní sítě se tyto endoteliální buňky, které migrují podél koncentračního gradientu proangiogenních faktorů, připojují k cévám. Krevní cévy v nádorových tkáních jsou tvořeny především endotelovými buňkami. Tyto cévní modulační faktory mohou podpořit rozmnožování maligně transformovaných buněk, invazi a také metastazování nádoru. Angiogeneze poskytuje nádorovým buňkám živiny, kyslík a odstraňuje metabolický odpad. Prostřednictvím modulačních faktorů má nádor možnost metastazovat a migrovat tak z primárního místa výskytu na vhodná místa pro další růst. Tímto procesem si nádor vytváří své mikroprostředí, které produkuje velké množství faktorů pro další podporu nádorové angiogeneze (Jiang et al., 2020).

### **1.1.2 Strážce genomu p53**

Velmi důležitou úlohu v ochraně proti maligní transformaci buňky hraje tumor supresorový gen TP53. Tento gen kóduje protein p53, který je transkripčním faktorem zabráňujícím vzniku nádoru a jeho rozšiřování. Ve fyziologických buňkách a tkáních jsou hladiny proteinu p53, za nestresových podmínek, nízké. Aktivovaný může být širokou škálou extra- a intracelulárních stresových signálů, včetně poškození deoxyribonukleové kyseliny (DNA), aktivace onkogenů, či změny hladiny reaktivních forem kyslíku (ROS). Těmito stresovými signály je protein p53 aktivován prostřednictvím posttranslačních modifikací, jako je například fosforylace, acetylace, metylace. Pokud dochází k jeho mutaci, mutace následně způsobuje poruchy kontroly růstu buněk, apoptózy, opravy DNA a angiogeneze. U více jak poloviny nádorů je protein p53 zmutovaný. Po jeho mutaci může z tohoto nádorového supresoru p53 vzniknout mutantní protein p53 (mutp53), který nejenže ztrácí schopnost potlačit nádor, ale také získává nové aktivity, které podporují nádorové bujení. Mutp53 se v nádoru často hromadí ve velmi vysokých hladinách, což přispívá k maligní progresi. Kvůli jeho významnému podílu na rozšiřování maligních buněk se mutp53 stal v poslední době atraktivním cílem pro léčbu rakoviny (Yue et al., 2017).

### 1.1.3 Role reaktivních forem kyslíku při maligní transformaci buněk

ROS vznikají při mnoha buněčných procesech a mají podíl na buněčné signalizaci. Produkce ROS je kontrolována změnami v metabolických a signálních drahách (Obr. 2), které probíhají prostřednictvím aktivity rozdílných antioxidačních systémů, což udržuje homeostázu fyziologických buněk. Ohrožujícím faktorem pro buňku mohou být zvýšené hladiny ROS, které mají škodlivé účinky na homeostázu, struktury a funkce buněk, což může vést k oxidačnímu stresu, někdy až k indukci buněčné smrti. Možnost rozvoje různých patologií je rizikovým faktorem, který vzniká po narušení redoxní rovnováhy. Zvýšenou hladinou ROS se vyznačují nádorové buňky, což může být také důsledkem změn v mnoha procesech, jako je oxidativní fosforylace, aktivita oxidáz či skládání proteinů. ROS mohou vznikat také v mikroprostředí nádoru, proto hrají ve vývoji nádorových onemocnění dvojí roli. Na jedné straně mohou podporovat molekulárně genetické změny, které jsou nezbytné pro iniciaci, růst a progresi nádoru a také pro získání rezistence k léčbě (Kumari et al., 2018). Na druhou stranu mají trvale zvýšené hladiny ROS cytotoxické účinky, vyvolávají aktivaci apoptotických drah nebo inhibují rezistenci vůči protinádorové léčbě (Galadari et al., 2017).



**Obrázek 2: Hlavní zdroje produkce ROS ve fyziologických a nádorových buňkách.**  
ROS = reaktivní formy kyslíku. Upraveno dle Snezhkina et al., 2019.

## 1.2 Metastázy

Metastazování je vícestupňový komplikovaný proces zahrnující mnoho faktorů. Nejprve musí metastazující nádorové buňky proniknout do okolní vazivové tkáně žlázy či orgánu ze tkáně vystylající nádor. Dále je podmínkou jejich průnik do cév a přežití v cirkulaci. Z krevní cirkulace se následně nádorové buňky mohou dostat do jiné tkáně či orgánu. V tomto cílovém orgánu pak metastazující buňky pronikají do matrix a dále rostou. Celý proces probíhá při současném vyhýbání se destrukci vlivem imunitního systému. Metastatické nádorové buňky přednostně rostou v sekundárních místech s příznivým mikroprostředím. Životaschopnost cirkulujících nádorových buněk je vyšší, pokud jsou začleněny do heterotypických fragmentů nádorových kmenových buněk. Při interakcích nádorových buněk s buňkami imunitními v cirkulaci se mohou tvořit shluky, které v tomto případě mohou tvořit tzv. emboly. Tímto shlukováním buněk se může zvýšit pravděpodobnost metastazování (Duda et al., 2010).

Klíčovou vlastností maligních buněk je jejich schopnost oddělit se od primárního nádoru a zakládat metastatická ložiska na vzdálených místech. Přijatelnými cestami pro metastatické šíření jsou cévní a lymfatické cesty. Další cestou může být šíření nádorů v nervech a podél nich. Proces nádorového šíření se nazývá více slovními spojeními, jedním z nich je perineurální invaze (PNI). Po karcinomech hlavy a krku, u kterých se PNI vyskytovala v minulosti nejvíce, se nyní PNI objevila jako klíčový patologický rys mnoha dalších malignit, včetně karcinomů slinivky břišní (PDAC), prostaty (CaP), tlustého střeva a konečníku (CRC). PNI je však u mnoha malignit markerem špatného výsledku a předpokladu zkráceného přežití (Liebig et al., 2009).

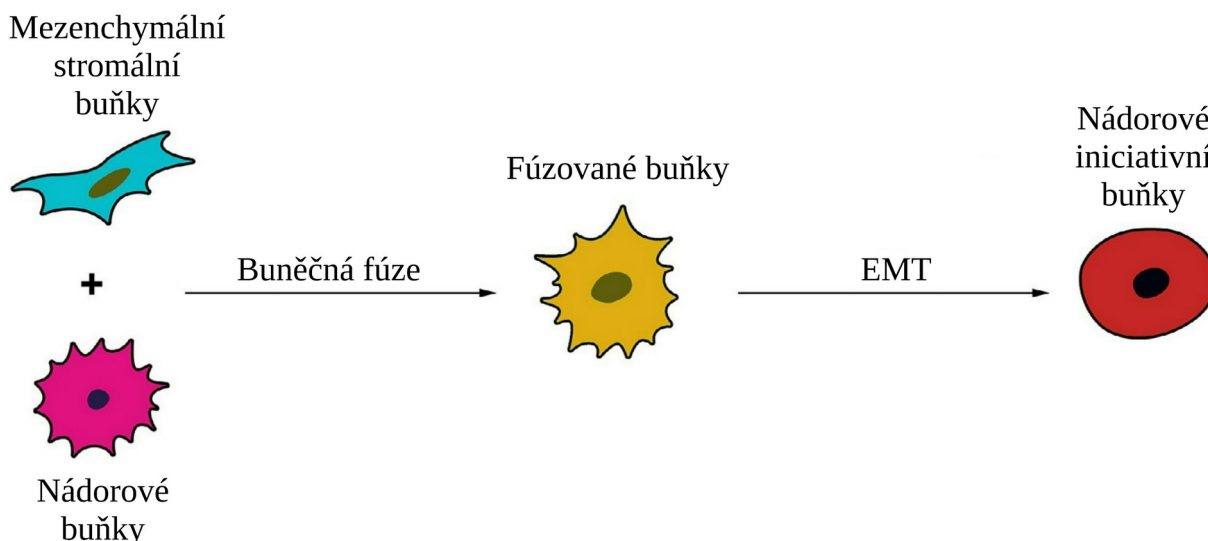
Během metastazování nádorů dochází k selektivní aktivaci onkogenů a selektivní inaktivaci nádorových supresorových genů během vývoje a rozšiřování nádorů. Tento proces zahrnuje několik molekulárních mechanismů, mezi které patří i buněčná fúze a epiteliálně-mezenchymální či mezenchymálně-epiteliální přechod (Zhang et al., 2021).

### 1.2.1 Buněčná fúze

Proces buněčné fúze, jinak označovaný také jako buněčná hybridizace, se běžně objevuje u řady organismů a má velice důležité biologické důsledky. Je to proces spojování jedné či více buněk v jeden celek, a to buď prostřednictvím jejich plazmatické membrány či buněčných jader. Takto vzniklé celky, označované jako fúzní hybridy, získávají genetické a fenotypové vlastnosti obou rodičovských buněk. Mimo fyziologické děje

má buněčná fúze význam také při dějích patologických, jako je virová infekce nebo progresse nádorů.

Mezenchymální stromální buňky a také nádorové buňky mohou podléhat spontánní nebo indukované fúzi, kdy vznikají tzv. fúzované buňky. Fúzované buňky vykazují zvýšený metastatický potenciál a vyšší míru proliferace. Dále tyto buňky také procházejí epiteliálně-mezenchymálním procesem (EMT) s výraznými změnami exprese markerů souvisejících s EMT, například snížení regulace E-kadherinu a zvýšení regulace N-kadherinu a vimentinu (VIM). Kromě toho se ve sloučených buňkách významně zvýšily hladiny exprese mnoha markerů kmenových buněk. Fúzované buňky mezitím získávají vlastnosti podobné kmenovým buňkám, jako je zvýšená tumorigenita a odolnost vůči lékům. EMT je důležitým spojovacím článkem mezi buněčnou fúzí a tvorbou nádorových iniciativních buněk. Tento proces je naznačený na obrázku 3 (Zhang et al., 2021).



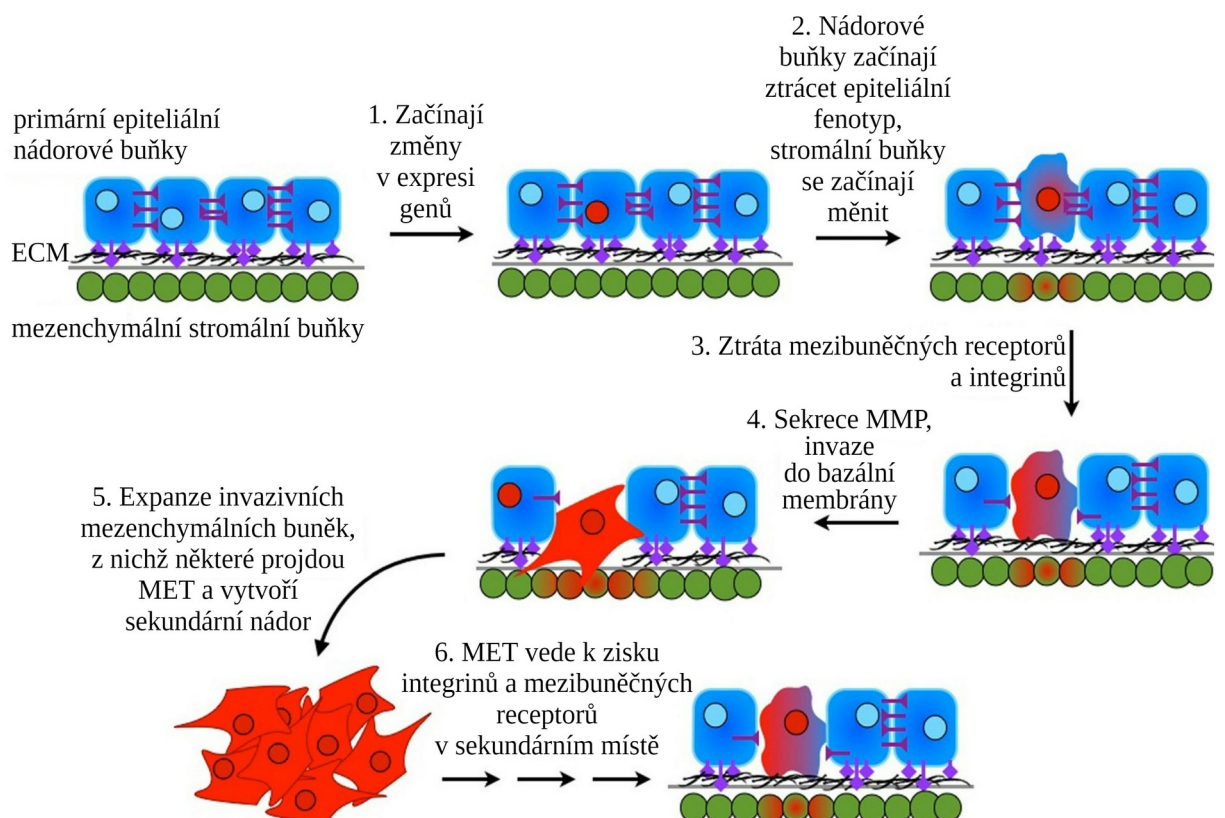
**Obrázek 3: Proces vzniku nádorových iniciativních buněk.**  
EMT = epiteliálně-mezenchymální přechod. Upraveno dle Zhang et al., 2021.

### 1.2.2 Epiteliálně-mezenchymální přechod

Při EMT získávají jednotlivé epiteliální buňky vlastnosti mezenchymálních. EMT a mezenchymálně-epiteliální přechod (MET) tedy umožňují buňkám přechod mezi epiteliálním mezenchymálním stavem, což má význam jak při normálním vývoji, tak při metastazování nádorů. Tyto přechody jsou možné díky regulačním modifikacím, pomocí transkripčních faktorů, které v normálním procesu zvyšují diferenciaci populací buněk v organismu. Pokud k podobným změnám dojde u nádorových buněk, stávají se tyto buňky metastatickými. Metastáze jsou schopny pouze buňky, kterým se povede vyhnout se určité formě programované buněčné smrti.

EMT je považován za první krok nádorové invaze a metastazování, které jsou brány za základní charakteristiky. V diagnostice hrají tyto přechody důležitou roli jako ukazatelé zhoubných nádorů, které jsou také hlavní příčinou úmrtí pacientů s rakovinou (Zhang et al., 2021). V širokém pojetí lze EMT popsat jako proces, do kterého jsou zahrnuty molekulární změny, snížené rozpoznání, adheze buněk a zvýšený potenciál buněčné pohyblivosti.

Změny nádorových buněk procházejících EMT a jejich následné metastazování na sekundární místo jsou naznačeny na obrázku 4. Nádorová buňka projde EMT, tím začne ztrácet svůj epiteliální fenotyp. Dochází ke ztrátě integrinů a receptorů pro vazbu mezi buňkami. Kromě toho jsou stromální buňky, které se nachází v blízkosti nádorových buněk, poškozeny. Nádorové buňky prochází EMT a tím ovlivňují stromální buňky, které se také začínají přeměňovat. Po dokončení přechodu se nádorová buňka přesune na nové místo, což se doprovází dalšími změnami zahrnujících MET. Tyto změny způsobí ukotvení metastatické nádorové buňky na vzdáleném místě a vytvoří se sekundární nádor. Stromální buňky v novém místě nádoru také projdou změnou (Heerboth et al., 2015).



**Obrázek 4: Epiteliálně-mezenchymální přechod.**

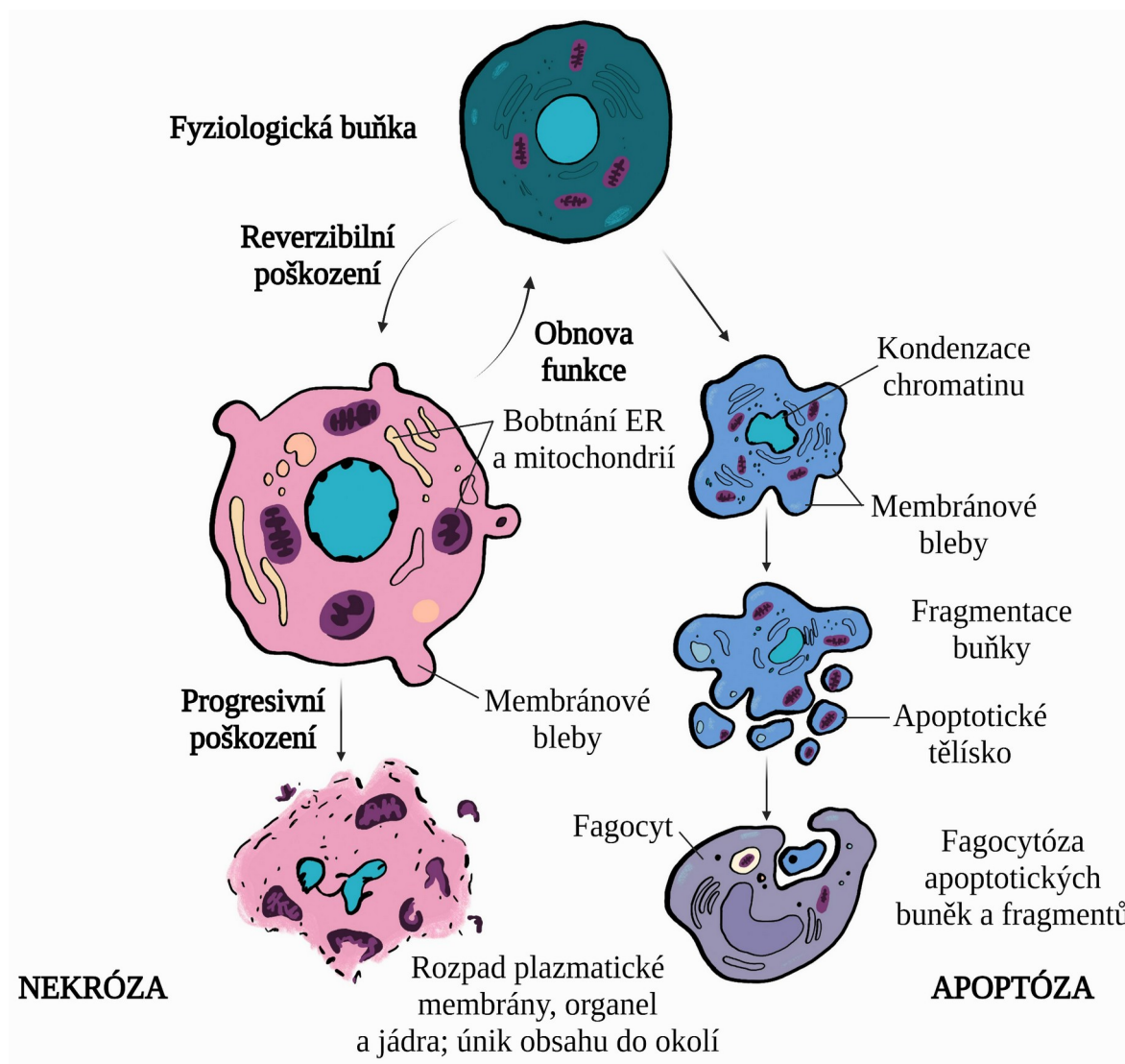
ECM = extracelulární matrix; MMP = matrix metaloproteináza; MET = mezenchymálně-epiteliální přechod. Upraveno dle Heerboth et al., 2015.

### 1.3 Obranné mechanismy buněk proti maligní transformaci

Nestabilita genomu je charakteristickým znakem nádorového bujení. Replikace DNA je nejzranitelnějším buněčným procesem, který k rakovině může vést. Léze DNA mohou vznikat chybami v replikaci DNA, působením genotoxických sloučenin, včetně buněčných metabolitů, nebo ultrafialových a ionizačním zářením. Zdrojem endogenního poškození DNA jsou již zmiňované ROS. Fyziologické buňky reagují na poškození DNA aktivací kontrolního bodu poškození DNA. Mimo tuto aktivaci dochází k použití různých opravných cest. Pokud poškození DNA přetrvává, buňky podléhají například apoptóze nebo senescenci, které jsou popsány níže. V opačném případě se může vyvinout rakovina ve spojení s dlouhodobým buněčným stavem globální nestability genomu (Gaillard et al., 2015).

#### 1.3.1 Programovaná buněčná smrt

Buněčná smrt má fyziologické a patologické funkce. Životnost buněk se může pohybovat od několika dnů až po mnoho let, v závislosti na typu buňky. Mnoho fyziologických procesů využívá pro řádnou funkci buněčnou smrt, jako je například selekce B a T buněk. Každý den umírají miliardy buněk a jsou rychle odstraněny fagocyty. Tento proces odstraňování mrtvých buněk funguje za normálních podmínek hladce a prokazuje tak účinnost fagocytárních procesů. Systém však může být zatížen hromaděním velkého množství buněk, které zemřely náhle, jako například během infekcí, chronického zánětu a poškození tkáně. Náhlá a neomezená buněčná smrt má za následek masivní uvolnění buněčného obsahu do extracelulárního prostoru. Uvolněné molekuly působí jako signál poškození, známé jako *danger-associated molecular patterns* (DAMPs). Přítomnost DAMPs v extracelulárním prostoru vyvolává silnou imunitní reakci. Tato reakce řídí další fagocyty a imunitní buňky, které odstraní hrozbu a podpoří opravu tkání (Rani et al., 2017). Během infekcí vyvolává přítomnost *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) specifické antimikrobiální imunitní reakce ke kontrole infekce. Za určitých okolností mohou buňky regulovat jejich smrt, tak aby přizpůsobila imunitní reakci a tím se změnil i dopad jejich smrti na okolí. Nejlépe prozkoumanými formami programované buněčné smrti jsou apoptóza, nekróza (Obr. 5) a pyroptóza. K dalším typům programované buněčné smrti dochází v určitých stavech buněčné toxicity, často vyvolaných farmakologickou léčbou, například u protirakovinných terapií (Bertheloot et al., 2021).



**Obrázek 5: Rozdílný mechanismus apoptózy a nekrózy.**

ER = endoplazmatické retikulum. Upraveno dle Kumar et al., 2014.

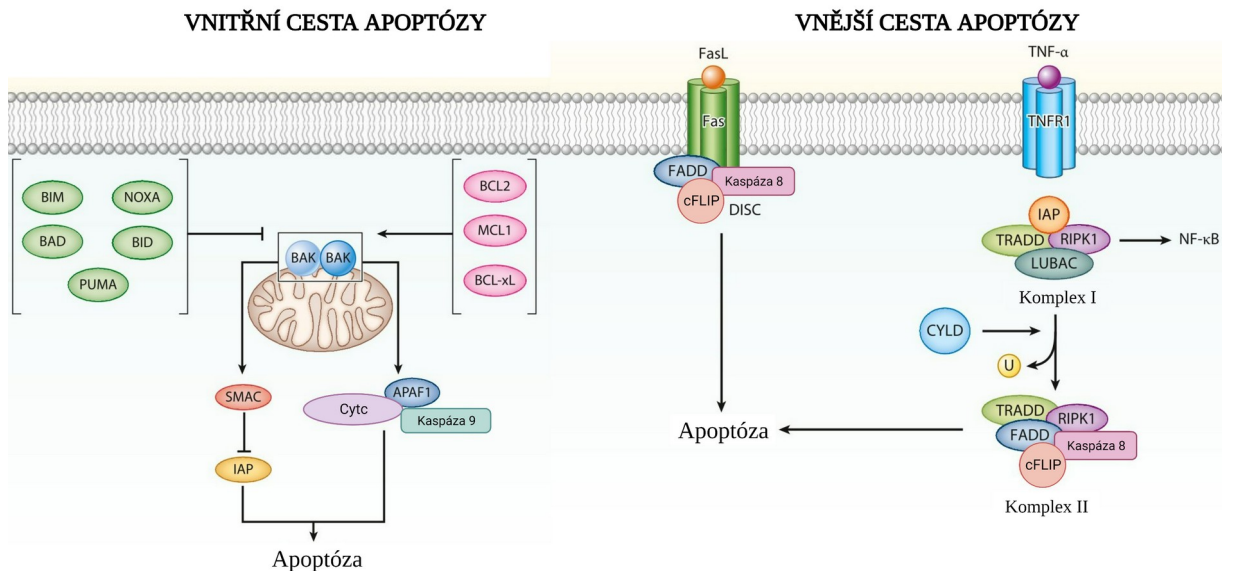
Apoptóza je jeden z hlavních mechanismů regulované buněčné smrti, která byla po dlouhá léta považována za jediný regulovaný typ buněčné smrti. Tento mechanismus je zprostředkován dvěma signálními kaskádami. K vnitřní cestě apoptózy běžně dochází v důsledku narušení buněčné homeostázy a k vnější cestě dochází v důsledku extracelulární signalizace prostřednictvím receptorů smrti. Vnitřní i vnější cesta apoptózy jsou spouštěny řadou ligandů, proteinů a signalizačních komplexů, které jsou naznačeny na obrázku 6 (Sauler et al., 2018).

Apoptotická buněčná smrt se vyznačuje řadou charakteristických znaků, morfologickými změnami ve struktuře buňky a řadou biochemických procesů závislých na enzymech. Mezi základní znaky apoptózy patří uvolňování cytochromu c (cytc) z mitochondrií, regulované rovnováhou mezi proapoptotickými a antiapoptotickými proteiny BCL-2, iniciačními kaspázami (8, 9 a 10) a efektorovými kaspázami (3, 6 a 7).



Cytc má spoustu funkcí. Mezi nejdůležitější patří účast v mitochondriálním elektronovém transportním řetězci (ETC) a jeho klíčová role regulátoru apoptózy. U tohoto děje působí jako signální molekula, která se během buněčného stresu uvolňuje z mitochondrií do cytozolu. V cytozolu interaguje s faktorem aktivujícím apoptózu Apaf-1. Interakce vede k následné aktivaci kaspáz a zahajuje cestu buněčné smrti (Kalpage et al., 2018).

Obě cesty apoptózy vrcholí rozpadem jaderné membrány kaspázou 6. Dále probíhá štěpení mnoha intracelulárních proteinů, jako je lamin, a rozpad genomové DNA na nukleozomální struktury. Tyto děje jsou charakteristickým znakem apoptózy a jsou běžně používané k identifikaci zapojené dráhy buněčné smrti. Výsledkem je odstranění buněk z těla s minimálním poškozením okolních tkání. Selhání apoptózy a následná hromadění poškozených buněk v těle může vyústit v různé formy rakoviny (D'Arcy, 2019).



**Obrázek 6: Vnitřní a vnější cesta apoptózy.**

BIM = protein podobný BCL2; NOXA = protein podobný BCL2; BAD = promotor smrti spojený s BCL2; BID = agonista smrti interagující s doménou BH3;

PUMA = vazebná komponenta regulovaná p53 proteinem; BAK = antagonist 1;

BCL2 = B-buněčný lymfom 2; MCL1 = myeloidní leukemický diferenciační protein;

BCL-xL = B-buněčný lymfom extra velký; Apaf-1 = apoptotický proteázový aktivační faktor 1; Cytc = cytochrom c; SMAC = druhý aktivátor kaspázy uvolněný z mitochondrie do cytozolu; IAP = inhibitory proteinů apoptózy; Fas = transmembránový receptor;

FasL = Fas ligand, transmembránový protein; FADD = doména smrti asociovaná s Fas;

cFLIP = buněčný inhibiční, interleukin konvertujícího enzymu, podobný FADD protein; DISC = signální komplex vyvolávající smrt; TRADD = doména smrti asociovaná s TNFR1;

RIPK1 = proteinkináza 1 interagující s receptorem; LUBAC = lineární komplex sestavený ubikvitinačního řetězce; NF-κB = kináza; CYLD = cylindromatóza;

U = ubikvitinovaný RIPK1.

Upraveno dle Sauler et al., 2018.

Nekróza je obecně charakterizována jako nekontrolovaná smrt buňky, při které dochází ke ztrátě integrity membrány. Tento děj vede k pasivnímu úniku intracelulárního obsahu buňky, jejímu rozpadu a rozlití do okolních tkání. Po dlouhý čas byla nekróza studována jako opak apoptózy. Dnes víme, že se jedná o neapoptotickou formu buněčné smrti. Tato forma se vyvinula k detekci patogenů a podpoře opravy tkání. Tento typ nastává po aktivaci tumor nekrotizujícího receptoru (TNFR1) pomocí TNF $\alpha$ , přestože byl TNF $\alpha$  dlouho považován za induktor apoptózy.

Aktivace buněčných receptorů spouští nekroptózu. Tyto receptory zahrnují receptory smrti a cytozolové senzory nukleových kyselin, které indukují interferon typu I (IFN-I) a produkují TNF $\alpha$ . Tím podporují nekroptózu v autokrinní smyčce zpětné vazby (Schock et al., 2017). Většina těchto drah spouští prozánětlivé signály a signály pro přežití. Avšak působením farmakologickými činidly se spouští nekroptotická dráha (Bertheloot et al., 2021).

### 1.3.2 Autofagie

Autofagie je buněčný obranný mechanismus, kterým se buňka chrání před nepříznivými podmínkami prostředí, což může být například hypoxie či terapeutický stres. Po spuštění autofagie je aktivován regulovaný katabolismus buněčných organel. Nejprve dochází k vytvoření struktur z organel zapouzdřením, které se nazývají autofagozomy. Po jejich splynutí s lysozomy je obsah takto vytvořených autolysozomů rozštěpen a následně metabolizován. Inhibice autofagie lze dosáhnout farmakologicky, například hydroxychlorochinem sulfátu, který způsobuje inhibici splynutí autofagozomálních struktur s lysozomem. Studie posledních let také prokazují, že použití derivátů chlorochinu cíleně ovlivňuje autofagii, a tím se zvyšuje účinnost chemoterapie určitých typů malignit (Karasic et al., 2019).

Zároveň jsou autofagické procesy velice důležité při udržování buněčné homeostázy. Při zabezpečování homeostázy je vrcholem lysozomální degradace nadbytečných nebo potenciálně nebezpečných cytozolových částic (Galluzzi et al., 2019). Ve zdravých buňkách představuje tato homeostatická aktivita pevnou bariéru proti maligní transformaci. Zároveň mnoho onkoproteinů autofagii inhibuje a několik onkosupresorových proteinů ji podporuje. Zdravé buňky jsou chráněny před maligní transformací díky zdatným autofagickým reakcím. Autofagické reakce podporují růst a progresi široce zakořeněných nádorů tím, že snižují jejich citlivost na vnitřní podněty buněk i mikroprostředí, které by za normálních okolností podporovaly růst a progresi nádorů.

Defekty v autofagickém mechanismu často omezují proliferaci, šíření a metastatické potenciál maligních buněk (Galluzzi et al., 2015).

### 1.3.3 Senescence

Buněčná senescence, označována za stav stabilního opuštění buněčného cyklu, je také často vedle apoptózy označována jako vnitřní mechanismus potlačování nádorů. Oba děje jsou závislé na typu buňky a mají také různé spouštěcí faktory, které je vyvolávají. K senescenci je potřeba více markerů, aby se dal popsat její průběh (Pérez-Mancera et al., 2014). Obvykle tento děj závisí na dráze dvou proteinů, retinoblastomového proteinu a transkripčního faktoru p53, které jsou ústředními nádorovými supresory. V různých typech nádorů jsou tyto proteiny inaktivovány, jelikož hrají velice důležitou roli v regulaci cyklu buněčného dělení (Engeland, 2022). Mimo tuto dráhu se na regulaci podílejí další efektorové programy. Mezi ně patří zkrácení telomer a přetrvávající reakce DNA, autofagie a další metabolické změny, jako je změněná sekrece proteinů. Tyto dráhy společně přispívají ke vzniku a udržování senescentních buněk. Senescentní buňky jsou trvale zastaveny, proto je tento děj tak podobný apoptotické buněčné smrti ve svých funkcích a účincích při potlačení nádorů a nádorové terapii (Pérez-Mancera et al., 2014).

## 2 Vybrané epiteliální nádory

Epiteliální nádory jsou zhoubné novotvary vycházející z epitelové tkáně. Tyto nádory tedy vznikají z tkání pokrývajících vnitřní a vnější povrch lidského těla. Jiným označením se nazývají karcinomy. Epitelové povrchy jsou vystaveny exogenním toxinům, ozařování a často také fyzikálnímu poškození, která mohou vést ke zvýšené proliferaci se současným poškozením, změnou nebo mutací DNA. Tato poškození zvyšují míru rizika vytvoření malignity. Epiteliální nádory tvoří většinu všech lidských nádorů, mezi které patří nádor kůže, prsu, prostaty, plic, tlustého střeva, žaludku, ale také nemalobuněčná rakovina plic nebo rakovina děložního čípku, která je nejsmrtelnější. Mnohé z těchto karcinomů se vyskytují na snadno přístupných epiteliálních površích, na kterých je možné karcinomy detekovat (Rogalla et al., 2015).

### 2.1 Nádor prsu

Rakovina prsu je druhou nejčastější příčinou úmrtí žen s rakovinou. Její prevence je ve světě stále náročná. Vznik nádoru prsu je vícestupňový proces zahrnující více typů buněk. Prevencí může být včasná diagnostika. Byly objeveny kmenové buňky karcinomu prsu (BC) a mnoho genů souvisejících s BC, které odhalily patogenezi a mechanismy rezistence nádoru vůči lékům. BC patří mezi metastazující nádory, běžně může metastazovat do vzdálených orgánů, jako jsou kosti, játra, plíce a mozek. Především metastázy v mozku jsou hlavním důvodem nevléčitelnosti BC, proto může včasná diagnóza vést k dobré prognóze a vysoké míře přežití. Rizikovými faktory pro zvýšení pravděpodobnosti vzniku BC může být především pohlaví, stárnutí, rodinná anamnéza, genové mutace a nezdravý životní styl (Sun et al., 2017).

Až u 40 % patientek s metastazujícím BC se vyvíjí mozkové metastázy a přibližně u poloviny z nich je intrakraniální progresse příčinou smrti. Slibný cíl pro prevenci mozkové metastázy představují specifické vlastnosti nádorové buňky iniciující mozkové metastazování (BMIC), které jsou snadněji odhalitelné než vlastnosti buněk iniciující tumor v primárních nádorech. BMIC jsou vzácné, cyklické a mají specifické molekulové vlastnosti. Specifické cílení na tyto buňky může účinně zabránit tvorbě metastázy v mozku. Heterogenní populace pomalu a rychle cyklujících buněk je možné identifikovat *in vitro* pomocí barvení membrány PKH26. Membrána PKH26 je redukována při každém buněčném dělení, což vede k populaci pomalu a rychle cyklujících buněk. Obraz poskytuje každý pozitivní červený fluorescenční signál PHK26 větší než pozadí. Buňky, u nichž po čtyřech dnech nebylo zjištěno žádné zbývající barvení membrány PKH26, jsou definovány jako rychle cyklující

buňky. Buňky se zachovaným zbarvením jsou pomalu cyklující buňky. Tyto buňky jsou tříděny pomocí průtokové cytometrie (Berghoff et al., 2020).

## 2.2 Nádor prostaty

CaP je nejčastějším typem solidního nádoru u mužů a také zaujímá jednu z předních příček nejčastějších příčin smrti u mužů na celém světě (Ilic et al., 2018). Lokalizovaný CaP je asymptomatický. V době, kdy se objeví příznaky, je onemocnění obvykle příliš pokročilé pro vyléčení. Ještě před objevem funkčního screeningu bylo jedním z nejčastějších projevů CaP v důsledku metastáz ochrnutí v míše (Carlsson et al., 2020). Může metastazovat téměř do všech orgánů, nejčastěji však do kostí a regionálních lymfatických uzlin. Poměrně vzácná komplikace při onemocnění CaP může být způsobena maligními výpotky, bez ohledu na původ tekutiny. Vzácným případem mohou být také neobvykle velké shluky buněk způsobené pleurálním výpotkem (Jeon et al., 2018). U tohoto karcinomu se pro odhalení časného stádia používá screening sérového prostatického antigenu (PSA). Diagnostika v časném stádiu je vhodná pro léčbu a snížení celkové úmrtnosti na toto onemocnění, jako u většiny nádorů (Ilic et al., 2018). PSA pro odhalení většiny CaP však nestačí. Při zvýšené hladině PSA či pozitivním nálezu při digitálním rektálním vyšetření se dále provádí systematická biopsie prostaty pod ultrazvukovou kontrolou. Ani s těmito strategiemi však nedochází k odhalení všech případů. Dalšími metodami je počítačová tomografie (CT), magnetická rezonance a scintigrafie skeletu pro včasnou detekci vzdálených metastáz (Schlemmer et al., 2021).

U CaP je velice dobře známa role androgenní signalizace. Nebezpečným CaP dělá neznalost specifických molekulárních mechanismů, které se podílejí na jeho vývoji a progresi u pacientů. Tento problém je způsoben především nedostatkem experimentálních modelů s replikovanými důležitými charakteristikami CaP, které se vyskytují u lidí. Jedním z těchto aspektů je hormonálně indukovaná karcinogeneze nenádorových epiteliálních buněk pro porovnávání s nádorovými buňkami. Buněčné linie, které byly doposud objeveny, jsou linie z metastatických CaP, které jsou příliš pokročilé pro účinné experimentální odhalení časných stádií progresu nádoru. Použití imortalizovaných buněčných linií, jakými jsou RWPE1 nebo NHPRE1, pro porovnání s liniemi z pokročilých nádorů je kvůli genetické specifikaci každého pacienta nedostačující. Studie *Liu et al., 2019* přišla s výzkumem buněčné linie BPH1, která je netumorózní epiteliální buněčnou linií lidské prostaty. U této linie došlo po 3 a více měsících *in vivo* k růstu a dále vývoji v lokalizované a invazivní nádory, jejichž progresu byla závislá na stromatu a hormonech. Po aplikaci těchto

buněk z nádorových oblastí linie BPH1 do myšního modelu se vzniklé nádory vyvíjely nezávisle na stromatu a hormonech. Závěrem tedy bylo, že údaje naznačují produkci inherentních změn hormonální karcinogenezí buněk BPH1, které nejprve podporují tumorigenezi a později vedou k progresi do metastáz. V této studii popisují vývoj buněčných linií z nádorů xenografováných buněk BPH1. Tento model označují jako model Progrese rakoviny odvozené od BPH1 (BCaP). BCaP poskytuje molekulární aspekty a sekvenční charakter vývoje, které umožňují zkoumání léčebných zásahů specifických pro dané stadium s přímým srovnáváním s normální kontrolou, což doposud nebylo k dispozici (Liu et al., 2019).

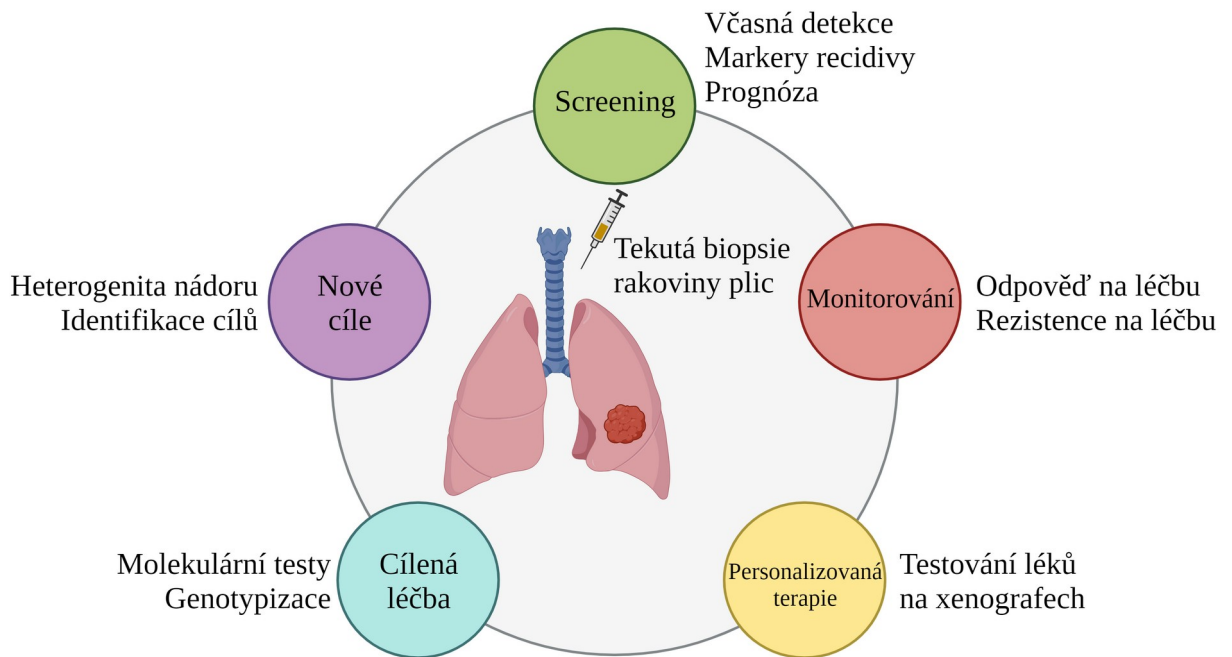
### **2.3 Nádor plic**

Nádor plic je celosvětově jednou z nejčastějších příčinou úmrtí na nádorová onemocnění. Včasná detekce a léčba pomocí screeningu se provádí pomocí nízkodávkové CT (Becker et al., 2019). Tento nádor se vyskytuje především u vysoce rizikových osob jako jsou současní a bývalí kuřáci. Osoby, které již přežily rakovinu plic, jsou vystaveny vzniku druhého primárního karcinomu plic (SPLC). Rizikovým faktorem pro SPLC je kouření tabáku, jehož ukončení může riziko SPLC snížit (Aredo et al., 2021). Většinou se jedná o malobuněčný karcinom plic (NSCLC). NSCLC má další podtypy, nejčastějšími jsou adenokarcinom a dlaždicobuněčný karcinom. Standardní terapií pro tento nádor byla v minulosti chemoterapie na bázi platiny, na tyto látky byla odpověď velice skromná a progresse onemocnění přišla za krátký čas. Nyní se jako alternativní léčba pacientů používá imunoterapie, která změnila způsob léčby pokročilého NSCLC. V imunoterapii má stoupající význam sledování inhibiční dráhy PD-1 a jejího ligandu PD-L1. Blokáci této dráhy dochází k utlumení inhibičního signálu, čímž se obnoví účinnost imunitních reakcí a dojde tak ke zvýšení protinádorové aktivity (Bodor et al., 2019).

Jednou z nejagresivnějších malignit s časným vznikem metastáz je malobuněčný karcinom plic (SCLC), který představuje pouze menšinu všech karcinomů plic. Prognóza SCLC je však stále neutěšena. Standardní léčbou první linie SCLC je platinový dublet cisplatiny nebo karboplatiny a párování s etoposidem. Agresivita SCLC spočívá ve schopnosti získu rezistence k léčbě s vysokou mírou relapsu do jednoho roku. Omezením je také nedostatek nádorové tkáně dostupné pro výzkum (Lee et al., 2020).

Pro diagnostiku se u karcinomu plic používají především krevní biomarkery, kterými jsou cirkulující nádorové buňky (CTC) a cirkulující bezbuněčné nukleové kyseliny (CfNA). CTC jsou popsány dále v samostatné kapitole, kvůli jejich jedinečným výhodám zvyšujících

přesnost při studiích oproti CfNA. CfNA se uvolňují z apoptotických nebo nekrotických nádorových buněk, které se dají detekovat v celé řadě krevních buněk. U rakoviny plic, společně s dalšími nádory, se využívá detekce CTC v obraném vzorku tekutou biopsií (Obr. 7). Tato technologie zpracování má řadu výhod, které významně přispívají jak při diagnostice, tak v *ex vivo* testování (Zhang et al., 2015).



**Obrázek 7: Přehled možností využití CTC u karcinomu plic.**  
 Vytvořeno v *BioRender.com*; upraveno dle Zhang et al., 2015.

## 2.4 Nádor tlustého střeva

Jedním z nádorů tlustého střeva je CRC, který postihuje nejen tlusté střevo, ale také konečník. Tento karcinom je nejčastěji se vyskytující zhoubný nádor trávicího ústrojí. CRC je stále nejčastější příčinou úmrtí na rakovinu, zejména kvůli chybějícímu biomarkeru včasné detekce s citlivostí a specifičností (Shen et al., 2020). Sliznice tlustého střeva je kritickou bariérou a hlavním místem imunitní regulace. Již zmíněná důležitá role imunitního systému při vzniku a léčbě rakoviny proto zde u CRC má větší váhu než u jiných nádorů. Chronická infekce nebo zánět zvyšuje riziko vzniku rakoviny (Ruan et al., 2020)

### **3 Cirkulující nádorové buňky**

CTC jsou buňky přítomné v krvi pacientů trpících nádorovým onemocněním, které mají antigenní a genetické vlastnosti určitého typu nádoru. Jsou to nádorové buňky, které jsou vylučovány buď z primárního nádoru nebo z jeho metastáz (Vasseur et al., 2020). Z metastáz se mohou uvolňovat a přecházet do krevního řečiště, kde se detekují. Fenotypizace CTCs by mohla být využita k předpovědi pro cílenou léčbu tak, aby byla co nejvhodnější. K tomu bylo použito mnoho různých metodik s různou citlivostí a specifitami. U pacientů s metastatickým onemocněním se předpokládá, že počet sledování CTC souvisí s nádorovou zátěží a může předpovídat odpověď na léčbu. Studium CTC má tedy kromě vlivu na zpřesnění prognózy také zajímavý potenciál pro zaměření na léčebné strategie pro pacienty s nádorovým onemocněním (Mavroudis, 2010).

#### **3.1 Heterogenita CTC**

Biologie CTC je stále velice neprobádaná oblast, která brání jejich maximálnímu využití s prognostickým významem, proto se zatím příliš neuplatňuje v klinických rozhodnutích. Důvodem, proč tomu tak je, jsou zprávy o heterogenitě nejen mezi primárními a sekundárními nádory, ale i v rámci samotného nádoru. V rámci nádoru může existovat až šest různých klonálních buněčných linií. Toto je příčina neúspěchu v pokusech o kultivaci CTC získaných z nádorů, jelikož jeho heterogenita se odráží v odebraných CTC (Bailey et al., 2019). Rozmanitost těchto buněk spočívá v rozdílech ve fyzikálních vlastnostech, jakými mohou být velikost, hustota, elektrický náboj a deformovanost nádorových a nenádorových krevních buněk. Tyto vlastnosti CTC jsou velmi variabilní a často se překrývají s vlastnostmi ostatních nenádorových buněk. Příkladem může být velikost. Bylo zjištěno, že fyziologická krevní buňka má průměr přibližně 10  $\mu\text{m}$ , zatímco průměr CTC je nekonzistentní, pohybuje se od 6  $\mu\text{m}$  do více než 20  $\mu\text{m}$ . Tato rozmanitost výrazně omezuje izolaci a detekci CTC (Chauhan et al., 2020).

#### **3.2 Jednotlivé CTC versus shluky CTC**

Shluky CTC jsou definovány jako skupina dvou nebo více CTC se stabilními buněčnými spoji, kvůli kterým jako jeden celek cestují krevním řečištěm. CTC nalezeny v periferním oběhu jsou většinou jednotlivé buňky s menšinovým výskytem jejich shluků. Spojené CTC mají ovšem 23 až 50krát vyšší metastatický potenciál než buňky nespojené. Proto přítomnost a velikost shluku CTC predikuje horší klinické výsledky oproti detekci jednotlivých CTC u více typů nádorů. Existence shluků je známá po dlouhou dobu, avšak



biologické mechanismy způsobující vznik, přežívání, šíření a vynikající metastazování, jsou známy jen částečně (Castro-Giner et al., 2020).

Invazivní proces metastazování je předmětem spousty studií, jelikož tento proces není dosud dostatečně prozkoumán. Jednou z prvních překážek metastazování je oddělení buňky od ECM, čímž ztratí stromální interakce a současně se vyhne buněčné smrti. Po tomto oddělení mohou vytvářet buňky shluky. Buněčná smrt spojená s odštěpením je také spojena se zvýšeným výskytem ROS. *In vitro* studie *Labuschagne et al., 2019* naznačila, že shlukování buněk může chránit shlukované buňky před ROS. Velice složitými metabolickými procesy bylo dokázáno, že shlukované buňky indukují faktory spouštějící mitofagii mitochondrií produkujících ROS a tím se chrání před buněčnou smrtí (Labuschagne et al., 2019).

### **3.3 Obohacování CTC**

Obohacování CTC je založeno na rozdílné expresi určitých povrchových buněčných molekul nebo na výrazně odlišných fyzikálních vlastnostech. Na základě rozdílů mezi fyzikálními a molekulárními vlastnostmi se rozlišují nádorové buňky od krevních buněk. Nejčastěji používané přístupy k obohacování CTC jsou závislé nebo nezávislé na fenotypových markerech. U přístupu závislém na markerech se často používá adhezivní molekula epiteliálních buněk (EpCAM), dále například receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR) nebo PSA, nádorový marker CaP a HER2 u specifických CTC pro BC. Fenotypově jsou CTC velice heterogenní a neexprimují specificky vybraný marker ve všech buňkách, kvůli tomu je obohacování CTC velmi důležité. Jediný pozitivní selekční marker však přináší zkreslení obrazu. Proto se využívá negativní selekce, při které se fyziologické krevní buňky ochudí o protilátky specifické pro různé antigeny buněčného povrchu exprimované na lidských leukocytech. Těmito povrchovými znaky jsou CD45 a CD34. Hlavní nevýhodou ale zůstává znečištění CTC obohacováním, při kterém se používá negativní selekce. Stává se také, že při této selekci dochází k neúmyslné ztrátě CTC jejich zachycením v objemu krevních buněk, proto je studium biologie CTC stále aktuální téma (Chauhan et al., 2020).

### **3.4 Izolace a detekce CTC**

Detekce cirkulujících nádorových buněk v periferní krvi může sloužit jako zdroj cenných nádorových markerů. K této detekci se používají různé markery založené na jejich expresi na epiteliálních buňkách (epiteliálně specifické markery) nebo na jejich specifické expresi v určitých tkáních (tkáňově specifické markery). Včasná detekce a určení

charakteru CTC hraje významnou roli jako prognostický a prediktivní faktor. Tento faktor je velice důležitý například při vývoji BC. CTC jsou však vzácné, proto je jejich detekce, stanovení počtu a molekulární určení charakteru velmi náročné. Tyto buňky byly detekovány u většiny epitelálních nádorů (Alvarez Cubero, 2017).

Jednou z prvních technik použitých k detekci CTC v plné krvi byla průtoková cytometrie. Tato metoda však vyžadovala použití velkého objemu vzorku, který byl třeba analyzovat, což omezovalo počet možných vzorků k analýze. Pomocí této metody byl získán první údaj o souvislosti mezi přítomností změn na epitelálních buňkách a klinickým stavem pacienta a jeho odpovědí na terapii (Andree et al., 2015).

#### **3.4.1 Komplikace spojené s detekcí CTC**

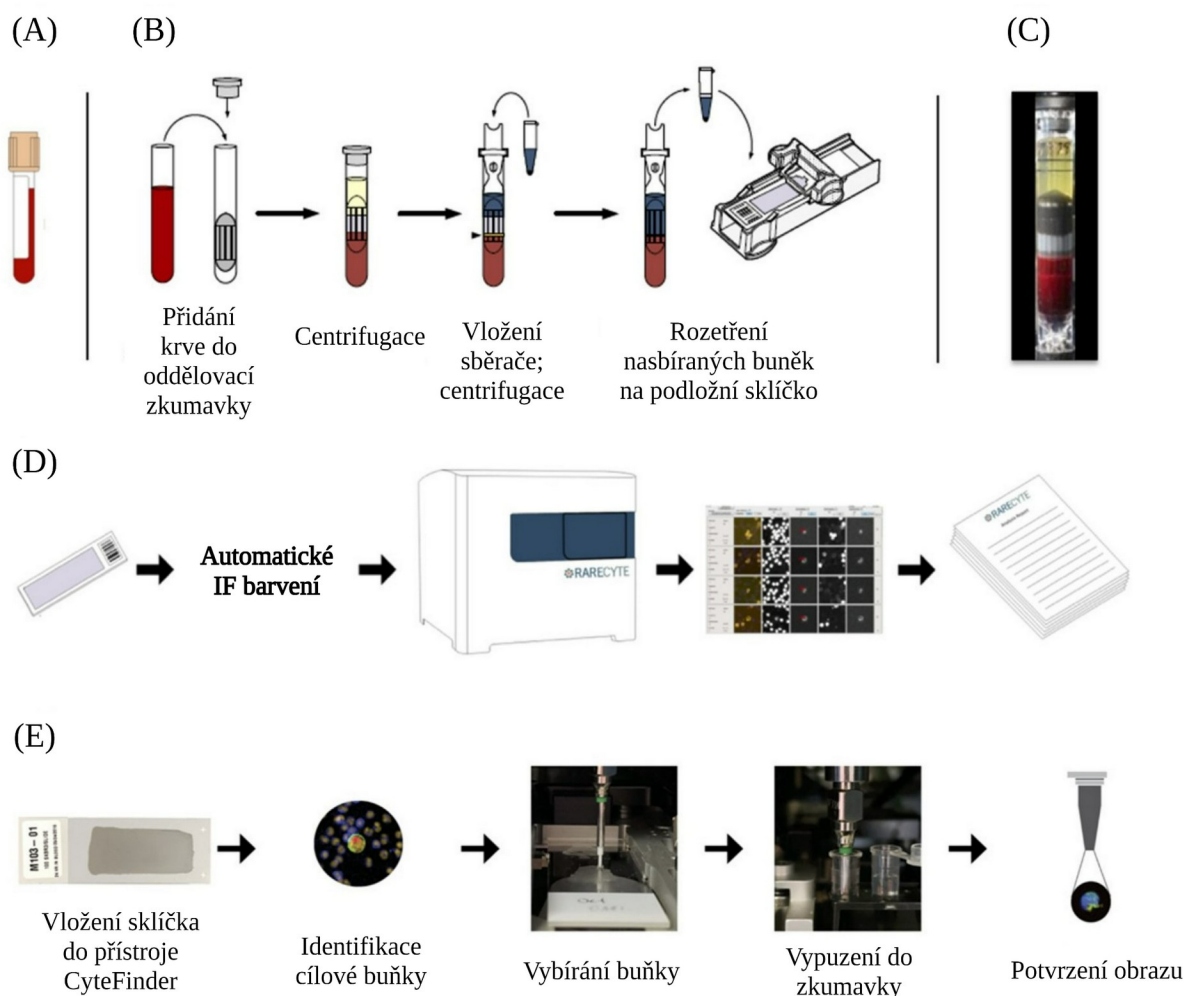
Nádorové buňky v krvi jsou přítomny vedle velkého množství hematopoetických buněk. U pacientů s metastazujícím rakovinným onemocněním se výskyt CTC pohybuje řádově okolo jednotek až desítek na mililitr plné krve. Jedním z problémů pro vývoj těchto metod k detekci je otázka, zda jsou tyto vzácné buňky v krvi vůbec přítomny. Dalším problémem je u přítomných CTC neznalost jejich frekvence. Použitím například fykoerythrinu (PE) místo protilátek konjugovaných s fluoresceinizoithiokyanátem (FITC) zlepší separaci od autofluorescence díky vyššímu kvantovému výtěžku fluorochromu PE ve srovnání s FITC. Omezením však zůstává počet antigenů přítomných na buňce. Zesílení signálu lze docílit buď zvýšením koncentrace protilátky nebo přidáním sekundární protilátky pro zvýšení signálu. Sekundární protilátka ovšem zesílí i signál pozadí, proto zohlednění frekvence buněk, které identifikujeme, je nanejvýš důležité (Andree et al., 2015).

#### **3.4.2 CellSearch systém**

Systém CellSearch byl jako první schválený americkým Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv pro stanovení počtu CTC. Toto schválení umožnilo využití detekce CTC v klinické praxi pro rozhodnutí o léčbě. Poprvé byl systém CellSearch představen v roce 2004, kdy byla prokázána analytická přesnost, reprodukovatelnost a linearita systému. V současnosti je stále zlatým standardem v identifikaci CTC (Andree et al., 2015). Systém CellSearch je vyráběn například firmou Veridex, která umožňuje jeho klinické využití u pacientů s BC, CRC a CaP (Tieng et al., 2021). Přítomnost CTC detekovaných pomocí CellSearch je spojena se špatnou prognózou metastazujících karcinomů. CTC, které jsou detekovány u pacientů po prvních cyklech léčby, ukazují na neúčinnou léčbu (Andree et al., 2015).

### 3.4.3 Platforma RareCyte

Technologie tekuté biopsie nové generace, která rozšířila diagnostické vyšetřování CTC o fenotypovou charakterizaci a molekulární analýzu jednotlivých buněk. Tato platforma je navržena pro komplexní shromažďování a identifikaci CTC, umožnění víceparametrového hodnocení jednotlivých CTC a získání jednotlivých buněk pro molekulární analýzu. Precizní práce je zajištěna čtyřmi integrovanými součástmi (Obr. 8). Prvním krokem je separace krevní frakce obsahující CTC na základě rozdílné hustoty buffy coatu z jaderných buněk červených krvinek a plazmy. Po separaci se vzorek umístí na mikroskopické sklíčko. Dále proběhne automatizované multiparametrické fluorescenční barvení (Kaldjian et al., 2018). Tato platforma používá komerčně dostupné, fluorescenčně značené protilátky, které jsou stejné jako u systému CellSearch. Mimo fluorescenčně značené protilátky používá také stejné jaderné barvivo (Werbin et al., 2017). Po barvení následuje skenování, samotná analýza a přehled obrazu (Kaldjian et al., 2018). Tyto zobrazovací techniky umožňuje přístroj CyteFinder, což je vysokorychlostní skenovací fluorescenční mikroskop s různým rozlišením. Přístrojem CyteFinder lze standardní čtyřbarevný nátěr na sklíčku AccuCyte zobrazit přibližně za 12 minut. Tato platforma navíc dokáže mechanicky získávat CTC. Platforma RareCyte využívá šest fluorescenčních kanálů, z nichž čtyři kanály slouží k identifikaci CTC a zbylé dva kanály jsou pro zkoumané biomarkery (Werbin et al., 2017).



**Obrázek 8: Pracovní postup na platformě RareCyte.**

(A) Odběr krve do zařízení pro vzorek AccuCyte, které uchovává vzorky pro zpracování až 72 h. (B) Schéma kroků při sběru nukleovaných buněk na základě hustoty a přenosu na mikroskopické sklíčko. (C) Fotografie separační zkumavky AccuCyte po počáteční centrifugaci. Frakcionace krve - plazma (nahore, žlutá), vrstva červených krvinek (dole, červená) a vrstva nukleovaných buněk obsahující CTC (šedobílý pás kolem černého plováku). (D) Schéma následného pracovního postupu analýzy CTC: automatické barvení sklíček, automatické získávání snímků skenováním a analýza snímků pomocí strojového učení systémem CyteFinder, kontrola a potvrzení kandidátních CTC a vytvoření zprávy.

IF = imunofluorescence. Upraveno dle Kaldjian et al., 2018.

### 3.5 Využití CTC v imunoterapii

Využití CTC pro imunoterapeutickou léčbu je předmětem studií už řadu let, avšak její prediktivní vliv stále není tak významný. Po léčbě zabíječskými buňkami (NK buňky) u pozdějších stádií NSCLC se objem nádoru zmenšuje, což snižuje počet CTC uvolňovaných z léze do krve. Na základě tohoto objevu se proto CTC označují jako užitečný biomarker u pacientů s malobuněčným a nemalobuněčným karcinomem plic a u dalších nádorů odvozených od epiteliálních buněk, jako je BC, CRC a CaP. Tato domněnka byla potvrzena při studiích imunoterapie NK buňkami u jaterního karcinomu,

kde byl výsledek CTC podobný, tedy že počet CTC může odrážet účinnost terapie (Ling et al., 2017).

### 3.6 *In vitro* kultivace CTC buněčných linií

Kultivace CTC je stále velikou výzvou, která je spojena zejména s omezenými znalostmi o biologii CTC, především s výsadou CTC vykazovat vysokou míru heterogenity. Pro založení kultur CTC *in vitro* se používají především dvě strategie. První strategii představují 2D neboli dvourozměrné kultivace. Adherentní podmínky jsou nejčastější volbou, zejména pro krátkodobé kultury, jelikož založení 2D kultury je jednoznačně jednodušší z hlediska času, složitosti a nákladů. Druhou strategií jsou 3D neboli trojrozměrné kultivace. Neadherentní podmínky se naopak využívají spíše pro dlouhodobé kultury. Úspěšně kultivované CTC *ex vivo* byly prvně získány od pacientů s BC, zároveň se povedlo získat důkaz o iniciaci CTC k metastazování do mozku. U spousty kultur, jako byly kultury CTC získány od pacientů s mezoteliomem, rakovinou plic, jícnu nebo hlavy a krku, nebylo možné dosáhnout dlouhodobě úspěšné kultivace, tedy delší než 14 dní, u výjimek až 50 dní. Dlouhodobá úspěšná kultivace kultur CTC se povedla u BC a CaP, dále také CRC, u kterého je to obtížnější než u jiných karcinomů (De Renzi et al., 2022).

Vyšetřování CTC *in vivo* brání jejich velmi nízký počet v krvi, zejména u pacientů s CRC. Toto je důvod, proč bylo v posledních letech nejnáročnějším úkolem vytvoření *in vitro* kultury CTC. Linie CTC by se daly využít k identifikaci metabolických drah a proteinů, které mají podíl na progresi nádoru, a také k testování nových léčiv vyvinutých k inhibici CTC schopných metastazovat. Soler et al., 2018 již dříve popsali první trvalou buněčnou linii CTC-MCC-41, která byla získána od CTC karcinomu tlustého střeva. Tato linie měla, kromě schopnosti expandovat *in vitro* po dobu více jak 4 let, také specifické vlastnosti podobné kmenovým buňkám a sdílela určité rysy původního primárního nádoru a metastáz v lymfatických uzlinách. Studie Soler et al., 2018 vydala článek o získání CTC od jediného pacienta s metastazujícím karcinomem tlustého střeva, které se povedlo úspěšně kultivovat *in vitro*. U tohoto pacienta bylo možné vytvořit jednu linii CTC tlustého střeva CTC-MCC-13, jelikož u něj byl získán největší počet CTC, konkrétně 302 CTCs/7,5 ml krve s 38 shluky CTC. Při druhém a třetím relapsu pacienta bylo možné vytvořit dlouhodobé kultury. S přibývajícími relapsy stoupal počet získaných CTC, konkrétně u druhého 3278 CTCs/7,5 ml krve a 962 shluků, v době třetího již bylo vytvořeno sedm nových linií. Závěrem této studie bylo odvození výsledku, tedy že u karcinomu tlustého střeva je k výběru CTC schopných metastazování, které se mohou sebeobnovovat a růst *in vitro*, zapotřebí

přibližně 300 CTC. Zajímavostí byly buněčné snímky získané pomocí systému CellSearch, které ukazovaly detekci obřích a velmi malých CTC z prvního vzorku, zatímco době třetího relapsu, v posledním vzorku pacienta, byly přítomny pouze malé, 4-6  $\mu\text{m}$ , a velmi malé CTC, 8  $\mu\text{m}$  (Soler et al., 2018).

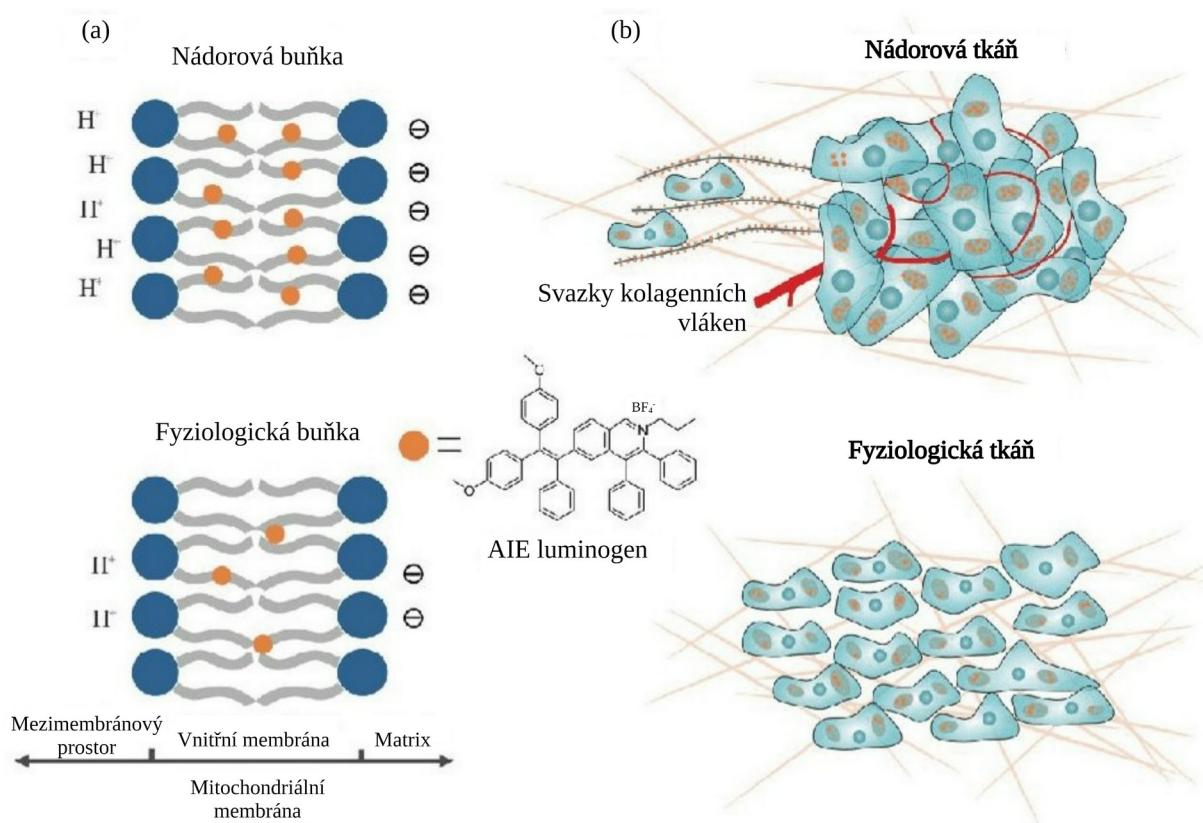
Velice významná, pro pokroky k účinnější léčbě SCLC, je také kultivace linií získaných ze vzorků periferní krve pacientů s patologicky potvrzeným SCLC. Studie *Lee et al., 2020* uvádí článek o vytvoření účinného a reprodukovatelného protokolu pro expanzi CTC *ex vivo* a charakterizaci jejich fenotypu. Tato linie by měla mít potenciální využití pro zlepšení personalizované terapie rakoviny. Úspěšně vykultivovali CTC od 18 z 22 pacientů s SCLC, u kterých vypracovali velmi efektivní postup. Na kultivačních destičkách, potažených samoskladnými binárními krystaly, pozorovali po 14 dnech sféroidy CTC, které se dále zvětšovaly. Se zvětšováním se zvyšoval také počet CTC. Životaschopných CTC byla jak po 14, tak po 40 dnech stále většina. S tímto výsledkem bylo závěrem pozorování různých tvarů expandovaných CTC pod mikroskopem v jasném poli. Typicky se morfologická konstrukce skládala ze tří různých prezentovatelných typů: velkorozměrných kohezivních sféroidů kulatého tvaru, malorozměrných kohezivních nepravidelných nebo kulatých sféroidů a diskohezivních hroznovitých sféroidů (Lee et al., 2020).

## 4 Diagnostika

Nádorová onemocnění jsou jednou z nejhlavnějších příčin úmrtí. Z tohoto důvodu je včasná diagnóza pro pacienty životně důležitá. Diagnostika, nejen nádorových onemocnění, je významným zdrojem dat pro další lékařské analýzy (Fotouhi et al., 2019). U pacientů se dá provést řada vyšetření, která vedou k odhalení nádoru. Počátkem mohou být fyzikální vyšetření, jako jsou základní klinická, gynekologická nebo kožní vyšetření. Přesnějšími metodami jsou vyšetření genetická, endoskopická, radiologická nebo například vyšetření pomocí radionuklidů metodou PET. Zde jsou podrobněji popsána vyšetření laboratorní, mezi která patří vyšetření krve, moči a jiných tělních tekutin (maligní výpotky), cytologická, histologická a histopatologická vyšetření, v neposlední řadě také diagnostika pomocí prediktivních a prognostických markerů. Řada metod je založena na viditelnosti změněných buněk pomocí diagnostických obarvení tkáně či na reakcích s protilátkami, které se odhalují pomocí metod jako je enzymová imunisorpční analýza (ELISA).

### 4.1 Emise indukovaná shlukováním

Standardním vyšetřením zůstává konvenční histopatologie, u které existuje riziko falešné diagnózy a dlouhé čekací doby, proto se využívá pro biologické zobrazení *in vitro* emise indukovaná shlukováním (AIE). AIE je nový fotofyzikální jev široce používaný pro identifikaci maligních buněk v pozoruhodném zobrazovacím kontrastu. Přes složitost složení nádorových tkání se luminogenem AIE barví cíleně mitochondrie k lokalizaci rakoviny a metastatické dráhy v čerstvém CRC (Obr. 9). Tento luminogen zaměřený na mitochondrie dokáže účinně oddělit maligní od fyziologických buněk *in vitro*. Příkladem barvení buněk v kolorektální tkáni je pomocí TPE-IQ-2O, který je uměle syntetizován, nebo pomocí TTVP, což je barvivo cílené na membrány. Po obarvení jsou tkáně pozorovány pod konfokálním mikroskopem (Shen et al., 2020).



**Obrázek 9: Mechanismus selektivního barvení luminogenem AIE.**

Rozdíl membránových potenciálů mitochondrií vyvolaný specifickým nádorovým barvením TPE-IQ-2O v kolorektální tkáni. (a) Schématické znázornění rozdílu membránových potenciálů mitochondrií mezi nádorovou a fyziologickou buňkou. Hyperpolarizované transmembránové napětí v mitochondrii nádorové buňky usnadňuje akumulaci většího množství barviva uvnitř nádorové buňky. (b) Rozdílné mikroprostředí mezi nádorovou a fyziologickou tkání. Obohacená barviva AIE v nádorových buňkách následně rozlišují morfologický rozdíl, který odliší nádorovou buňku od nenádorové.

$H^+$  = protonový kation; AIE = emise indukovaná shlukováním.

Upraveno dle Shen et al., 2020.

## 4.2 Proteiny jaderné matrix

Jaderná matrix (NM), která se nachází v nukleoplazmě, je strukturální rámec jádra skládající se z periferních lamin a pórových komplexů, vnitřní síť ribonukleových proteinů a zbytkových nukleonů. NM obsahuje proteiny přispívající k zachování tvaru jádra a jeho uspořádání, což umožňuje prostorovou organizaci replikace DNA, transkripce a opravných procesů. V těchto strukturách se nachází řada enzymů a transkripčních faktorů. V NM se nacházejí proteiny jaderné matrix, které mají významnou roli při vývoji BC, CRC a CaP. K diagnostice přispívají rozdíly jaderné matrix transformovaných a normálních buněk, které mohou spočívat ve složení lipidů. Konkrétně v transformovaných buňkách je více kardiolipinu a neutrálních lipidů. Struktura NM se také zapojuje do cest maligní transformace



kvůli jejímu hromadění chemických karcinogenů a onkogenních virových proteinů (Sjakste et al., 2004).

### 4.3 Maligní výpotky

Buněčné kultury maligních výpotků pacientů s různými druhy rakoviny mají několik možností využití. Těmi možnostmi je hodnocení odpovědi na chemoterapeutika, *in vitro* charakterizace neoplastických buněčných linií, zkoumání nádorové heterogenity, pochopení úlohy EMT při metastazování a vysokém počtu terapeutických selhání. Pro diagnostiku, určování primárního místa metastazování nádorů a sledování pacientů s nádory s vysokou incidencí a mortalitou, jako je například BC a karcinom plic, se používá cytologie výpotků a peritoneální laváže v laboratořích patologické anatomie. Buněčné typy obvykle identifikované cytologií benigního výpotku jsou mezotelové buňky, makrofágy a leukocyty, u maligních výpotků pak i neoplastické buňky. Povahu maligních buněk umožňují definovat výpotky s vysokou buněčností a charakteristickými morfologickými aspekty. Vzorky výpotků se pro cytologické a imunocytochemické analýzy barví Papanicolaouovou metodou. Pro výsledky se posuzuje malignita vzorků, pokud jsou ve vzorku, či nejsou nalezeny markery malignity (Carneiro et al., 2017).

Jednou z možností diagnózy malignit u serózních výpotků je cytologie, ačkoli může být náročná. Používá se imunocytochemický panel (ICC) s komerčně dostupnými monoklonálními či polyklonálními protilátkami, které jsou specifikovány v tabulce 1, například proti karcinoembryonálnímu antigenu (CEA), epiteliálnímu membránovému antigenu (EMA) nebo cytokeratinu (CK). Rutinní cytologické vyšetření pleurální, peritoneální a perikardiální tekutiny je preferovanou metodou pro detekci metastazující malignity v tělních tekutinách. Panel ICC je užitečná zejména v případech, které jsou klinicky podezřelé z malignity, ale cytologicky jsou negativní kvůli malému počtu maligních buněk nebo jejich nevýraznosti. Tato diagnostika může být náročná zejména kvůli různorodosti buněk ve vzorku, které mohou být jak maligní, tak zánětlivé nebo mezoteliální. Ačkoli je ICC citlivější a specifitější než ostatní metody s komerční dostupností reagensů, zatím nebyla objevena jediná protilátka schopná důsledně odlišit metastatický karcinom od benigních reaktivních mezoteliálních proliferací nebo od maligního mezoteliomu (Nance and Silverman, 1991).

**Tabulka 1: Přehled panelu protilátek.**

EMA = epiteliální membránový antigen; CEA = karcinoembryonální antigen; Leu = leukocyt; CK = cytokeratin; VIM = vimentin. Upraveno dle Nance and Silverman, 1991.

Protilátka	Specifikace protilátky
EMA	Monoklonální protilátka proti buněčným membránám lidského karcinomu prsu
CEA	Polyklonální protilátka
B72.3	Monoklonální protilátka proti buněčným membránám lidského karcinomu prsu
Leu-M1	Monoklonální protilátka proti lidskému myelomonocytárnímu antigenu
Vysoko- a nízkomolekulární CK	Monoklonální protilátka
VIM	Monoklonální protilátka
S-100 protein	Polyklonální protilátka
Společný antigen leukocytů	Monoklonální protilátka

Diagnostika maligního pleurálního výpotku (MPE) v pleurální tekutině se provádí pro identifikaci maligních buněk. Nejčastěji se u MPE vyskytuje metastazující adenokarcinom. Nejčastějšími příčinami MPE jsou od nejčastějšího karcinomu plic po méně časté karcinomy vaječníků, žaludku, lymfom, a BC. Nejčastější místa atypických metastáz jsou uváděny plíce a pleura, dále játra, lymfatické uzliny a nadledviny (Jeon et al., 2018).

## 4.4 Diagnostické markery

### 4.4.1 Tumormarkery

Tumormarkery, jiným označením nádorové markery, jsou heterogenní skupinou látek uvolňovaných nádorovými buňkami, nebo jinými buňkami v reakci na nádor, do krevního oběhu, ale také exprimovaných zdravými tkáněmi. U zdravých osob jsou v plazmě či séru ve velmi nízkých koncentracích. Mohou se vyskytnout i falešně pozitivní výsledky u pacientů s benigními stavy. Pacienti s rakovinou mají tendenci vykazovat zvýšené hladiny korelující s objemem nádoru. Správná interpretace výsledků tumormarkerů může být náročná, s mnoha správnými faktory přes preanalytické podmínky po souběžná onemocnění pacienta. Měření tumormarkerů nabízí cenné informace pro léčbu pacientů s nádorovým onemocněním, dále při diagnostice, odhad prognózy, usnadnění včasného odhalení relapsu a sledování odpovědi na léčbu. V tabulce 2 je naznačený přehled tumormarkerů, které se stanovují při epiteliálních nádorech a jejich léčbě (Filella et al., 2022).

**Tabulka 2: Přehled tumormarkerů epitelálních nádorů.**

AFP =  $\alpha$ -fetoprotein; CA = nádorový antigen; CEA = karcinoembryonální antigen; CYFRA 21-1 = fragment cytokeratinu 19; HER2/neu = transmembránový protein; HE-4 = lidský nadvarlatový protein; NSE = neuron specifická enoláza; PSA = prostatický specifický antigen; SCCA = antigen dlaždicobuněčného karcinomu.

Upraveno dle Filella et al., 2022.

Tumormarker	Přidružené malignity
AFP	hepatocelulární karcinom
CA 15-3	BC
CA 125	karcinom vaječnicků, plic
CA 19-9	CRC, karcinom slinivky břišní, žlučových cest, vaječnicků
CA 72-4	karcinom žaludku, vaječnicků
kalcitonin	medulární karcinom štítné žlázy
CEA	CRC, BC, NSCLC, karcinom žaludku, jícnový adenokarcinom
chromogranin A	neuroendokrinní nádory
CYFRA 21-1	NSCLC
HER2/neu	BC
HE-4	karcinom vaječnicků
NSE	neuroendokrinní nádory, NSCLC
ProGRP	NSCLC
PSA	CaP
S100 proteiny	maligní melanom
SCCA	dlaždicové nádory
thyreoglobulin	folikulární karcinom štítné žlázy

#### 4.4.1.1 Karcinoembryonální antigen

CEA je glykoprotein, který se podílí na buněčné adhezi a může být zvýšený u řady nádorových onemocnění. Při diagnóze jeho zvýšená hladina předznamenává negativní prognózu (Seale et al., 2022). Je označován jako velice důležitý diagnostický antigení marker, který se používá například pro identifikaci vyvolávání specifické protinádorové imunitní odpovědi. Fyziologicky je jako onkofetální antigen CEA exprimován během vývoje plodu, ale v nízkých hladinách také v gastrointestinálním epitelu dospělých (Sarobe et al., 2004). Jeho exprese byla nejprve zjištěna u CRC a následně u karcinomů aerodigestivního traktu a dalších orgánů (Kuo et al., 2020). CEA se dále objevuje v široké škále adenokarcinomů, jako je právě karcinom žaludku, PDAC, CRC, BC atd.

(Sarobe et al., 2004). Vedle diagnostiky karcinomu plic pomáhá sledovat recidivu, určovat prognózu karcinomu a hodnotit účinnost jeho léčby. Snížení hladina CEA může předpovídat objektivní odpověď a přežití bez progresu (PFS), nikoli však celkové přežití (OS). Zvýšená hladina CEA se může vyskytovat i u nenádorových onemocnění, jeho hladiny v séru ovlivňuje mnoho faktorů, včetně fyziologických, metabolických a cirkulačních faktorů (Yang et al., 2021). Sérový CEA se používá jako marker spolu se zobrazovacími metodami. Diagnostikovat ho lze pomocí cytologie a histologie, konkrétně pak elektrochemiluminiscenční imunoanalýzou na automatickém analyzátoru. Jeho využití bylo dále navrženo pro měření CEA před operací a po ní, jelikož poskytuje cenné informace pro předvídání progresu onemocnění a pro určení adjuvantní léčby u časných stádií karcinomu plic (Kuo et al., 2020).

Kromě využití CEA při diagnostice rakoviny u pacientů se také používá při studiích a vývoji protinádorových léčiv, *in vivo* i *in vitro*. Studie *Pramanik et al., 2022* uvádí terapeutickou účinnost nanoformulátu *in vitro* na 2D monovrstvých kulturách CRC a 3D sféroidech i na myších nesoucích nádorové xenografty. Tato účinnost prokázala selektivitu vůči buňkám exprimujícím CEA. Pro docílení zneškodnění rakovinných buněk používají kubozomy, což jsou porézní lyotropní kapalné krystalické nanočástice využívané jako perspektivní nosiče léčiv. Po jejich cíleném podání vykazovaly rakovinné sferoidy maximální buněčnou smrt ve srovnání s nenádorovými buňkami. Xenografty CRC vykazovaly velký pokles objemu nádoru, žádnou toxicitu mimo cíl a zvýšenou míru přežití. Studie také popisuje sledování lokalizace kubozomů pomocí fluorescenčních značek, které ukázaly přednostní vychytávání cílených kubozomů rakovinnými buňkami exprimujícími CEA (Pramanik et al., 2022).

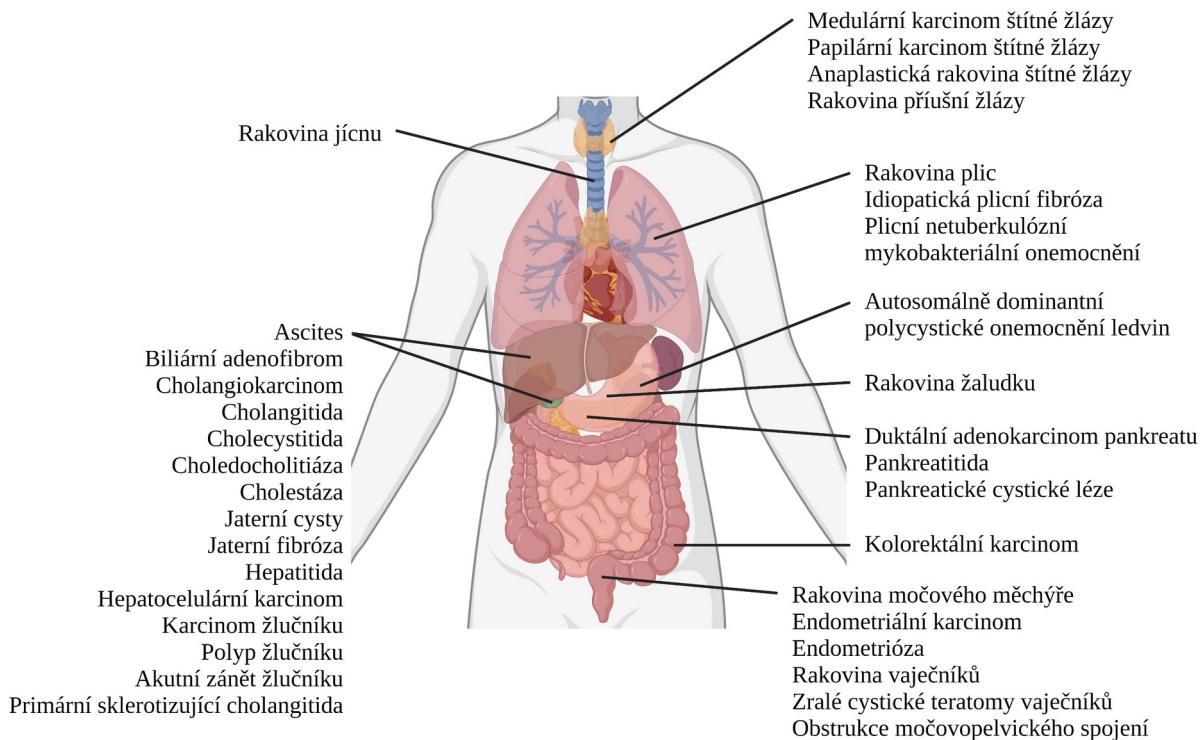
#### 4.4.1.2 Nádorový antigen 15-3, 125, 19-9, 72-4

Nádorový antigen (CA 15-3) je velký mucinový glykoprotein kódovaný genem MUC1 a jeho epitop se nachází na episialinu. Tento gen MUC1 je exprimován na povrchu duktálních buněk žlázových epitelů, což vede k produkci CA 15-3. Po této produkci dochází k inhibici lýze nádorových buněk a snížení interakce mezi buňkami. Během malignity dochází ke ztrátě buněčné polarity, proto jsou proteiny uvolňovány po celém povrchu buněk a jsou vylučovány do oběhu (Elakkiya et al., 2017). Zvýšené hodnoty sérového CA 15-3 v době diagnózy jsou spojeny s vyšším stádiem BC, velikostí nádoru a horším přežitím bez onemocnění i OS (Seale et al., 2022). Obecně se klinicky diagnostikuje na základě fyzikálního a radiologického vyšetření. Vedle CA 15-3 se pro diagnostiku metastazujícího BC používají ještě zmíněný

CEA a CA 125. Mají ovšem nízkou citlivost, proto se obvykle používají spíše pro následné sledování než pro včasnou diagnostiku (Chen et al., 2020).

CA 125 je široce používaným tumormarkerem pro diagnostiku a sledování karcinomu vaječníků. Avšak ne u všech karcinomů vaječníků se hladina CA 125 zvyšuje. Kvůli vysoké míře falešné pozitivitu u benigních gynekologických onemocnění, jako jsou například cysty, se tento marker nepoužívá samostatně pro diagnostiku karcinomu vaječníků. S CA 125 se používá lidský nadvarlatový protein 4 (HE-4) jako diagnostický nádorový marker pro karcinom vaječníků (Kim et al., 2018).

CA 19-9 je komplex glykoproteinů na povrchu buněk, který je nejčastěji spojován s diagnostikou PDAC. Poprvé byl popsán v buněčné linii CRC. Historicky je tento tumormarker jeden z nejpoužívanějších pro diagnostiku, léčbu a prognózu PDAC. Tento glykoprotein není používán pouze pro PDAC, ale jeho zvýšená hladina se také může používat jako indikace k operaci při podezření na benigní onemocnění slinivky břišní. Dalším častým použitím CA 19-9 ve žlučových cestách zahrnuje jeho využití jako doplňku při diagnostice cholangiokarcinomu. V poslední době se klinická hodnota CA 19-9 hodně rozšířila. Potenciálně se dá využít při vyšetřování pacientů na nádory gastrointestinálního traktu, jakým je například CRC či karcinom jícnu. CA 19-9 je produkován duktálními buňkami ve slinivce břišní, žlučovém systému a epitelálními buňkami v žaludku, tlustém střevě, děloze a slinných žlázách. Většinový výčet možností jeho diagnostického využití pro řadu onemocnění, benigních a maligních, je naznačen v obrázku 10 (Lee et al., 2020).



**Obrázek 10: Přehled onemocnění diagnostikovaných pomocí CA 19-9.**

Vytvořeno v *BioRender.com*; upraveno dle Lee et al., 2020.

CA 72-4 je druh nádorového polymorfního epiteliálního mucinu, který je vysoce exprimován v lidských adenokarcinomech, například žaludku, tlustého střeva, plic a BC. Nejvíce je využíván v diagnostice a hodnocení prognózy karcinomu žaludku. Karcinom žaludku by neměl být opomíjen. Ve fyziologických tkáních je jeho exprese nízká. Tento biomarker má veliký potenciál u vývoje účinné metody ke snížení toxicity cílené léčby CA 72-4, která byla nedávno vyvinuta (Xu et al., 2021).

#### 4.4.1.3 Fragment cytokeratinu 19

Fragment cytokeratinu 19 (CYFRA 21-1) je prognostickým markerem NSCLC. Hladina CYFRA 21-1 v séru se také používá jako pomocná metoda pro diagnostiku dlaždicobuněčného karcinomu plic. Nejvíce se využívá jako prediktor odpovědi na léčbu inhibitory tyrozinkinázy EGFR u pacientů s NSCLC s mutací EGFR4 (Shirasu et al., 2018).

CYFRA 21-1 spolu s CEA jsou dva biomarkery mnoha druhů rakovin, včetně zmiňovaného karcinomu plic, dále rakovina ústní dutiny a CRC. Tyto dva antigeny jsou naležitelné jak ve slinách pacientů s onemocněním, tak u zdravých lidí, u kterých jsou jejich koncentrace velmi nízké. Jednoduchá a snadná detekce CEA a CYFRA 21-1 opět poskytuje informace ke sledování progresu nádorů a hodnocení různých typů jejich léčby.

Metodami pro detekci může být ELISA, elektrochemické senzory, elektrochemiluminiscence a fotoelektrochemické imunosenzory (Joshi et al., 2022).

#### 4.4.1.4 *Prostatický specifický antigen*

PSA je nejdůležitější tumormarker pro diagnostiku CaP. Přítomnost tohoto onemocnění vzniká při zvýšené hodnotě PSA v séru. Příznaky se objevují, když je onemocnění v pokročilém stádiu. Neexistují žádné specifické zobrazovací metody nebo biomarkery pro diagnostiku rozsahu onemocnění kromě PSA (Tateishi, 2020). Již v minulém století bylo objeveno, že PSA dokáže odhalit více CaP v organicky ohraničeném, klinicky lokalizovaném stádiu ve srovnání s hodnocením hmatných nádorů pomocí digitálního rektálního vyšetření. Jeho diagnostika nejen opět snižuje úmrtnost způsobenou CaP, ale je také velice dobře prognosticky využitelný při měření PSA u mužů středního věku pro stanovení rizika budoucího života ohrožujícího CaP (Carlsson et al., 2020).

#### 4.4.1.5 *Antigen dlaždicobuněčného karcinomu*

Antigen spinocelulárního, neboli dlaždicobuněčného, karcinomu (SCCA), je nádorově specifický antigen využívaný pro své biologické funkce a význam ve fyziologických a patologických procesech. SCCA je využitelný buď pro diagnostiku dlaždicových nádorů, nebo pro sledování odpovědi na radioterapii či chemoterapii, recidivy nádorů a selhání léčby. Poprvé byl tento antigen izolován ze tkání dlaždicobuněčného karcinomu děložního hrdla. Skládá se ze dvou vysoce homologních izoform, SCCA1 a SCCA2. Tyto izoformy jsou kódovány geny SERPINB3 a 4 a nachází se na dlouhém raménku chromozomu 18. SCCA1 a SCCA2 se nacházejí především v cytoplazmě, což se může za různých podmínek měnit, proto lze tyto izoformy detekovat také v cytozolu, jádře, plazmatické membráně nebo lysozomech (Zhu, 2022).

#### 4.4.2 **Celulární markery cirkulující nádorových buněk**

Cirkulující biomarkery mají potenciál poskytnout cenné informace o vývoji onemocnění a odpovědi na léčbu. Mohou sloužit k identifikaci využitelných mutací a charakteristiky nádoru, které nasměrují léčbu. Tyto biomarkery lze sbírat s vyšší frekvencí než zobrazovací metody nebo odběry vzorků tkání, což potenciálně umožňuje informovanější léčbu (Seale et al., 2022).

Detekce CTC se provádí pomocí celulárních markerů na systému CellSearch, který byl již zmíněn. Tato metoda izoluje CTC ze 7,5 ml plné krve smícháním s ferrofluidem, který je složený z magnetických částic potažených protilátkami proti EpCAM. Po magnetické

extrakci CTC se aplikuje multiplexní barvení pomocí imunofluorescenčně značených monoklonálních protilátek. Tyto značené protilátky se po permeabilizaci buňky aplikují na vnitrobuněčný znak epiteliálních buněk CK 8, 18 a 19. Dále je populace značena protilátkami proti povrchovému znaku CD45, což zajistí negativní selekci buněk krevní řady. Pomocí jaderného barviva DAPI (4',6-diamin-2-fenylindol) je značená DNA, která zajistí možnost detekovat CTC. Vizualizace buněk je zajištěna poloautomatickým fluorescenčním mikroskopem. CTC jsou identifikovány jako jaderné buňky exprimující CK a EpCAM, bez exprese CD45. Významným negativním prognostickým faktorem pro PFS i OS je zvýšený počet CTC, který je pro metoda CellSearch definovaný jako 5 a více CTC na 7,5 ml krve (Dirix et al., 2022).

#### *4.4.2.1 Adhezivní molekula epitelových buněk*

Některé systémy záchytu CTCs jsou založeny na použití protilátek proti povrchovým antigenům buněk. Nejčastěji se používá již zmíněná EpCAM. Její exprese je prakticky univerzální v buňkách epiteliálního původu a v krevních buňkách chybí. Tímto rozdílem se odlišují CTC od krevních buněk při detekci CTC. Konjugace buněk proti EpCAM se používá k obohacení CTC z krve pacientů s BC, CRC a CaP.

#### *4.4.2.2 Cytokeratin*

CK patří do skupiny proteinů intermediárních filament cytoskeletu. Tato skupina je specificky exprimována v epiteliálních buňkách. Širokospektré protilátky proti CK rozpoznávají jediný epitop společný většině CK a jsou součástí souprav pro izolaci CTC. CK se také používají při detekci a charakterizaci CTC po různých postupech obohacování. Po přechodu do mezenchymu mohou být jednotlivé proteiny CK méně regulovány v epiteliálních nádorech, jako je BC. Detekce několika proteinů CK současně však snižuje počet falešně negativních výsledků, které jinak vznikají tímto postupem.

Zejména u BC patří CK19 mezi nejstudovanější markery, hlavně kvůli jeho stabilitě a hojné expimaci na epiteliálních buňkách BC. Tento marker byl úspěšně použit k detekci buněk BC v kostní dřeni, lymfatických uzlinách a periferní krvi.

#### *4.4.2.3 Vimentin na povrchu buněk*

Malá skupina fenotypových změn CTC je spojena s fenoménem EMT nebo jsou jeho částečným důsledkem. Proces EMT zahrnuje tvorbu metastatických nádorových buněk. Tyto buňky získávají expresi mezenchymálních markerů, jako je VIM,



a ztrácejí epiteliální markery včetně EpCAM, což může vést k využití VIM jako markeru pro detekci mezenchymálních CTC z některých nádorových onemocnění, např. sarkomů.

#### *4.4.2.4 Receptor epidermálního růstového faktoru*

Signalizace EGFR je důležitá pro normální vývoj epitelu a pro proliferaci, motilitu, přežití a metastazování nádorových buněk. Dnes víme, že je tato signalizace nadměrně exprimována u konkrétních případech BC. Bylo prokázáno spojitost mezi inhibicí EGFR a potlačením EMT a následné snížení schopnosti buněk migrovat a přicestovat. Exprese EGFR byla nalezena a potvrzena u 18-25 % BC a souvisí s vyšším rizikem relapsu a úmrtí na BC. Tento marker se však již nepovažuje za hlavní, jelikož nebyl pozorován žádný statisticky významný rozdíl v klinickém výsledku mezi EGFR pozitivními a EGFR negativními pacienty (Alvarez Cubero, 2017).

## 5 Terapie nádorových onemocnění

Za účelem snížení počtu úmrtí na nádorová onemocnění byla v posledních letech vyvinuta řada strategií pro zlepšení léčby, kterými je chirurgie, radioterapie, chemoterapie, imunoterapie, cílené léčby, hormonální léčby, nebo transplantace kmenových buněk (Krzyszczuk et al., 2018).

### 5.1 Chemoterapie

Chemoterapie je hlavní a běžná léčebná metoda, která využívá chemické léky k usmrcení nádorových buněk. Tato technika ovlivňuje zdravé fyziologické tkáně, protože je nespecifická a má toxické nežádoucí účinky. Na úspěšnosti chemoterapie se podílí mnoho faktorů, včetně typů léků, dávkování, formy, farmakokinetiky, rezistence a toxicity (Yousefi Rizi et al., 2022).

Významným mezníkem pro chemoterapii bylo objevení aktinomycinu D, které se označoval za průkopníka při hledání dalších protinádorových antibiotik, včetně antracyklinů, mitomycinu a bleomycinu (Amjad et al., 2023). Obecně je však známo, že existuje pouze malé množství experimentálních údajů, které by potvrzovaly, že obtížnost chemoterapie spočívala v rozdílech rychlosti proliferace nádorových buněk a tedy jiné odpovědi pacientů na léčbu. Jisté je, že citlivost na chemoterapii určují mechanismy na buněčné úrovni a složení mikroprostředí nádoru (Tilsed, 2022).

Předpokladem fungování protinádorové léčby je vyvolání apoptózy v nádorových buňkách (Dimri, 2005). Cílem chemoterapie je potlačit buněčnou proliferaci a množení tumoru, čímž se zabrání invazi a metastázám. To má ovšem za následek toxické účinky i na fyziologické buňky. Inhibice růstu nádoru může probíhat a několika úrovních v buňce a jejím prostředí. Tradiční chemoterapeutické látky primárně ovlivňují makromolekulární syntézu a funkci neoplastických buněk interferencí s DNA, RNA, či proteinů, nebo ovlivňují vhodnou funkci předem vytvořené molekuly. Pokud je interference v makromolekulární syntéze či funkci postačující, vede k buněčné smrti spuštěním apoptózy nebo v důsledku přímého účinku chemoterapeutika. Toxicita cytotoxických léků je nejvýznamnější během S-fáze buněčného cyklu kvůli syntéze DNA. Vinca alkaloidy a taxany působí v M-fázi a blokuje tvorbu mitotického vřeténka.

Výzkumy v biologii rakovinných buněk vedly k významnému nahlédnutí do mechanismů apoptózy, angiogeneze, metastáz, transdukce buněčného signálu, diferenciaci, modulace růstových faktorů. Výzkumníci tedy navrhuji molekulárně cílenou

terapii na zmíněné dráhy, selektivně inhibovat růst, např. zaměřit se na buněčnou signalizaci nebo angiogenezi, či blokovat degradaci proteinů.

Chemoterapii lze podávat v neoadjuvantní, adjuvantní, kombinované a metastatické léčbě. Neoadjuvantní terapie je léčba podávaná před primární léčbou. Adjuvantní terapie je léčba podávaná navíc k počáteční terapii, které může potlačit nebo eliminovat růst okultních rakovinných buněk, přičemž se nyní používá jako standard u BC, CRC, karcinomu plic a rakoviny vaječníků. Kombinovaná léčba, jakou je chemoterapie a ozařování, se používají ke zmenšení nádoru před operací nebo k záměru léčby tumoru vyskytujících se v hlavě, krku, plicích, análu. Příkladem kombinované chemoterapie je léčebný režim bleomycin, vinblastin, cisplatina pro rakovinu varlat (Amjad et al., 2022).

## 5.2 Radioterapie

Radioterapie (RT) je léčba rakoviny, při které se používají vysoké dávky záření k usmrcení rakovinných buněk a zmenšení nádoru. Velkým neřešitelným problémem stále zůstávají vedlejší účinky na fyziologickou tkáň. Menší vedlejší účinek na zdravou tkáň má použití radiosenzibilizátorů, které mají nízkou toxicitu. Radiosenzibilizátory jsou látky používané pro zvýšení smrtícího účinku na nádorové buňky. RT je typicky léčba nádorových buněk pomocí vysokoenergetického fotonového záření, jako jsou rentgenové paprsky nebo  $\gamma$ -paprsky. RT může působit přímými mechanismy, tedy způsobovat zlomy v DNA, které vedou k ukončení buněčného dělení a proliferace, nebo dokonce k buněčné smrti. Druhými mechanismy jsou nepřímé, kde záření vyvolá tvorbu ROS. Tvorba ROS vede k vyvolání buněčného stresu, čímž dochází k poškození biomolekul a nakonec změně buněčné signální dráhy (Gong et al., 2021).

## 5.3 Imunoterapie

Imunoterapie je zaměřená především na imunitní systém člověka, který hraje klíčovou roli při sledování a ničení nádorových buněk. Nádorové buňky mohou přirozenou obranu obejít, tím vytvoří toleranci prostřednictvím zvýšené regulace klíčových kontrolních bodů imunitního systému. Imunoterapeutika fungují na bázi blokace interakcí kontrolních receptorů zabezpečujících imunitní rezistenci a ligandů v imunitním systému pacienta. Blokace vede k lepší aktivaci efektorových a cytotoxických T-lymfocytů, které reagují na nádorové buňky (Bodor et al., 2019).

Systémy pro podání imunoterapie se rozdělují do pěti skupin, těmito skupinami jsou konkrétně inhibitory kontrolních bodů, cytokiny podporující lymfocyty, upravené T-lymfocyty (T-buňky CAR T) a T-buněčné receptory, agonistické protilátky

proti kostimulačním receptorům a vakcíny proti rakovině (Riley et al., 2019). Prokázaný přínos přežití oproti chemoterapii prokázaly inhibitory programované smrti nivolumab a pembrolizumab spolu s inhibítozem PD-L1 atezolizumabem. V současné době se imunoterapie používá pro léčbu například u karcinomu plic, konkrétně u pokročilého NSCLC, jelikož je zajímavou alternativou léčby bez akutní řídící mutace. Látky, jako jsou nivolumab, pembrolizumab a atezolizumab, byly schváleny pro léčbu metastazujícího NSCLC v druhé linii léčby (Bodor et al., 2019).

## ZÁVĚR

V této práci jsem se pokusila shrnout možnosti současné diagnostiky maligně transformovaných buněk. První část textu je zaměřena především na charakteristiku, tedy čím se vyznačuje buňka, která je maligně změněná a jak se rozšiřuje do dalších tkání. Dále jsou popsány procesy, kterými se buňka může chránit před procesem maligní přeměny. Pokud ani těmito mechanismy buňka nezanikne, mění se v buňku nádorovou. Mechanizmy způsobující buněčnou smrt potencionálně maligních buněk, kterým nádorová buňka úspěšně uniká, jsou zkoumány při studiích v oblasti diagnostiky, prognózy a terapie rakovinných onemocnění.

V hlavní části této práce jsou popsány epiteliální nádory, které vznikají po mutaci epitelových buněk orgánů. Tyto karcinomy jsou diagnostikovány pomocí cirkulujících nádorových buněk, které představují významnou metodu. Izolace a detekce těchto vzácných buněk je však stále velice náročná, zejména kvůli jejich různorodosti a neznalosti všech vlastností. Dalšími možnostmi diagnostiky je barvení nádorové tkáně, využití maligních výpotků, nebo stále nejčastěji používané nádorové markery. Při rozvoji a růstu nádoru vylučují buňky detekovatelné markery, které jsou samostatně nebo v kombinacích specifické pro různé nádory. Tumormarkery se také využívají při výzkumech *in vitro* kultur maligních buněčných linií, které se podařilo úspěšně pěstovat až v tomto století.

V poslední části jsou shrnuty terapeutické možnosti léčby nádorových onemocnění, které pomáhají bojovat s tímto agresivním onemocněním. Studie se stále více zaměřují na zkoumání dalších způsobů léčby, které by tolik neovlivňovaly fyziologické buňky přilehlé k buňkám nádorovým, jako stále nejpoužívanější chemoterapie či radioterapie. Šetrnější léčbou může být imunoterapie, která je soustředěna na konkrétní buňky imunitní odpovědi bojující s nádorem.

Celá práce je proložena aktuálními články o studiích prováděných *in vitro*, které přispívají svými znalostmi o kultivaci buněčných linií získaných od pacientů z patologicky diagnostikovaným epiteliálním nádorem. Kultivace maligních buněk je stále velice náročný úkol, zejména kvůli heterogenitě nádorů a jejich rozdílných požadavcích na podmínky pro úspěšnou kultivaci expandovaných a množících se buněčných linií. Těmito studii se však daří posouvat hranice diagnostiky, které mají vzrůstající podíl v klinické praxi.

## POUŽITÁ LITERATURA

- 1) Abbott, M., Ustoyev, Y. **Cancer and the Immune System: The History and Background of Immunotherapy.** Seminars in Oncology Nursing. 2019; 150923. doi:10.1016/j.soncn.2019.08.002.
- 2) Alvarez Cubero, M. J., Lorente, J. A., Robles-Fernandez, I., Rodriguez-Martinez, A., et al. **Circulating Tumor Cells: Markers and Methodologies for Enrichment and Detection.** *Circulating Tumor Cells.* Methods in Molecular Biology book series. 2017; 1634, s. 283-303. doi:10.1007/978-1-4939-7144-2\_24.
- 3) Amjad, M., Chidharla, A., Kasi, A. **Cancer Chemotherapy.** In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. 2022. PMID: 33232037.
- 4) Andree, K. C., van Dalum, G., Terstappen, L. W. M. M. **Challenges in circulating tumor cell detection by the CellSearch system.** Molecular Oncology. 2015; 10(3), s. 395-407. ISSN: 1574-7891; doi:10.1016/j.molonc.2015.12.002.
- 5) Aredo, J. V., Luo, S. J., Gardner, R. M., Sanyal, N., et al. (2021). **Tobacco Smoking and Risk of Second Primary Lung Cancer.** Journal of Thoracic Oncology. 2021; 16(6), s. 968-979. ISSN: 1556-0864; doi:10.1016/j.jtho.2021.02.024.
- 6) Bailey, P. C., Martin, S. S. **Insights on CTC Biology and Clinical Impact Emerging from Advances in Capture Technology.** Cells. 2019; 8(6), s. 553. doi:10.3390/cells8060553.
- 7) Becker, N., Motsch, E., Trotter, A., Heussel, C. P., et al. **Lung cancer mortality reduction by LDCT screening - results from the randomised German LUSI trial.** International Journal of Cancer. 2019; 146(6), s. 1503-1513. doi:10.1002/ijc.32486.
- 8) Berghoff, A. S., Liao, Y., Karreman, M. A., Ilhan-Mutlu, A., et al. **Identification and Characterization of Cancer Cells That Initiate Metastases to the Brain and Other Organs.** Molecular Cancer Research. 2021; 19(4), s. 688-701. doi:10.1158/1541-7786.MCR-20-0863.
- 9) Bertheloot, D., Latz, E., Franklin, B. S. **Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death.** Cellular & Molecular Immunology. 2021; 18(5), s. 1106-1121. doi:10.1038/s41423-020-00630-3.
- 10) Bodor, J. N., Bumber, Y., Borghaei, H. **Biomarkers for immune checkpoint inhibition in non-small cell lung cancer (NSCLC).** Cancer. 2019; 126(2), s. 260-270. doi:10.1002/cncr.32468.
- 11) Carlsson, S. V., Vickers, A. J. **Screening for Prostate Cancer.** Medical Clinics of North America. 2020; 04(6), s. 1051-1062. doi:10.1016/j.mcna.2020.08.007.

- 12) Carneiro, F., Muniz-Junqueira, M., Pittella-Silva, F., Carneiro, M. de V., et al. **A panel of markers for identification of malignant and non-malignant cells in culture from effusions.** *Oncology Reports*. 2017; 38, s. 3538-3544. doi:10.3892/or.2017.6022.
- 13) Castro-Giner, F., Aceto, N. **Tracking cancer progression: from circulating tumor cells to metastasis.** *Genome Medicine*. 2020; 12(1), s. 31. doi:10.1186/s13073-020-00728-3.
- 14) Cremer, M., Küpper, K., Wagler, B., Wizelman, L., et al. **Inheritance of gene density - related higher order chromatin arrangements in normal and tumor cell nuclei.** *The Journal of Cell Biology*. 2003; 162(5), s. 809-820. doi:10.1083/jcb.200304096.
- 15) D'Arcy, M. **Cell Death. A review of the major forms of Apoptosis, Necrosis and Autophagy.** *Cell Biology International*. 2019; s. 582-592. doi:10.1002/cbin.11137.
- 16) De Renzi, G., De Marco, G., De Meo, M., Del Rosso, E., et al. **In vitro cultures of circulating tumor cells: a potential tool to unravel drug sensitivity.** *Cancer Drug Resist.* 2022; 5(1), s. 245-260. doi:10.20517/cdr.2021.121.
- 17) Dimri, G. P. **What has senescence got to do with cancer?** *Cancer Cell*. 2005; 7(6), s. 505-512. ISSN: 1535-6108; doi:10.1016/j.ccr.2005.05.025.
- 18) Dirix, L., Buys, A., Oeyen, S., Peeters, D., et al. **Circulating tumor cell detection: A prospective comparison between CellSearch and RareCyte platforms in patients with progressive metastatic breast cancer.** *Breast Cancer Research Treat.* 2022; 193(2), s. 437-444. doi:10.1007/s10549-022-06585-5.
- 19) Duda, D. G., Duyverman, A. M. M. J., Kohno, M., Snuderl, M., et al. **Malignant cells facilitate lung metastasis by bringing their own soil.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010; 107(50), s. 21677-21682. doi:10.1073/pnas.1016234107.
- 20) Elakkiya, V., Menon, M. P., Nataraj, D., Biji, P., et al. **Optical detection of CA 15-3 breast cancer antigen using CdS quantum dot.** *IET Nanobiotechnology*. 2017; 11(3), s. 268-276. doi:10.1049/iet-nbt.2016.0012.
- 21) Engeland K. **Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling.** *Cell Death Differ.* 2022; 29(5), s. 946-960. doi:10.1038/s41418-022-00988-z.
- 22) Filella, X., Rodríguez-García, M., Fernández-Galán, E. **Clinical usefulness of circulating tumor markers.** *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2022; 61(5), s. 895-905. doi:10.1515/cclm-2022-1090.
- 23) Fotouhi, S., Asadi, S., Kattan, M. W. **A comprehensive data level analysis for cancer diagnosis on imbalanced data.** *Journal of Biomedical Informatics*. 2019; 90, 103089. ISSN: 1532-0464; doi:10.1016/j.jbi.2018.12.003.

- 24) Gaillard, H., García-Muse, T., Aguilera, A. **Replication stress and cancer.** Nature Reviews Cancer. 2015; 15(5), s. 276-289. doi:10.1038/nrc3916.
- 25) Galluzzi, L., Green, D. R. **Autophagy-Independent Functions of the Autophagy Machinery.** Cell. 2019; 177(7), s. 1682-1699. ISSN: 0092-8674; doi:10.1016/j.cell.2019.05.026.
- 26) Galluzzi, L., Pietrocola, F., Bravo-San Pedro, J. M., Amaravadi, R. K., et al. **Autophagy in malignant transformation and cancer progression.** The EMBO Journal. 2015; 34(7), s. 856-880. doi:10.15252/embj.201490784.
- 27) Gong, L., Zhang, Y., Liu, C., Zhang, M., et al. **Application of Radiosensitizers in Cancer Radiotherapy.** Int J Nanomedicine. 2021; 16, s. 1083-1102. doi:10.2147/IJN.S290438.
- 28) Heerboth, S., Housman, G., Leary, M., Longacre, M., et al. **EMT and tumor metastasis.** Clinical and Translational Medicine. 2015; 4(1). doi:10.1186/s40169-015-0048-3.
- 29) Galadari, S., Rahman, A., Pallichankandy, S., Thayyullathil, F. **Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress?** Free Radic Biol Med. 2017; 104, s. 144-164. ISSN: 0891-5849; doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.004.
- 30) Chauhan, A., Kaur, R., Ghoshal, S., Pal, A. **Exploration of Circulating Tumour Cell (CTC) Biology: A Paradigm Shift in Liquid Biopsy.** Indian Journal of Clinical Biochemistry. 2021; 36(2), s. 131-142. doi:10.1007/s12291-020-00923-4.
- 31) Chen, R., Jiang, C., Zhu, Q., You, S., et al. **Combining the tumor abnormal protein test with tests for carcinoembryonic antigens, cancer antigen 15–3, and/or cancer antigen 125 significantly increased their diagnostic sensitivity for breast cancer.** Medicine. 2020; 99(29), e21231. doi:10.1097/md.00000000000021231.
- 32) Ilic, D., Djulbegovic, M., Jung, J. H., Hwang, E. C., et al. **Prostate cancer screening with prostate-specific antigen (PSA) test.** BMJ. 2018; 362:k3519. doi:10.1136/bmj.k3519.
- 33) Jeon, J., Kim, T.-J., Park, H. S., Lee, K.-Y. **Malignant Pleural Effusion from Metastatic Prostate Cancer: A Case Report with Unusual Cytologic Findings.** Journal of Pathology and Translational Medicine. 2018; 52(4), s. 257-261. doi:10.4132/jptm.2018.05.08.
- 34) Jiang, X., Wang, J., Deng, X., Xiong, F., et al. **The role of microenvironment in tumor angiogenesis.** Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. 2020; 39(1), s. 204. doi:10.1186/s13046-020-01709-5.



- 35) Joshi, S., Kallappa, S., Kumar, P., Shukla, S., et al. **Simple diagnosis of cancer by detecting CEA and CYFRA 21-1 in saliva using electronic sensors.** *Sci Rep.* 2022; 12(1), s. 15315. doi:10.1038/s41598-022-19593-8.
- 36) Kaldjian, E. P., Ramirez, A. B., Sun, Y., Campton, D. E., et al. **The RareCyte platform for next-generation analysis of circulating tumor cells.** *Cytometry Part A.* 2018; 93(12), s. 1220-1225. doi:10.1002/cyto.a.23619.
- 37) Kalpage, H. A., Bazylianska, V., Recanati, M. A., Fite, A., et al. **Tissue specific regulation of cytochrome c by post-translational modifications: respiration, the mitochondrial membrane potential, ROS, and apoptosis.** *The FASEB Journal.* 2018; 33(2), s. 1540-1553. doi:10.1096/fj.201801417r.
- 38) Karasic, T. B., O'Hara, M. H., Loaiza-Bonilla, A., Reiss, K. A., et al. **Effect of Gemcitabine and nab-Paclitaxel With or Without Hydroxychloroquine on Patients With Advanced Pancreatic Cancer.** *JAMA Oncology.* 2019; 5(7), s. 993-998. doi:10.1001/jamaoncol.2019.0684.
- 39) Kim, B., Park, Y., Kim, B., Ahn, H. J., et al. **Diagnostic performance of CA 125, HE4, and risk of Ovarian Malignancy Algorithm for ovarian cancer.** *Journal of Clinical Laboratory Analysis.* 2018; 33(1), e22624. doi:10.1002/jcla.22624.
- 40) Krzyszczyk, P., Acevedo, A., Davidoff, E. J., Timmins, L. M., et al. **The growing role of precision and personalized medicine for cancer treatment.** *Technology (Singap World Sci).* 2018; 6(3-4), s. 79-100. doi:10.1142/S2339547818300020.
- 41) Kumar, V., Abbas, A. K., Aster, J. C. **Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease.** Elsevier, Canada, MLA. 2014; 9th edition, s.1472. ISBN: 032353113X.
- 42) Kumari, S., Badana, A. K., G, M. M., G, S., Malla, R. **Reactive Oxygen Species: A Key Constituent in Cancer Survival.** *Biomark Insights.* 2018; 13, 1177271918755391. doi:10.1177/1177271918755391.
- 43) Kuo, Y.-S., Zheng, M.-Y., Huang, M.-F., Miao, C.-C., et al. **Association of Divergent Carcinoembryonic Antigen Patterns and Lung Cancer Progression.** *Scientific Reports.* 2020; 10(1), s. 2066. doi:10.1038/s41598-020-59031-1.
- 44) Labuschagne, C. F., Cheung, E. C., Blagih, J., Domart, M.-C., et al. **Cell Clustering Promotes a Metabolic Switch that Supports Metastatic Colonization.** *Cell Metabolism.* 2019; 30(4), s. 720-734. doi:10.1016/j.cmet.2019.07.014.
- 45) Lee, H. L., Chiou, J. F., Wang, P. Y., Lu, L. S., et al. **Ex Vivo Expansion and Drug Sensitivity Profiling of Circulating Tumor Cells from Patients with Small Cell Lung Cancer.** *Cancers (Basel).* 2020; 12(11), s. 3394. doi: 10.3390/cancers12113394.
- 46) Lee, T., Teng, T. Z. J., Shelat, V. G. **Carbohydrate antigen 19-9 - tumor marker: Past, present, and future.** *World J Gastrointest Surg.* 2020; 12(12), s. 468-490. doi:10.4240/wjgs.v12.i12.468.

- 47) Liebig, C., Ayala, G., Wilks, J. A., Berger, D. H., et al. **Perineural invasion in cancer: a review of the literature.** *Cancer*. 2009; 115(15), s. 3379-91. doi:10.1002/cncr.24396.
- 48) Lin, M., Liang, S.-Z., Shi, J., Niu, L.-Z., et al. **Circulating tumor cell as a biomarker for evaluating allogeneic NK cell immunotherapy on stage IV non-small cell lung cancer.** *Immunology Letters*. 2017; 191, s. 10-15. ISSN: 0165-2478; doi:10.1016/j.imlet.2017.09.004.
- 49) Liu, T. T., Ewald, J. A., Ricke, E. A., Bell, R., et al. **Modeling Human Prostate Cancer Progression in vitro.** *Carcinogenesis*. 2019; 40(7), s. 893-902. doi:10.1093/carcin/bgy185.
- 50) Mavroudis, D. **Circulating cancer cells.** *Annals of Oncology*. 2010; 21(7), s. 95-100. doi:10.1093/annonc/mdq378.
- 51) Nance, K. V., Silverman, J. F. **Immunocytochemical Panel for the Identification of Malignant Cells in Serous Effusions.** *American Journal of Clinical Pathology*. 1991; 95(6), s. 867-874. doi:10.1093/ajcp/95.6.867.
- 52) Pérez-Mancera, P. A., Young, A. R. J., Narita, M. **Inside and out: the activities of senescence in cancer.** *Nature Reviews Cancer*. 2014; 14(8), s. 547-558. doi:10.1038/nrc3773.
- 53) Pramanik, A., Xu, Z., Shamsuddin, S. H., Khaled, Y. S., et al. **Affimer Tagged Cubosomes: Targeting of Carcinoembryonic Antigen Expressing Colorectal Cancer Cells Using *In Vitro* and *In Vivo* Models.** *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2022; 14 (9), s. 11078-11091. doi:10.1021/acsami.1c21655.
- 54) Rani, M., Nicholson, S. E., Zhang, Q., Schwacha, M. G. **Damage-associated molecular patterns (DAMPs) released after burn are associated with inflammation and monocyte activation.** *Burns*. 2017; 43(2), s. 297-303. ISSN: 0305-4179; doi:10.1016/j.burns.2016.10.001.
- 55) Riley, R. S., June, C. H., Langer, R., Mitchell, M. J. **Delivery technologies for cancer immunotherapy.** *Nat Rev Drug Discov*. 2019; 18(3), s. 175-196. doi:10.1038/s41573-018-0006-z.
- 56) Rogalla, S., Contag, C. H. **Early Cancer Detection at the Epithelial Surface.** *The Cancer Journal*. 2015; 21(3), s. 179-187. doi:10.1097/ppo.0000000000000122.
- 57) Ruan, H., Leibowitz, B. J., Zhang, L., Yu, J. **Immunogenic cell death in colon cancer prevention and therapy.** *Molecular Carcinogenesis*. 2020; 59(7), s. 783-793. doi:10.1002/mc.23183.
- 58) Sarobe, P., Huarte, E., Lasarte, J., Borrás-Cuesta, F. **Carcinoembryonic Antigen as a Target to Induce Anti-Tumor Immune Responses.** *Current Cancer Drug Targets*. 2004; 4(5), s. 443-454. doi:10.2174/1568009043332916.

- 59) Sauler, M., Bazan, I. S., Lee, P. J. **Cell Death in the Lung: The Apoptosis-Necroptosis Axis.** Annual Review of Physiology. 2018; 81(1), s. 375-402. doi:10.1146/annurev-physiol-020518-114320.
- 60) Seale, K., Tkaczuk, K. **Circulating Biomarkers in Breast Cancer.** Clin Breast Cancer. 2022; 22(3), s. 319-331. ISSN: 1526-8209; doi:10.1016/j.clbc.2021.09.006.
- 61) Shen, J., Tao, K., Gu, P., Gui, C., et al. **Aggregation-induced emission luminogen for specific identification of malignant tumour in vivo.** Science China Chemistry. 2020; 63(3), s. 393-397. doi:10.1007/s11426-019-9677-7.
- 62) Shirasu, H., Ono, A., Omae, K., Nakashima, K., et al. **CYFRA 21-1 predicts the efficacy of nivolumab in patients with advanced lung adenocarcinoma.** Tumour Biology. 2018; 40(2), 1010428318760420. doi:10.1177/1010428318760420.
- 63) Schlemmer, H. P., Krause, B. J., Schütz, V., Bonekamp, D., et al. **Imaging of Prostate Cancer.** Dtsch Arztebl Int. 2021;118(42), s. 713-719. doi:10.3238/arztebl.m2021.0309.
- 64) Schmidt, D. R., Patel, R., Kirsch, D. G., Lewis, C. A., et al. **Metabolomics in cancer research and emerging applications in clinical oncology.** CA Cancer J Clin. 2021; 71(4), s. 333-358. doi: 10.3322/caac.21670.
- 65) Schock, S. N., Chandra, N. V., Sun, Y., Irie, T., et al. **Induction of necroptotic cell death by viral activation of the RIG-I or STING pathway.** Cell Death Differ. 2017; 24(4), s. 615-625. doi:10.1038/cdd.2016.153.
- 66) Sjakste, N., Sjakste, T., Vikmanis, U. **Role of the Nuclear Matrix Proteins in Malignant Transformation and Cancer Diagnosis.** Experimental Oncology. 2004; 26(3), s. 170-178. PMID: 15494683.
- 67) Snezhkina, A. V., Kudryavtseva, A. V., Kardymon, O. L., Savvateeva, M. V., et al. **ROS Generation and Antioxidant Defense Systems in Normal and Malignant Cells.** Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2019; Article ID 6175804, 17 pages. doi:10.1155/2019/6175804.
- 68) Soler, A., Cayrefourcq, L., Mazard, T., Babayan, A., et al. **Autologous cell lines from circulating colon cancer cells captured from sequential liquid biopsies as model to study therapy-driven tumor changes.** Sci Rep. 2018; 8(1), s. 15931. doi:10.1038/s41598-018-34365-z.
- 69) Sun, Y.-S., Zhao, Z., Yang, Z.-N., Xu, F., et al. **Risk Factors and Preventions of Breast Cancer.** International Journal of Biological Sciences. 2017; 13(11), s. 1387-1397. doi:10.7150/ijbs.21635.
- 70) Tateishi, U. **Prostate-specific membrane antigen (PSMA)-ligand positron emission tomography and radioligand therapy (RLT) of prostate cancer.** Japanese Journal of Clinical Oncology. 2020; 50(4), s. 349-356. doi:10.1093/jjco/hyaa004.

- 71) Tieng, F. Y. F., Abu, N., Nasir, S. N., Lee, L. H., et al. **Liquid Biopsy-Based Colorectal Cancer Screening via Surface Markers of Circulating Tumor Cells.** *Diagnostics (Basel)*. 2021; 11(11), s. 2136. doi:10.3390/diagnostics11112136.
- 72) Vasseur, A., Kiavue, N., Bidard, F., Pierga, J., et al. **Clinical utility of circulating tumor cells: an update.** *Molecular Oncology*. 2020; 15(6), s. 1647-1666. doi:10.1002/1878-0261.12869.
- 73) Werbin, J. L., Nordberg, J. J., Tzucker, J., Varshavskaya, P., et al. **RareCyte CTC Analysis Step 2: Detection of Circulating Tumor Cells by CyteFinder Automated Scanning and Semiautomated Image Analysis.** *Circulating Tumor Cells*. 2017; 1634, s. 173-180. doi:10.1007/978-1-4939-7144-2\_14.
- 74) Xu, Y., Zhang, P., Zhang, K., Huang, C. **The application of CA72-4 in the diagnosis, prognosis, and treatment of gastric cancer.** *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2021; 1876(2), s. 188634. ISSN: 0304-419X; doi:10.1016/j.bbcan.2021.188634.
- 75) Yang, Y., Xu, M., Huang, H., Jiang, X., et al. **Serum carcinoembryonic antigen elevation in benign lung diseases.** *Scientific Report*. 2021; 11(1), s. 19044. doi:10.1038/s41598-021-98513-8.
- 76) Yousefi Rizi, H. A., Hoon Shin, D., Yousefi Rizi, S. **Polymeric Nanoparticles in Cancer Chemotherapy: A Narrative Review.** *Iran J Public Health*. 2022; 51(2), s. 226-239. doi:10.18502/ijph.v51i2.8677.
- 77) Yue, X., Zhao, Y., Xu, Y., Zheng, M., et al. **Mutant p53 in Cancer: Accumulation, Gain-of-Function, and Therapy.** *Journal of Molecular Biology*. 2017; 429(11), s. 1595-1606. ISSN: 0022-2836; doi:10.1016/j.jmb.2017.03.030.
- 78) Zhang, L., Zhang, D., Yang, L., Gu, Y., et al. **Roles of cell fusion between mesenchymal stromal/stem cells and malignant cells in tumor growth and metastasis.** *The FEBS Journal*. 2021; 288(5), s. 1447-1456. doi:10.1111/febs.15483.
- 79) Zhang, Z., Ramnath, N., Nagrath, S. **Current Status of CTCs as Liquid Biopsy in Lung Cancer and Future Directions.** *Frontiers in Oncology*. 2015; 30(5), s. 209. doi:10.3389/fonc.2015.00209.
- 80) Zhu, H. **Squamous Cell Carcinoma Antigen: Clinical Application and Research Status.** *Diagnostics (Basel)*. 2022; 12(5), s. 1065. doi:10.3390/diagnostics12051065.