

Univerzita Karlova
1. lékařská fakulta

Studijní program: Experimentální chirurgie



UNIVERZITA KARLOVA
I. lékařská fakulta

MUDr. Imrich Kiss

Sporadické buňky v diagnostice a monitoraci gynekologických onemocnění

Rare cells in diagnostics and monitoring of gynecological diseases

Disertační práce

Školitel:

prof. MUDr. Vladimír Bobek, Ph.D.

Praha, 2022

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem řádně uvedl a citoval všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 25.1.2022

MUDr. IMRICH KISS

Podpis

Identifikační záznam:

KISS, Imrich. *Sporadické buňky v diagnostice a monitoraci gynekologických onemocnění. [Rare cells in diagnostics and monitoring of gynecological diseases]*.

Praha, 2022. Počet stran 32, 4 přílohy. Disertační práce. Univerzita Karlova,

1. lékařská fakulta, III. chirurgická klinika 1. LF UK a FNM. Školitel Bobek, Vladimír.

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval všem, kteří mi v průběhu doktorského studia a tvorby disertační práce poskytli podporu a pomoc. Předně bych chtěl poděkovat všem pracovníkům Laboratoře personalizované medicíny, Radioterapeutické a onkologické kliniky, Fakultní nemocnice Královské Vinohrady za možnost osvojení si praktické laboratorní práce a stát se součástí výzkumného týmu. Především děkuji školiteli prof. MUDr. Vladimírovi Bobkovi, Ph.D., za odborné vedení mého studia a spolupráci při tvorbě této práce, dále Mgr. Kataríně Kološtové, Ph.D. a Ing. Elišce Pospíšilové za množství cenných a inspirativních rad, doporučení a připomínek. Děkuji také doc. MUDr. Bohuslavovi Svobodovi, CSc. za umožnění spojení klinické práce s výzkumnou činností a všem kolegům z Gynekologické kliniky 3. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Ústřední vojenské nemocnice za podporu a pomoc při sběru vzorků. V neposlední řadě patří obrovské poděkování mé manželce a rodině, bez které bych tuto práci nemohl dokončit.

Abstrakt:

V posledních dvou desetiletích je významná snaha nalézt neinvazivní markery v diagnostice, predikci a monitorování účinnosti terapie maligních onemocnění. Cirkulující nádorové buňky (CTC) mají možnost splnit všechny tyto kritéria. Monotematická práce se v úvodu věnuje problematice CTC a jejich současnému využití v klinické medicíně. V přehledném článku je shrnut aktuální stav využití CTC u gynekologických malignit. V další publikaci je originální článek na téma CTC u karcinomu endometria. Popisuje úspěšný záchyt vitálních CTC u 75% testovaných pacientek. Identifikuje CTC jako individuální marker onemocnění bez spojitosti se stadiem, stupněm (grade) nebo postižením lymfatických uzlin.

V druhé polovině se práce věnuje endometrióze, benignímu, ale často recidivujícímu onemocnění zhoršující kvalitu života u žen v reprodukčním věku. Multicentrická studie popisuje úspěšnou izolaci cirkulujících endometriálních buněk (CEC) u žen s histologicky potvrzenou endometriózou v různém stadiu onemocnění i subjektivními potížemi pacientek. Z celkových 423 vzorků bylo úspěšně izolováno 78.4%. CEC byly sledovány u 11 pacientek v různých fázích menstruačního cyklu, při čemž nejvyšší počet CEC byl detekován těsně po ovulaci. Cytomorfologickou a následně molekulární analýzou byly zjištěny buněčné typy a geny charakteristické pro jednotlivé fáze cyklu umožňující vysvětlení dynamiky patofyziologie endometriózy. Poslední originální článek disertační práce je pilotní studie detekce CEC u pacientek se spontánním pneumotoraxem s podezřením na katameniální charakter. U všech 20 vyšetřovaných pacientek byly prokázány CEC, které následnou molekulární analýzou byly rozděleny na dvě skupiny. Profil těchto dvou skupin korespondoval s perioperačním nálezem, což by vysvětlovalo dvě patofyziologické cesty šíření endometriózy do hrudní dutiny (brániční fenestrace vs. hematogenní šíření). Klinickým přínosem této studie by byla včasná diagnostika možné etiologie endometriózy, efektivnějšího terapeutického zásahu a sledování gynekologem ke snížení riziku recidivy.

Klíčová slova: biomarker, cirkulující nádorové buňky, cirkulující endometriální buňky, endometrióza, genová exprese, karcinom endometria

Abstract:

In the last two decades there is an enormous effort to discover a non-invasive marker to diagnose, predict and monitor therapy effect of malignant diseases. Circulating tumor cells (CTC) have the ability to fulfil all these criteria. The introduction of the monothematic thesis deals with the problematics of CTC in general and its application in clinical medicine. It is followed by the author's first publication, which reviews the current status of CTC in gynecological malignancies. The next publication is an original article about CTC in patients with endometrial carcinoma. It reports a successful isolation of vital CTC in 75% of tested patients and identifies CTC as an individual marker of the disease without correlation to the stage, grade or lymph nodes involvement.

The second part of this thesis deals with endometriosis, a benign but often recurrent disease worsening the life quality of women in reproductive age. The multicentre study presents a successful isolation of circulating endometrial cells (CEC) in patients with histologically proven endometriosis with various stages and symptoms. From the total of 423 samples 78.4% were CEC positive. Eleven patients were monitored during their menstrual cycle and CEC tested in different phases, being the early post-ovulatory period in which the highest CEC number was detected. Cytomorphologic and later molecular analysis showed characteristic cell types and genes for different phases, which could lead to better understanding of endometriosis dynamics. The last original article of this thesis is a proof-of-concept study which demonstrates successful isolation and characterization of CEC in patients with spontaneous pneumothorax with very suspect catamenial involvement. In all the 20 patients CEC were detected and with further molecular analysis divided in to two groups. The gene expression profile of the two groups corresponded with the intraoperative findings, which would explain the two pathophysiological routes of endometriosis spread to the thoracic cavity (diaphragm fenestration vs. hematogenous spread). The clinical value of this original study would be the early diagnostics of endometriosis etiology, more effective therapy management and a follow up by the gynaecologist to lower the risk of recurrence.

Key words: biomarker, circulating tumor cells, circulating endometrial cells, endometriosis, endometrial cancer, gene expression

Obsah:

1. Úvod
 - 1.1. Sporadické buňky u gynekologických onemocnění
 - 1.2. Cirkulující nádorové buňky
 - 1.3. Klinické využití cirkulujících nádorových buněk
 - 1.4. Cirkulující nádorové buňky u gynekologických onemocnění (publikace č. 1)
2. Hypotéza a cíle práce
3. Materiál a metody
 - 3.1. Izolace CTC
 - 3.2. Cytomorfologická analýza
 - 3.3. Molekulární analýza
4. Výsledky a hodnocení hypotéz
 - 4.1. Existuje korelace stadia onemocnění s přítomností živých CTC karcinomu endometria?
Je možná dlouhodobá kultivace in vitro vyizolovaných CTC karcinomu endometria?
(publikace č. 2)
 - 4.1.1. Výsledky
 - 4.1.2. Diskuze
 - 4.1.3. Závěr
 - 4.2. Je možno využít cirkulující endometriální buňky v diagnostice a monitorování endometriózy? (publikace č. 3)
 - 4.2.1. Výsledky
 - 4.2.2. Diskuze
 - 4.2.3. Závěr
 - 4.3. Je možno cirkulující endometriální buňky využít v diagnostice a léčbě u pacientek se spontánním pneumotoraxem? (publikace č. 4)
 - 4.3.1. Výsledky
 - 4.3.2. Diskuse
 - 4.3.3. Závěr
5. Souhrn / Summary
 - 5.3 Souhrn
 - 5.4 Summary
6. Zkratky a vysvětlivky
7. Použitá literatura

8. Přílohy

Publikace č. 1, přehledový článek: Circulating tumor cells in gynaecological malignancies

Publikace č. 2, originální práce: Correlation between disease stage and the presence of viable circulating tumor cells in endometrial cancer

Publikace č. 3, originální práce: Circulating endometrial cells: A new source of information on endometriosis dynamics

Publikace č. 4, originální práce: Circulating endometrial cells in women with spontaneous pneumothorax

1. Úvod

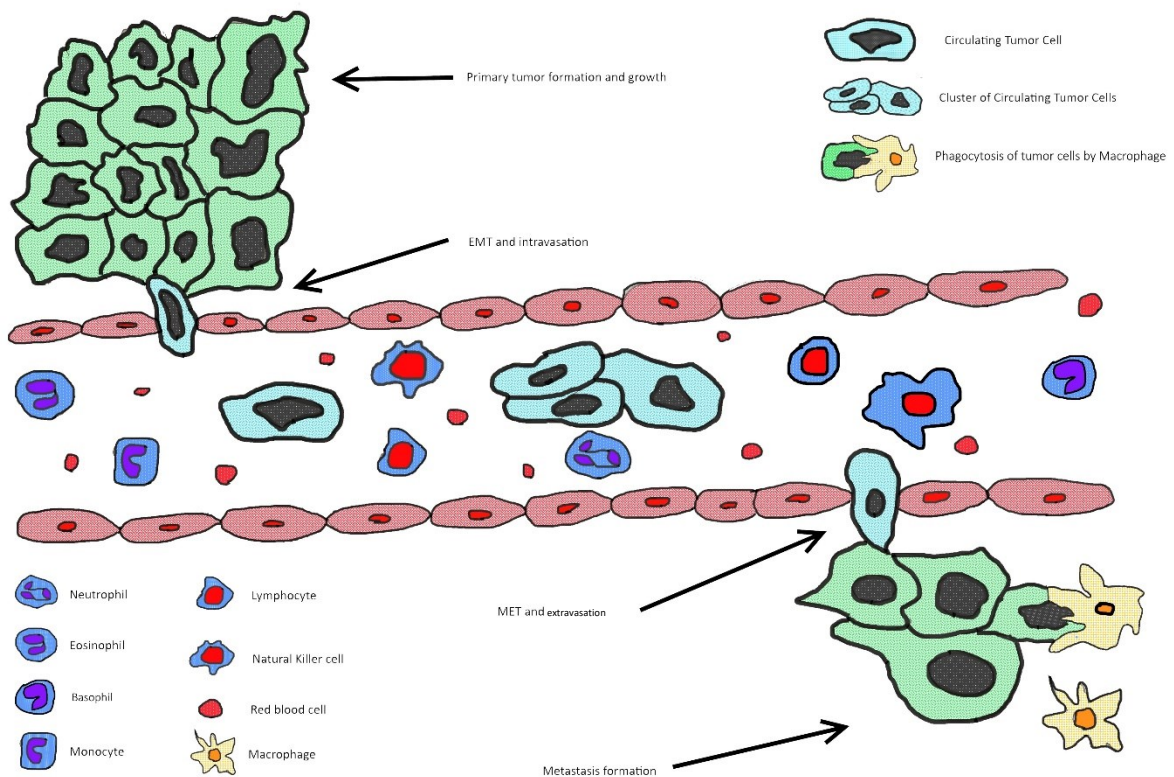
1.1. Sporadické buňky u gynekologických onemocnění

Sporadické buňky jsou v krevním řečišti zastoupeny v poměru k ostatním elementům v minimálním množství. U zdravého jedince jsou eliminovány imunitním systémem, u patologického procesu mohou být zdrojem vzdálených metastáz. V gynekologii je jejich výskyt popisován mimo onkologických onemocnění také u endometriózy. Cirkulující nádorové buňky (CTC) jsou izolovány u maligních onemocnění a cirkulující endometriální buňky (CEC) jsou detekovány u endometriózy. Předkládaná disertační monotematická práce přináší důležité poznatky o úspěšné izolaci a poukazuje na možnosti dalšího výzkumu a využití těchto buněk v klinické praxi.

1.2. Cirkulující nádorové buňky

Poznání cirkulujících nádorových buněk (CTC) je založeno na zjištění, že z primárního solidního nádoru se odlučují vitální buňky schopné průniku do nejbližší kapiláry a přes ní dále do celkové cirkulace organismu. Možnost tzv. intravazace často podmiňuje proces epiteliálně mesenchymální transformace (EMT), který mění molekulární charakter buňky. Na tuto transformaci musíme myslet při izolaci a při další analýze těchto buněk, které získáme např. z periferní krve odběrem. Mnohdy mají CTC potenciál zakládání vzdálených metastáz a při zachycení na endotel kapiláry a extravazaci se vracejí zpátky k původním vlastnostem pomocí mesenchymálně epiteliální transformace (MET). V cílové tkáni dle buněčného environmentu dochází k růstu maligních metastáz. Celý výše popsaný proces ilustruje *obrázek 1*.

Obrázek 1: Odloučení nádorové buňky od primárního tumoru, intravazace s procesem EMT, CTC v cirkulaci, extravazace a MET, zakládání vzdálených metastáz (Kiss et al., 2020.)



1.3. Klinické využití cirkulujících nádorových buněk

Teorie tekuté biopsie - liquid biopsy s použitím cirkulujících nádorových buněk (CTC) byla v diagnostice a terapii popsána před více než 15 lety. Pro velký zájem vědeckých skupin se množství publikovaných článků rozrůstá každým dnem, které se mimo CTC zaměřují i na další možné potenciální markery jako ctDNA, cfDNA, extracelulární vezikuly, tumor-educated platelets. Zvyšuje se i počet klinických studií hodnotící jejich využití v diagnostice a terapii (aktuálně více než 300 registrovaných klinických studií v databázi National Cancer Institute, <http://clinicaltrials.gov>). Současné přehledové články a meta-analýzy prokazují CTC jako vysoce specifický a senzitivní marker v diagnostice i v prognostice mnoha solidních nádorů: např. karcinom plic (Zhao et al., 2021), karcinom jícnu (Matsushita et al., 2020), (Li et al., 2020), hepatocelulární karcinom (Chen et al., 2020), (Cui et al., 2020), karcinom hlavy a krku (Xun et al., 2020), (Lauritano et al., 2019), karcinom pankreatu (Zhu et al., 2020), (Wang et al., 2020), karcinom plic (Jiang et al., 2019), (Ye et al., 2019), karcinom žaludku (Gao et al., 2019),

karcinom prsu (Mansouri et al., 2019), karcinom močového měchýře (Khetrapal et al., 2018), (Azevedo et al., 2018) a kolorektální karcinom (Tan and Wu, 2018).

Nejprve byly kladeny velké naděje do využití CTC v časně diagnostice maligních onemocnění. Již starší výzkumy např. u karcinomu prsu poukazovaly na hematogenní diseminaci buněk na začátku nádorového bujení (Hüsemann et al., 2008) předurčující potenciál vychytávání těchto buněk z cirkulace. Faktorem bránícím jejich rozšíření v klinické praxi je velmi kolísavý počet izolovaných buněk. Nejpravděpodobnější příčinou těchto rozdílů se zdají být odlišné metody izolace a rozdílné typy zkoumaných nádorů. Například epiteliální marker leukocytů CD45, který je obecně využíván k identifikaci CTC, může falešně detekovat i běžné buňky v krevním oběhu. Jak již bylo zmíněno v úvodu, CTC přechodem EMT mění svůj fenotyp, což způsobuje obcházení detekce protilátkami CD45 a vzorek je vyhodnocen falešně negativně. Totéž platí pro protilátku EPCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule), která se mimo CTC exprimuje také u pacientů s benigním onemocněním střev (Pantel et al., 2012). Metoda izolace CTC dle velikosti, na základě které byly detekovány CTC a CEC s následnou identifikací pomocí cytomorfologie, snižuje riziko falešného zachytu normálních buněk i zdánlivé přehlédnutí falešně negativního pacienta. I když pomocí této metody jsme schopni detekovat CTC brzy před zachytem např. maligních nodulů zobrazovacími technikami v plicích, prospektivní multicentrická studie zatím nedoporučuje její využití ve screeningu rakoviny plic (Marquette et al., 2020).

Další otázka, která se nabízí při možné klinické aplikaci je specifikování původu CTC u pozitivních pacientů. Redukuje to spektrum potřebných vyšetření, ekonomické zatížení zdravotních pojišťoven a v neposlední řadě i vystavění psychické zátěži samotného pacienta. Řešením je molekulární analýza izolovaných sporadických buněk, kdy zvýšená exprese určitých genů specifikuje daný orgánový původ. Některé geny jsou v různých molekulárních profilech identické (např. keratin 19 u karcinomu prsu, který se ale exprimuje v CTC i u jiných typů maligních onemocnění). Čím více specifických genů molekulární profil obsahuje, tím docílíme přesnějších výsledků (Alix-Panabières and Pantel, 2021). V neposlední řadě mohou mít cirkulující buňky jistou plasticitu, odlišující jejich molekulární charakter od původní tkáně primárního tumoru a tímto ztěžují diagnostiku (Quintanal-Villalonga et al., 2020).

Po zjištění malignity obvykle následuje staging se zjištěním rozsahu onemocnění a naplánování adekvátní terapie. Spolu s histologií a zobrazovacími metodami se mohou CTC stát dalším důležitým faktorem v identifikaci nízce a vysoce rizikových pacientů. Pozitivní izolace CTC

před operací nebo neoadjuvantní terapií predikuje horší prognózu u řady diagnóz (viz výše vzpomínané meta-analýzy).

Využití CTC se nabízí rovněž při monitoraci léčby a během sledování k časné diagnostice rekurence. Momentálně kromě sledování hodnoty PSA po léčbě karcinomu prostaty neexistuje krevní marker dostatečně specifický k zachycení časného relapsu před propuknutím klinických symptomů nebo nálezu na zobrazovacích metodách (Alix-Panabières and Pantel, 2021). Dále dle vícero studií je detekce i malého počtu CTC po adjuvantní terapii karcinomu prsu nezávislý marker k vyššímu riziku návratu onemocnění (Trapp et al., 2019), (Sparano et al., 2018). Zatím se neví, zda-li tento brzký záchyt buněčného relapsu může pomoci k úspěšnému vyléčení pacienta. Cílená terapie malého nádorového postižení je efektivnější než již rozvinutého rekurentního maligního bujení, kdy počet metastatických buněk exponenciálně roste. Molekulární analýzou CTC jsme schopni prokázat i přítomnost genů chemorezistence nebo onkogenů s možností nastavení cílené, personalizované terapie.

1.4. Cirkulující nádorové buňky u gynekologických onemocnění.

Přehledem dostupné literatury je článek pojednávající o výskytu CTC u gynekologických malignit (publikace č. 1): **Kiss, I., Kolostova, K., Pawlak, I., Bobek, V., Circulating tumor cells in gynaecological malignancies, JBUON 2020; 25(1): 40-50 [IF 1.379]**.

Přehledový článek uvádí základní poznatky o neinvazivní tzv. liquid biopsy metodě se zaměřením na CTC. Graficky znázorňuje odloučení nádorové buňky z primárního tumoru, epiteliálně mesenchymální přeměnu (EMT) pro průnik do krevního řečiště, odkud jsme schopni tyto buňky izolovat. Upozorňuje i na zpětnou mesenchymálně epiteliální přeměnu (MET), extravazaci do tkáně a založení metastáz ve vzdálené lokalizaci. Článek dále seznamuje čtenáře s dostupnými metodami detekce a izolace CTC. Hlavní část je souhrn literatury o detekci CTC u endometriálního, cervikálního a ovariálního karcinomu. Závěrem článku je poznatek, že přítomnost CTC u gynekologických malignit nemusí být jednoznačně v korelaci s pokročilostí onemocnění, ale je v souladu s horší prognózou. Do budoucna se CTC ukazují jako perspektivní pomocný marker v personalizované terapii, její zhodnocení a časné detekci rekurence.

2. Hypotéza a cíle práce

V posledních letech je snaha o nalezení metody, která je mini-invazivně schopna potvrdit a specifikovat onemocnění, odhadnout prognózu, efektivně monitorovat terapii a včas odhalit možnou recidivu. **Výzkum byl zaměřen na využití cirkulujících sporadických buněk v léčbě a diagnostice u maligních onemocnění (detekcí CTC), jakož i u benigních onemocnění (CEC u endometriózy).**

Cirkulující sporadické buňky jsou možným biomarkerem, který by mohl vyhovět výše uvedeným nárokům. **Cílem bylo zjistit korelaci CTC se stadiem onemocnění** (v našem případě karcinomu endometria). Úkolem byla izolace viabilní CTC a jejich dlouhodobá kultivace, což umožní další studium onemocnění.

Významným cílem plánovaného výzkumu bylo využití izolační metody využívané doposud pouze při onkologické diagnostice u pacientek s endometriózou. Detekované buňky po filtraci periferní krve jsme nazvali cirkulující endometriální buňky (CEC). Následně jsme získané buňky podrobili genové analýze, jejíž výsledky by sloužily k dalšímu výzkumu daného onemocnění. Získané zkušenosti a poznatky jsme využili ve studii, ve které je cílem popis výskytu a molekulární charakteristiky CEC u žen se spontánním pneumotoraxem s podezřením na katameniální charakter.

Souhrnem byly stanoveny následující otázky-hypotézy:

I: Existuje korelace stadia nádorového onemocnění s přítomností živých CTC? Je možná dlouhodobá kultivace in vitro vyizolovaných CTC?

II: Je možno využití cirkulujících endometriálních buněk v diagnostice a monitorování endometriózy?

III: Je možné cirkulující endometriální buňky využít v diagnostice a léčbě u pacientek se spontánním pneumotoraxem?

3. Materiál a metody

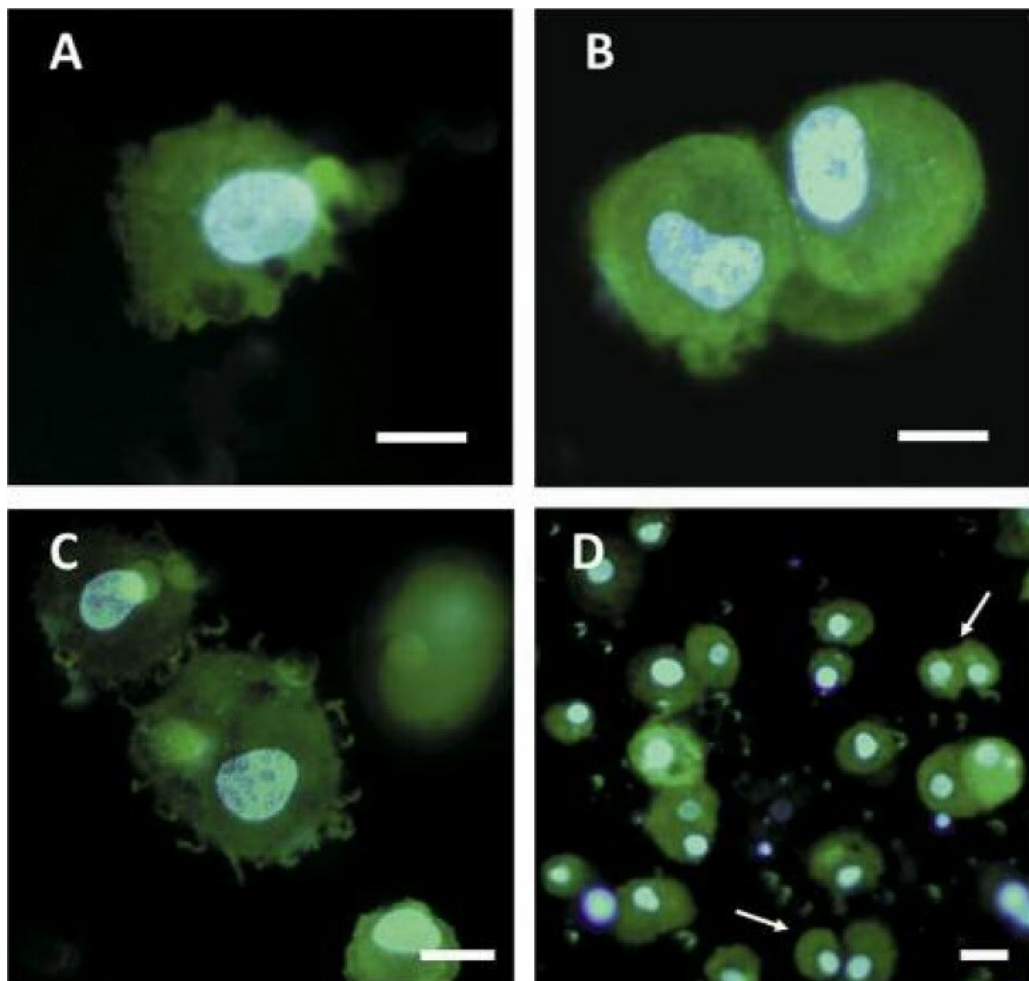
3.1. Izolace CTC

Sporadické buňky: cirkulující nádorové buňky (CTC) a cirkulující endometriální buňky (CEC) jsme získali odběrem periferní krve. Izolace buněk z venózní krve proběhla metodou filtrace (*obrázek 2*). Systém obsahuje membránu s póry o velikosti 8 μm , přes které je filtrováno cca 8 ml krve. Na membráně se spolu s leukocyty nebo makrofágy zachytí i patologické buňky jako nádorové nebo endometriální. Významnou výhodou oproti jiným metodám je zachování životnosti buněk (viability) a tedy možnost následné kultivace. Po 3 až 6 denní kultivaci, během které dochází k odumření většiny leukocytů a makrofágů, aplikujeme na vzorky fluorescenční barvení (NuceBlue™, CellTracker™, MitoTracker™) a pod fluorescenčním mikroskopem hodnotíme cytomorfologii buněk (*obrázek 3*).

Obrázek 2: Filtrace krve metodou MetaCell



Obrázek 3: Izolované CTC s vitálním fluorescenčním barvením. Šipky ukazují probíhající dělení buněk. Měřítka 10 µm.



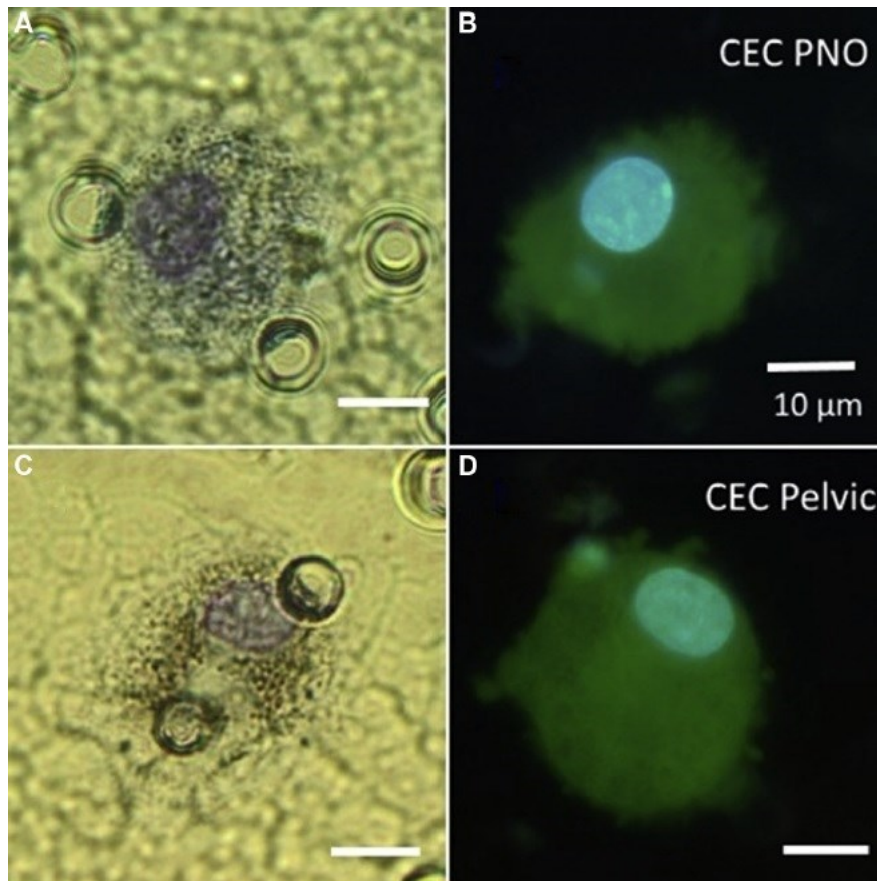
3.2. Cytomorfologická analýza

Cytomorfologická analýza se skládá ze dvou kroků. V prvním, jsou při zvětšení 10x-20x lokalizovány viabilní buňky, ve druhém při zvětšení 40x-60x jsou pozorovány detaily cytoplazmy, jádra s jadérky a mitochondrie. Mikroskopický obraz je digitalizován a snímky uloženy ke kontrolnímu čtení zkušeným vědeckým pracovníkem nebo patologem. Všechny vzorky jsou analyzovány dvěma různými specialisty.

Po cytomorfologické analýze je membrána s buňkami fixována sušením k další imunohistochemické analýze nebo uskladnění v RLT bufferu k další RNA analýze.

Imunohistochemická analýza slouží k potvrzení endometriálního původu sporadických buněk v periferní krvi u pacientek s endometriózou. Rutinně se k diagnostice endometriózy užívá CD10, ESR a VIM protilátky.

Obrázek 4: Porovnání izolovaných CEC u pacientek se spontánním pneumotoraxem (A, B) a pánevní endometriózou (C, D). Snímky A, C jsou imunohistochemická analýza s použitím VIM, snímky B, D jsou s využitím vitálního imunoflorescenčního barvení (NucBlue a CellTracker).



3.3. Molekulární analýza

Molekulární analýza vzorků probíhá pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR) s možností testování až 24 genů v jednotlivých vzorcích. Identifikace genů se zvýšenou expresí v CTC a CEC je dosažena porovnáním molekulárního profilu plné krve (ještě před filtrací membránou) a buněk separovaných na membráně. Z uchovaných vzorků v RLT bufferu jsme RNA izolovali pomocí RNeasy Mini Kit (QIAGEN) a poté je koncentrace RNA měřena přístrojem NanoDrop (Thermo Fisher Scientific). Produkce cDNA probíhá pomocí vysoko kapacitní cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific), genová analýza probíhá s využitím Taqman sond. Detailní popis izolování buněk, imunohistochemie a genové analýzy je popsán v jednotlivých publikacích v příloze.

Údaje z genových expresí jsou analyzovány pomocí softwaru GenEx verze 6 (MultiD) a kalkulací na základě metody ddCt. Porovnání expresí v různých skupinách probíhá pomocí metod Kruskal-Wallis a Mann-Whitney U testu. $P \leq .05$ je vyjádřeno jako signifikantní odchylka.

4. Výsledky a hodnocení hypotéz

4.1. Existuje korelace stadia nádorového onemocnění s přítomností živých CTC? Je možná dlouhodobá kultivace in vitro vyizolovaných CTC? - zodpovězeno zejména v impaktovaném článku (publikace č. 2) - **Kiss, I., Kolostova, K., Matkowski, R., Jędryka, M., Czekański, A., Pavlasek, J., Bobek, V., 2018. Correlation Between Disease Stage and the Presence of Viable Circulating Tumor Cells in Endometrial Cancer. *Anticancer Res* 38, 2983–2987 [IF 1.935].**

I když přítomnost CTC byla popsána u řady nádorových onemocnění, u gynekologických malignit je stále málo studií vhodných k aplikaci do klinické praxe. Detekce živých cirkulujících nádorových buněk s možností jejich kultivace a následně možností další genové charakterizace u různých stádií karcinomu pomůže k lepšímu pochopení invaze a šíření této malignity. U karcinomu endometria, jako nejčastější gynekologické malignitě (vyjma karcinomu prsu) v České republice, je potřeba dalšího zkoumání na buněčné a genetické úrovni, aby byla personalizovaná terapie efektivnější. Cílem práce bylo zjistit korelaci počtu CTC se stádiem onemocnění, jakož i pokus o in vitro dlouhodobou kultivaci CTC u karcinomu endometria.

4.1.1. Výsledky

Studie byla zaměřena na pacientky s karcinomem endometria. Do studie bylo zařazeno 92 pacientek s různým histologickým typem a stádiem onemocnění. CTC byly detekovány u 69 pacientek (75% pozitivita). Specifikaci pacientek i s CTC pozitivitou uvádí *Tabulka 1*, pro bližší a graficky znázorněné výsledky odkazují do původní publikace. Závěrem této studie je, že **CTC pozitivita nesouvisí se stádiem onemocnění ani s metastazováním do spádových lymfatických uzlin. Důležitým aspektem studie byla úspěšná dlouhodobá kultivace izolovaných nádorových buněk až 6 měsíců.** Kultivované buňky mohou sloužit jako cenný materiál k dalšímu zkoumání genové analýzy i ke stanovení chemorezistence při managementu personalizované terapie karcinomu endometria.

Tabulka 1: Charakteristika souboru pacientek s CTC pozitivitou / negativitou

	n	CTC+	CTC-	%	p-Value
Total number of patients	92	69	23	75	
Histology					
Endometrial adenocarcinoma	81	65	16	80	
Papillary serous adenocarcinoma	9	5	4	56	
Endometrial stromal sarcoma	1	0	1	0	
Clear cell adenocarcinoma	1	1	0	100	
Grade					
Grade 1	29	23	6	79	0.648
Grade 2	46	33	13	72	
Grade 3	16	13	3	81	
FIGO					
IA	49	37	12	76	0.966
IB	22	15	7	68	
II	13	10	3	77	
IIIA	1	1	0	100	
IIIC1	3	3	0	100	
IIIC2	3	2	1	67	
Further staging					
Lymph node involvement YES	6	5	1	83	0.616
Lymph node involvement NO	85	63	22	74	
Peritoneal carcinomatosis	1	1	0	100	N/A
Ascites	0	0	0	N/A	N/A
Residual disease	0	0	0	N/A	N/A

4.1.2 Diskuse

Identifikace nových molekulárních markerů souvisejících se zvýšeným rizikem rekurence a monitorace efektivity terapie jsou momentálně velkou výzvou u karcinomu endometria. Tekutá biopsie (liquid biopsy) znamená revoluci v onkologii všeobecně a má předpoklady hrát významnou roli v personalizované terapii nemocných.

Nejlepším aktuálním shrnutím problematiky ilustruje publikace španělských autorů (Muineloromay et al., 2018). Vedle děložního aspirátu, cfDNA, ctDNA, cirkulující miRNA a EPC řadí CTC mezi potenciálně využitelné v hodnocení prognózy a plánování pooperační terapie. Předpokladem je, že kombinováním těchto metod identifikujeme mutace, které nám pomůžou v strategii přístupu pokročilého onemocnění, časně detekce recidivy a personalizovaném přístupu u terapeutické rezistence vedoucí k relapsu. Vhodně designované klinické studie na větších souborech pacientek spolu se zhodnocením technické metodiky a ekonomických faktorů slibují šanci na posunutí personalizované medicíny v gynekologické onkologii o krok dál.

4.1.3. Závěr

Článek popisuje úspěšnou izolaci CTC u pacientek s karcinodem endometria. Vysoká pozitivita CTC i u dobře diferencovaných karcinomů v časném stádiu upozorňuje na potenciál

šíření metastáz tohoto onemocnění. Neprokázali jsme korelaci mezi CTC a stádiem, stupněm a postižením lymfatických uzlin značící jejich individuální charakter s eventuální možností využití i při monitoringu efektivity léčby. Velkou výhodou metody izolace je i možná další kultivace živých CTC s následnou funkční a molekulární analýzou.

4.2. Je možno využití cirkulujících endometriálních buněk v diagnostice a monitorování endometriózy? Publikace č. 3: **Pospisilova, E., Kiss, I., Souckova, H., Tomes, P., Spicka, J., Matkowski, R., Jedryka, M., Ferrero, S., Bobek, V., Kolostova, K., 2019. Circulating Endometrial Cells: A New Source of Information on Endometriosis Dynamics. J Clin Med 8 [IF 5.688]**

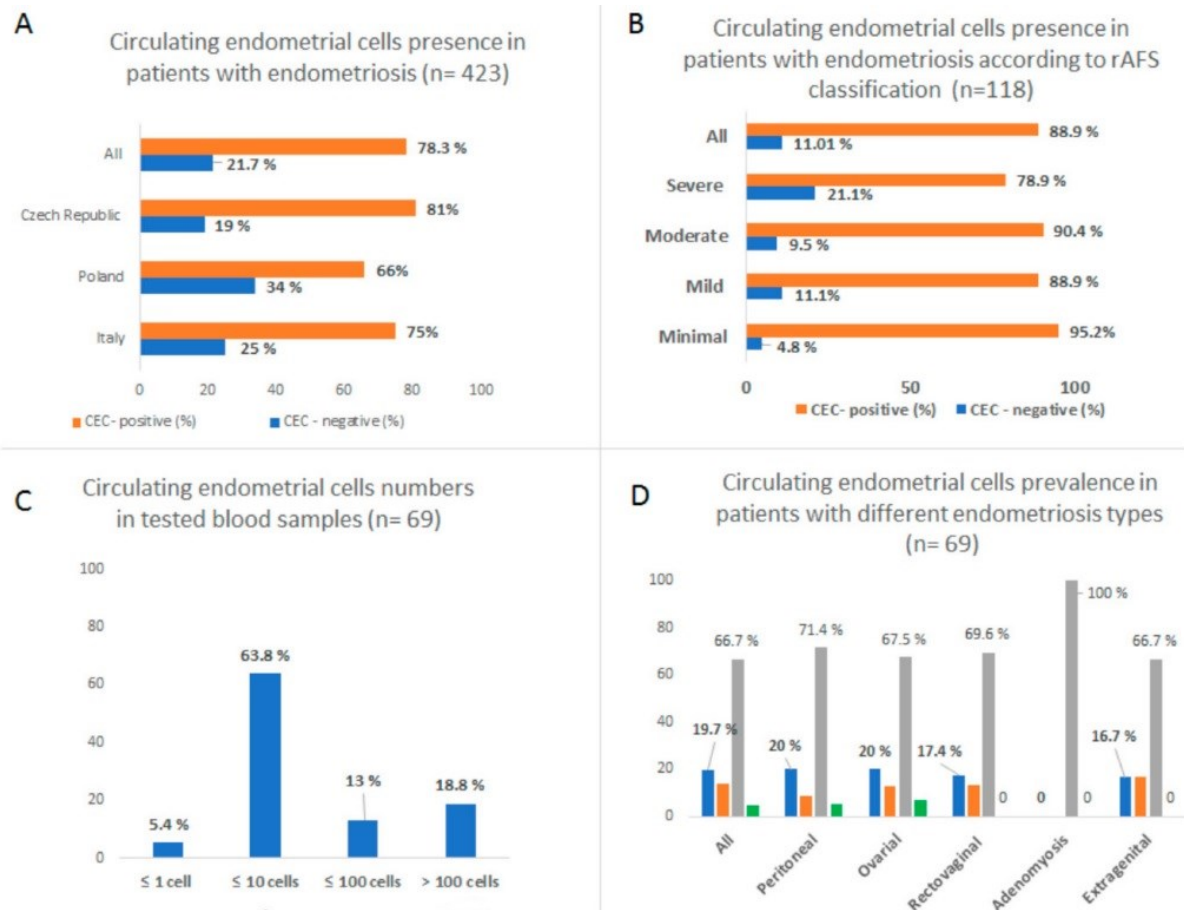
CEC byly popsány v pilotní studii v roce 2014. Současná studie měla zjistit zda-li kvantitativní porovnání CEC u různých typů a stádií endometriózy na velkém souboru pacientek specifikuje možnou souvislost nebo prokáže heterogenitu onemocnění. Zkoumáním dynamiky změn v různých fázích menstruačního cyklu a následnou molekulární analýzou získáme geny charakteristické pro endometriózu, které nám následně poslouží k pochopení role CEC na patogenezi endometriózy.

4.2.1 Výsledky

Kvantitativní analýza

Studie byla koncipovaná jako prospektivní a multicentrická (Polsko, Itálie a Česká republika, ve které spolupracovalo 9 center). Ze 423 vzorků byly CEC detekovány ve 331 případech (pozitivita 78 %). Důkladným cytomorfoloogickým vyšetřením byly zjištěny epiteliální, glandulární a buňky podobné kmenovým (stem cell-like). Pozitivita vzorků se nelišila mezi jednotlivými pracovišti, a ve všech typech i stádiích endometriózy se detekovali CEC bez výraznější kvantitativní odchylky. Je zajímavé, že ve všech skupinách (rAFS klasifikace, typ endometriózy, odběrové centrum) bylo přibližně 20% vzorků s počtem více než 100 buněk. Paradoxně nejvíce negativních vzorků bylo u pokročilé endometriózy (rAFS stadium IV). Detailnější kvantitativní data uvádí *obrázek 4*. Brzké poovulační období (14.-17. den) bylo charakteristické s nejvyšším počtem izolovaných buněk.

Obrázek 5: Detekce CEC u pacientek s endometriózou. **(A)** Percentuální pozitivita mezi jednotlivými centry. **(B)** Percentuální pozitivita u jednotlivých stádiích dle klasifikace rAFS. **(C)** Percentuální zastoupení dle počtu izolovaných buněk. **(D)** Percentuální pozitivita dle typu endometriózy.

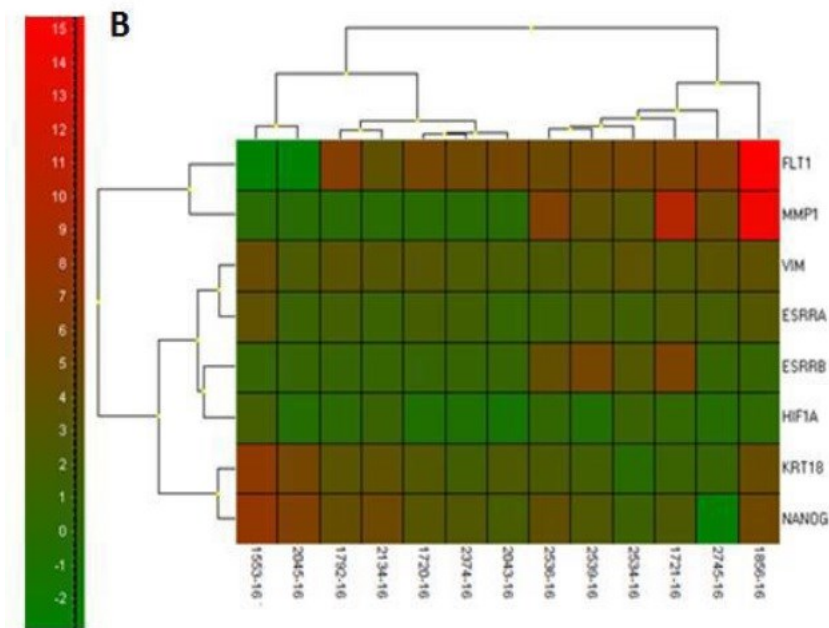


Genová analýza

K výběru nejvíce specifických genů endometriózy jsme dospěli porovnáním genové analýzy získané z tkáně ovariální endometriózy (endometriomu) a venózní krve (s cirkulujícími endometriálními buňkami) u stejné pacientky. Celkově bylo do analýzy zahrnuto 20 genů. Dle klastrové analýzy výsledků qPCR byla vybrána skupina genů (KRT18, KRT19, VIM, NANOG), které dále sloužili k identifikaci CEC v dalších vzorcích a doporučujeme jejich využití i v budoucích pracích na CEC.

Genové analýze bylo podrobena 13 vysoce pozitivních vzorků (více než 100 CEC). Jak ukazuje klastrová analýza (obrázek 5), buňky lze rozdělit do dvou skupin. První klastr vykazuje zvýšenou expresi genů FLT1, MMP1 a ESRRB, druhý klastr NANOG, KRT18, VIM.

Obrázek 6: Klastrová analýza vysoce pozitivních vzorků. Vpravo skupina s elevací exprese FLT1, MMP1, ESRRB, vlevo NANOG, KRT18, VIM.

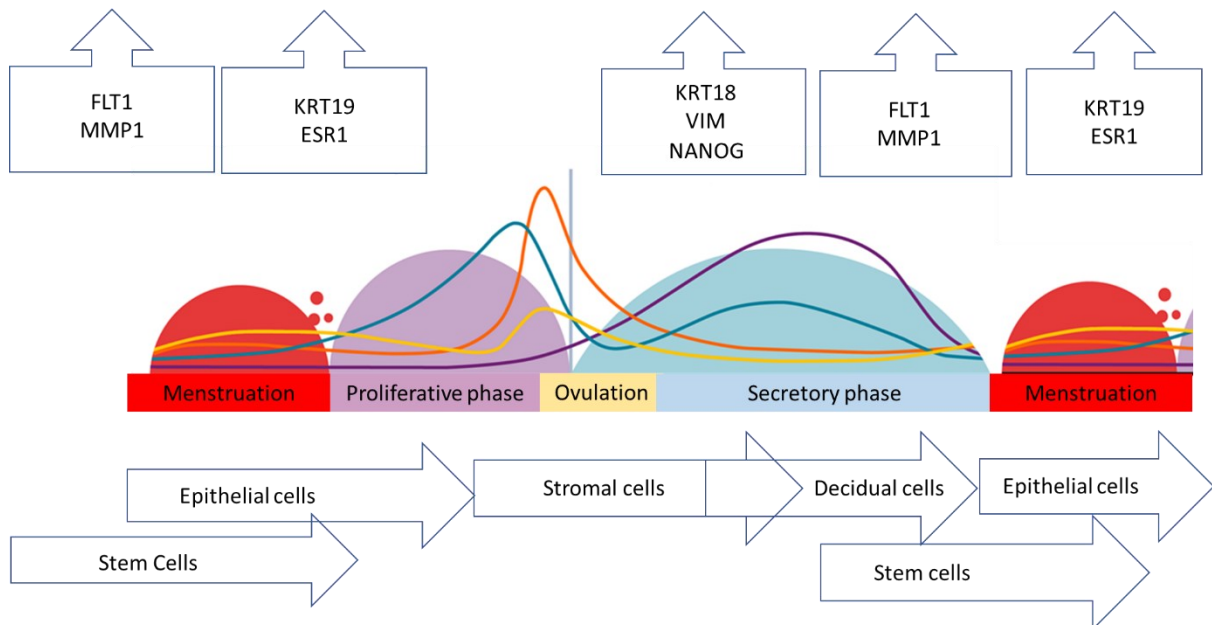


Signifikantním rozdílem mezi vysoce pozitivními vzorky a středně pozitivními (10 až 100 buněk) byla exprese FLT1 (zvýšená u vysoce pozitivních). Analýzou 52 vzorků středně pozitivních byla zjištěna elevace KRT18, VIM, NANOG, MMP9 a deprese HIF1A, CD10 a MUC1 oproti vzorků plné krve.

Pro tyto rozdíly jsme hledali vysvětlení při bližším sledování CEC během menstruačního cyklu (*obrázek 6*). 11 žen s potvrzenou endometriózou mělo minimálně 4 odběry krve v různých fázích cyklu (menstruace, proliferace, ovulace, sekrece). CEC byly přítomny ve všech fázích cyklu s největším počtem těsně po ovulaci. Cytomorfologie CEC se měnila během cyklu (epiteliální, stromální, kmenová). Podobně se měnila i exprese genů během fáze cyklu. Exprese strukturálních genů (KRT18, NANOG, VIM) dosahovala maxima v post ovulačním období, což by mohlo znamenat přítomnost kmenovou a stromální (mesenchymální) v populaci CEC. Na konci sekreční a začátku proliferační fáze dominovala exprese FLT1 a MMP1 typická pro angiogenezi. Zvýšená exprese ESR1 v proliferační fázi zrcadlí receptivitu buněk na estrogenu indukující růst endometria. Velmi zajímavým zjištěním je nepřítomnost PGR. Vzhledem k expresi ESR1 u CEC jenom v první půlce cyklu a nepotvrzenou expresí PGR se naskytá otázka, jestli je většina CEC v cirkulaci nevnímavá k hormonům a jaké to má důsledky na terapii? Teorii endometriózy jako nemoc kmenových buněk podporuje i zvýšená exprese NANOG (marker kmenových buněk) během cyklu (Sasson and Taylor, 2008). Diseminace

těchto progenitorových buněk by vysvětlovala možnost zakládání vzdálených a hluboko infiltrujících ložisek endometriózy.

Obrázek 7: Cytomorfológické změny a rozdíly v profilu genové exprese u CEC v různých fázích menstruačního cyklu.



4.2.2. Diskuse

Inspirací k práci byla první úspěšná izolace a popis CEC z periferní krve pacientek s endometriózou (Bobek et al., 2014). Tyto buňky potvrdila i další studie, ve které pozitivita CEC měla vyšší senzitivitu než elevace CA-125 při I a II stupni endometriózy (Chen et al., 2017). Autoři v další publikaci detekovali cirkulující stromální endometriální buňky (CD10 pozitivita) hypotézujíc proces EMT i u endometriózy (Vallvé-Juanico et al., 2019). Tato zjištění teoretizuje jednak o podobné iniciaci šíření endometriózy jako metastázování maligních nádorů a rovněž vznikem vzdálených ložisek prostřednictvím mesenchymálních kmenových endometriálních buněk (Li et al., 2018).

4.2.3. Závěr

CEC je individuální marker endometriózy bez spojitosti se stádiem a typem onemocnění a subjektivními potíží pacientky. Nejvyšší počet CEC je detekován bezprostředně po ovulaci. Během menstruačního cyklu se mění cytomorfológické složení i genový profil CEC dle fáze cyklu. Omezená exprese estrogenových receptorů a absence progesteronových receptorů by v budoucnu mohla personalizovat konzervativní léčbu endometriózy. Detekce buněk

podobajících se kmenovým buňkám podporuje hypotézu endometriózy jako onemocnění kmenových buněk.

4.3. Je možné cirkulující endometriální buňky využít v diagnostice a léčbě u pacientek se spontánním pneumotoraxem? Publikace č. 4: **Kiss, I., Pospisilova, E., Kolostova, K., Maly, V., Stanek, I., Lischke, R., Schutzner, J., Pawlak, I., Bobek, V., 2020. Circulating Endometrial Cells in Women With Spontaneous Pneumothorax. Chest 157, 342–355 [IF 9.657].**

Katameniální pneumotorax je často spojen s pánevní endometriózou a je nejčastější formou syndromu hrudní endometriózy. Vyskytuje se poměrně raritně a vlivem multidisciplinární diagnostiky a léčby je povědomí mezi lékaři zainteresovaných oborů (chirurg, plicní internista, gynekolog) nízké. Z předešlých studií byly izolovány cirkulující endometriální buňky u pacientek s endometriózou. Na základě tohoto zjištění předpokládáme přítomnost CEC u pacientek se spontánním pneumotoraxem s vysokou pravděpodobností na katameniální charakter. Izolací a další cytomorfológickou a genovou analýzou zjistíme víc o charakteru těchto buněk i možné patofyziologii onemocnění.

4.3.1. Výsledky

U 20 žen hospitalizovaných pro spontánní pneumotorax s katameniálním charakterem byly odebrány 2 zkumavky venózní krve. Ve všech 40 vzorcích byly detekované CEC (100 % pozitivita). U 4 pacientek bylo po terapii sledován počet CEC v týdenním intervalu po dobu jednoho měsíce a následně i v různých fázích menstruačního cyklu. Chirurgický výkon snížil počet CEC během pooperačního sledování, nicméně úplná negativita byla dosáhnuta pouze u jediné pacientky.

Z 20 pacientek mělo 7 žen (35%) počet izolovaných CEC více než 100, z těchto 7 měli 3 (43%) potvrzená ložiska endometriózy na pleure nebo noduly v plicní tkáni a u 5 (72%) to byla opakovaná epizoda pneumotoraxu. Z tohoto můžeme uvažovat spojitost vysokého počtu CEC a katameniálním pneumotoraxem. Jiná klinická souvislost nebyla zjištěna (pro kompletní výsledky odkazují na tabulku v původním článku přiloženou v příloze). Cytomorfológická analýza hodnotila velikost a tvar buňky i jádra, strukturu jádra, počet jadérek, intenzitu cytoplazmy, počet a velikost vakuol. In vitro kultivací jsme pozorovali rostoucí i aktivně se dělící individuální CEC i shluky buněk. Observací se buňky dělily do 4 typů: epiteliální (55%), podobné kmenovým buňkám (30%), stromální (7%) a glandulární (7%).

Tuto cytomorfologickou diverzitu jsme prokázali i následnou molekulární analýzou. Prokázali jsme zvýšenou expresi markerů pro epiteliální i neepiteliální charakter CEC. Zvýšenou expresi ve vzorků od pacientek s pneumotoraxem jsme zaznamenali u genů VIM, KRT18, NANOG, CD10 a ESRRA. Porovnáním genových profilů jsme detekovali dva různé fenotypy CEC: první fenotyp u pacientek s potvrzenou endometriózou bránice a druhý fenotyp ve spojitosti s endometriálními ložisky na pleuře. Zjištění by vysvětlovalo dvě možné hypotézy tvorby syndromu hrudní endometriózy. I. První cesta je migrace endometriálních buněk pomocí retrográdní menstruace do malé pánve a poté peritoneální cirkulací směrem k bránici. Průnik CEC přes fenestrace bránice dopomáhá i píšťkový mechanismus tlaku jater k bránici (spontánní pneumotorax se více vyskytuje na levé straně). II. Druhá teoretická cesta je přes hematogenní šíření do plicní tkáně. Genovou analýzou jsme pozorovali zvýšenou expresi ESR u žen s první incidencí spontánního pneumotoraxu v porovnáním s rekurentními příhodami.

V dalším kroku jsme porovnávali již známý molekulární profil vzorků od pacientek se spontánním pneumotoraxem se vzorky pacientek s histologicky prokázanou pánevní endometriózou. U žen po spontánním pneumotoraxu byla signifikantně zvýšena exprese HER2, což spolu s KRT18 může sloužit jako specifický marker k identifikaci epizod pneumotoraxu. Na druhou stranu vzorky žen s pánevní endometriózou vykazovali vyšší expresi VEGF. Pacientky se spontánním pneumotoraxem s vysokým počtem CEC měly zvýšenou expresi genů MUC1 a MUC16, které souvisí s pánevní endometriózou. Obě skupiny CEC (pneumotorax i pánevní endometrióza) měly zvýšenou expresi KRT18 a VIM v porovnání s expresí vzorků ze zdravé endometriální tkáně.

Endometriální původ CEC jsme potvrdili imunohistochemickou analýzou detekci VIM. Signifikantně víc VIM jsme pozorovali ve vzorcích pacientek s pánevní endometriózou, na druhou stranu CEC s prokázaným VIM byly větší u pacientek po pneumotoraxu (49 ± 12 vs $37 \pm 9 \mu\text{m}$).

4.1.2 Diskuse

Naše studie byla první, která popsala přítomnost i genetický profil CEC u pacientek se spontánním katameniálním pneumotoraxem. Poskytuje možnou odpověď výběru žen se známou endometriózou s rizikem vzniku spontánního pneumotoraxu. Na druhou stranu při podezření na katameniální charakter spontánního pneumotoraxu a nálezu CEC je možné pacientku gynekologicky vyšetřit pro pravděpodobnou etiologii endometriózy a zahájit následnou léčbu ke snížení riziku recidivy. Pro chirurgy by včasná diagnostika endometriální

etiologie pomohla ve volbě vhodného zákroku již při začátku prezentace pneumotoraxu a vyloučilo jinou etiologii potíží.

4.1.3 Závěr

Publikace prezentuje úspěšnou izolaci CEC u všech pacientek se spontánním pneumotoraxem s podezřením na katameniální charakter. Genetická analýza CEC poukazuje na různé patofyziologické pochody, korespondující s perioperačním nálezem (brániční fenestrace vs. pleurální implantace ložisek endometriózy). Signifikantní elevace genu HER2 ve vzorků CEC u žen se spontánním pneumotoraxem může sloužit jako marker u žen s již známou endometriózou pro vznik pneumotoraxu v budoucnu. Při první epizodě pneumotoraxu a nálezů CEC je časné odeslání ke gynekologické konzultaci a potvrzení endometriózy s následnou léčbou klíčové ke snížení rizika opakujících se pneumotoraxů.

5. Souhrn / Summary

5.1. Souhrn

Předložený souhrn publikací se věnuje sporadickým buňkám u gynekologických onemocnění. V úvodu je popsána problematika CTC buněk a jejich současné využití v klinické praxi. Následně se již věnuje výhradně oboru gynekologie, souhrnou prací na CTC u karcinomu endometria, děložního čípku a vaječníků. V komentáři k článku autor podává ještě doplňující aktuální informace. Následující originální článek prezentuje úspěšnou izolaci CTC u karcinomu endometria bez korelace se stadiem, stupněm nebo postižením lymfatických uzlin. Ve druhé polovině práce cytomorfológickou a molekulární analýzou cirkulujících endometriálních buněk u pacientek s endometriózou demonstruje nové pohledy do dynamiky patofyziologie tohoto onemocnění. Navrhuje možné klinické využití CEC u žen se spontánním pneumotoraxem, kdy ložiska endometriózy způsobují tzv. syndrom hrudní endometriózy. Včasnou správnou diagnózou se zvyšuje terapeutický efekt a specializovanou monitorací gynekologem snižuje riziko recidivy pneumotoraxu.

CTC a CEC jsou potencionálními nástroji v diagnostice a terapii v tzv. personalizované medicíně. Je potřeba dalších studií k podložení prezentovaných dat, které vedou k přesvědčení i širší odborné veřejnosti k budoucímu klinickému využití těchto sporadických buněk.

5.2. Summary

The presented monothematic thesis concentrates on rare cells in gynecological diseases. The introduction describes the problematics of circulating tumor cells and their momentary state in clinical medicine. Further on it focuses specifically on gynecology, beginning with a review article about CTC in endometrial, cervical and ovarian cancer. In the follow up commentary the author adds up-to-date additional information. The following original article presents the successful isolation of CTC in patients with endometrial cancer without correlation with disease stage, grade or lymph node involvement. In the second part of the thesis, cytomorphologic and molecular analysis of circulating endometrial cells in patients with endometriosis demonstrates new insights in the pathophysiology of this disease. Suggest a clinical use of CEC in patients with spontaneous pneumothorax, when endometrial lesions develop into thoracic endometriosis syndrome. Precise early diagnostics increases the therapeutical effect and specialized follow-up by the gynecologist lowers the recurrence of subsequent pneumothoraxes.

CTC and CEC are a potential tool in diagnostics and therapy tailored for the individual patients, so called personalized medicine. Further studies are needed to prove the presented results, which could convince other professionals in medicine for future clinical use of these rare cells.

6. Zkratky a vysvětlivky:

AR-V7 (androgen receptor splice variant 7)

CA-125 (cancer antigen 125)

CEC (circulating endometrial cells) – cirkulující endometriální buňky

cDNA (complementary DNA)

cfDNA (cell free DNA)

ctDNA (circulating tumor DNA)

CTC (circulating tumor cells) – cirkulující nádorové buňky

CRPC (castration resistant prostate cancer) – kastračně rezistentní karcinom prostaty

DNA (deoxyribonucleic acid) – kyselina deoxyribonukleová

DTC (disseminated tumor cells) – diseminované nádorové buňky

EMT (epitelial mesenchymal transition)

EPC (endothelial progenitor cells)

ESR1 (Estrogen Receptor 1)

FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics)

FLT1 / VEGFR1 (Vascular Endothelial Growth Factor 1)

HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2)

CHT – chemoterapie

KRT (keratin)

miRNA (micro RNA)

MMP1 (Matrix Metalloproteinase 1)

NANOG – marker kmenových buněk

PGR (Progesteron Receptor)

PFS (progression free survival) – přežití bez progresse

PSA (prostate specific antigen) – prostatický specifický antigen

qPCR (quantitative polymerase chain reaction)

rAFS (revised American Fertility Society)

RMI – Risk of Malignancy Index

ROMA – Risk of Ovarian Malignancy Algorithm

OS (Overall survival) – celkové přežití

VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor)

VIM (Vimentin) – mesenchymální marker

7. Seznam použité literatury:

- Alix-Panabières, C., Pantel, K., 2021. Liquid Biopsy: From Discovery to Clinical Application. *Cancer Discov* 11, 858–873. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-1311>
- Azevedo, R., Soares, J., Peixoto, A., Cotton, S., Lima, L., Santos, L.L., Ferreira, J.A., 2018. Circulating tumor cells in bladder cancer: Emerging technologies and clinical implications foreseeing precision oncology. *Urol Oncol* 36, 221–236. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2018.02.004>
- Bankó, P., Lee, S.Y., Nagygyörgy, V., Zrínyi, M., Chae, C.H., Cho, D.H., Telekes, A., 2019. Technologies for circulating tumor cell separation from whole blood. *J Hematol Oncol* 12. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0735-4>
- Banys-Paluchowski, M., Fehm, T., Neubauer, H., Paluchowski, P., Krawczyk, N., Meier-Stiegen, F., Wallach, C., Kaczerowsky, A., Gebauer, G., 2020. Clinical relevance of circulating tumor cells in ovarian, fallopian tube and peritoneal cancer. *Arch Gynecol Obstet* 301, 1027–1035. <https://doi.org/10.1007/s00404-020-05477-7>
- Bobek, V., Kolostova, K., Kucera, E., 2014. Circulating endometrial cells in peripheral blood. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 181, 267–274. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2014.07.037>
- Chen, V.L., Xu, D., Wicha, M.S., Lok, A.S., Parikh, N.D., 2020. Utility of Liquid Biopsy Analysis in Detection of Hepatocellular Carcinoma, Determination of Prognosis, and Disease Monitoring: A Systematic Review. *Clin Gastroenterol Hepatol* 18, 2879–2902.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2020.04.019>
- Chen, Y., Zhu, H.-L., Tang, Z.-W., Neoh, K.H., Ouyang, D.-F., Cui, H., Cheng, H.-Y., Ma, R.-Q., Ye, X., Han, R.P., Chang, X.-H., 2017. Evaluation of Circulating Endometrial Cells as a Biomarker for Endometriosis. *Chin. Med. J.* 130, 2339–2345. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.215325>
- Cui, K., Ou, Y., Shen, Y., Li, S., Sun, Z., 2020. Clinical value of circulating tumor cells for the diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma (HCC). *Medicine (Baltimore)* 99. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000022242>
- Gao, Y., Xi, H., Wei, B., Cui, J., Zhang, K., Li, H., Cai, A., Shen, W., Li, J., Rosell, R., Chao, J., Chen, T., Klempner, S., Qiao, Z., Chen, L., 2019. Association Between Liquid Biopsy and Prognosis of Gastric Cancer Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Oncol* 9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01222>

- Hayflick, L., 1997. Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry (Mosc)* 62, 1180–1190.
- Hüsemann, Y., Geigl, J.B., Schubert, F., Musiani, P., Meyer, M., Burghart, E., Forni, G., Eils, R., Fehm, T., Riethmüller, G., Klein, C.A., 2008. Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell* 13, 58–68. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.12.003>
- Jiang, S.-S., Deng, B., Feng, Y.-G., Qian, K., Tan, Q.-Y., Wang, R.-W., 2019. Circulating tumor cells prior to initial treatment is an important prognostic factor of survival in non-small cell lung cancer: a meta-analysis and system review. *BMC Pulm Med* 19, 262. <https://doi.org/10.1186/s12890-019-1029-x>
- Khetrpal, P., Lee, M.W.L., Tan, W.S., Dong, L., de Winter, P., Feber, A., Kelly, J.D., 2018. The role of circulating tumour cells and nucleic acids in blood for the detection of bladder cancer: A systematic review. *Cancer Treat Rev* 66, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2018.03.007>
- Kim, M., Suh, D.H., Choi, J.Y., Bu, J., Kang, Y.-T., Kim, K., No, J.H., Kim, Y.B., Cho, Y.-H., 2019. Post-debulking circulating tumor cell as a poor prognostic marker in advanced stage ovarian cancer. *Medicine (Baltimore)* 98. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000015354>
- Kim, N.W., Piatyszek, M.A., Prowse, K.R., Harley, C.B., West, M.D., Ho, P.L., Coviello, G.M., Wright, W.E., Weinrich, S.L., Shay, J.W., 1994. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266, 2011–2015. <https://doi.org/10.1126/science.7605428>
- Kiss, I., Kolostova, K., Pawlak, I., Bobek, V., n.d. Circulating tumor cells in gynaecological malignancies 11.
- Kiss, I., Pospisilova, E., Kolostova, K., Maly, V., Stanek, I., Lischke, R., Schutzner, J., Pawlak, I., Bobek, V., 2020. Circulating Endometrial Cells in Women With Spontaneous Pneumothorax. *Chest* 157, 342–355. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2019.09.008>
- Lauritano, D., Oberti, L., Gabrione, F., Lucchese, A., Petruzzi, M., Carinci, F., Lo Muzio, L., 2019. Liquid biopsy in head and neck squamous cell carcinoma: Prognostic significance of circulating tumor cells and circulating tumor DNA. A systematic review. *Oral Oncology* 97, 7–17. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2019.07.003>
- Li, F., Alderman, M.H., Tal, A., Mamillapalli, R., Coolidge, A., Hufnagel, D., Wang, Z., Neisani, E., Gidicsin, S., Krikun, G., Taylor, H.S., 2018. Hematogenous Dissemination of Mesenchymal Stem Cells from Endometriosis. *Stem Cells* 36, 881–890. <https://doi.org/10.1002/stem.2804>

- Li, Y., Wu, G., Yang, W., Wang, X., Duan, L., Niu, L., Zhang, Y., Liu, J., Hong, L., Fan, D., 2020. Prognostic value of circulating tumor cells detected with the CellSearch system in esophageal cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer* 20, 581. <https://doi.org/10.1186/s12885-020-07059-x>
- Manaker, S., 2020. Circulating Endometrial Cells. *Chest* 157, 245–246. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2019.10.036>
- Mansouri, S., Mokhtari-Hesari, P., Naghavi-Al-Hosseini, F., Majidzadeh-A, K., Farahmand, L., 2019. The Prognostic Value of Circulating Tumor Cells in Primary Breast Cancer Prior to any Systematic Therapy: A Systematic Review. *Curr Stem Cell Res Ther* 14, 519–529. <https://doi.org/10.2174/1574888X14666190306103759>
- Marquette, C.-H., Boutros, J., Benzaquen, J., Ferreira, M., Pastre, J., Pison, C., Padovani, B., Bettayeb, F., Fallet, V., Guibert, N., Basille, D., Ilie, M., Hofman, V., Hofman, P., AIR project Study Group, 2020. Circulating tumour cells as a potential biomarker for lung cancer screening: a prospective cohort study. *Lancet Respir Med* 8, 709–716. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30081-3](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30081-3)
- Matsushita, D., Arigami, T., Okubo, K., Sasaki, K., Noda, M., Kita, Y., Mori, S., Uenosono, Y., Ohtsuka, T., Natsugoe, S., 2020. The Diagnostic and Prognostic Value of a Liquid Biopsy for Esophageal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancers (Basel)* 12. <https://doi.org/10.3390/cancers12103070>
- Muinelo-Romay, L., Casas-Arozamena, C., Abal, M., 2018. Liquid Biopsy in Endometrial Cancer: New Opportunities for Personalized Oncology. *International Journal of Molecular Sciences* 19, 2311. <https://doi.org/10.3390/ijms19082311>
- Pantel, K., Denève, E., Nocca, D., Coffy, A., Vendrell, J.-P., Maudelonde, T., Riethdorf, S., Alix-Panabières, C., 2012. Circulating Epithelial Cells in Patients with Benign Colon Diseases. *Clinical Chemistry* 58, 936–940. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2011.175570>
- Quintanal-Villalonga, Á., Chan, J.M., Yu, H.A., Pe'er, D., Sawyers, C.L., Sen, T., Rudin, C.M., 2020. Lineage plasticity in cancer: a shared pathway of therapeutic resistance. *Nature Reviews Clinical Oncology* 17, 360–371. <https://doi.org/10.1038/s41571-020-0340-z>
- Sasson, I.E., Taylor, H.S., 2008. Stem cells and the pathogenesis of endometriosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1127, 106–115. <https://doi.org/10.1196/annals.1434.014>
- Sparano, J., O'Neill, A., Alpaugh, K., Wolff, A.C., Northfelt, D.W., Dang, C.T., Sledge, G.W., Miller, K.D., 2018. Association of Circulating Tumor Cells With Late Recurrence of Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer: A Secondary Analysis of a Randomized

- Clinical Trial. *JAMA Oncol* 4, 1700–1706.
<https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.2574>
- Takakura, M., Kyo, S., Nakamura, M., Maida, Y., Mizumoto, Y., Bono, Y., Zhang, X., Hashimoto, Y., Urata, Y., Fujiwara, T., Inoue, M., 2012. Circulating tumour cells detected by a novel adenovirus-mediated system may be a potent therapeutic marker in gynaecological cancers. *Br J Cancer* 107, 448–454.
<https://doi.org/10.1038/bjc.2012.276>
- Takakura, M., Matsumoto, T., Nakamura, M., Mizumoto, Y., Myojyo, S., Yamazaki, R., Iwadare, J., Bono, Y., Orisaka, S., Obata, T., Iizuka, T., Kagami, K., Nakayama, K., Hayakawa, H., Sakurai, F., Mizuguchi, H., Urata, Y., Fujiwara, T., Kyo, S., Sasagawa, T., Fujiwara, H., 2018. Detection of circulating tumor cells in cervical cancer using a conditionally replicative adenovirus targeting telomerase-positive cells. *Cancer Sci* 109, 231–240. <https://doi.org/10.1111/cas.13449>
- Takakura, M., Takata, E., Sasagawa, T., 2020. A Novel Liquid Biopsy Strategy to Detect Small Amounts of Cancer Cells Using Cancer-Specific Replication Adenoviruses. *J Clin Med* 9. <https://doi.org/10.3390/jcm9124044>
- Tan, Y., Wu, H., 2018. The significant prognostic value of circulating tumor cells in colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Curr Probl Cancer* 42, 95–106.
<https://doi.org/10.1016/j.currprobcancer.2017.11.002>
- Trapp, E., Janni, W., Schindlbeck, C., Jückstock, J., Andergassen, U., de Gregorio, A., Alunni-Fabbroni, M., Tzschaschel, M., Polasik, A., Koch, J.G., Friedl, T.W.P., Fasching, P.A., Haeberle, L., Fehm, T., Schneeweiss, A., Beckmann, M.W., Pantel, K., Mueller, V., Rack, B., Scholz, C., SUCCESS Study Group, 2019. Presence of Circulating Tumor Cells in High-Risk Early Breast Cancer During Follow-Up and Prognosis. *J Natl Cancer Inst* 111, 380–387. <https://doi.org/10.1093/jnci/djy152>
- Vallvé-Juanico, J., López-Gil, C., Ballesteros, A., Santamaria, X., 2019. Endometrial Stromal Cells Circulate in the Bloodstream of Women with Endometriosis: A Pilot Study. *Int J Mol Sci* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20153740>
- Wang, L., Li, Y., Xu, J., Zhang, A., Wang, X., Tang, R., Zhang, X., Yin, H., Liu, M., Wang, D.D., Lin, P.P., Shen, L., Dong, J., 2018. Quantified postsurgical small cell size CTCs and EpCAM+ circulating tumor stem cells with cytogenetic abnormalities in hepatocellular carcinoma patients determine cancer relapse. *Cancer Lett* 412, 99–107.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.10.004>

- Wang, Y., Yu, X., Hartmann, D., Zhou, J., 2020. Circulating tumor cells in peripheral blood of pancreatic cancer patients and their prognostic role: a systematic review and meta-analysis. *HPB (Oxford)* 22, 660–669. <https://doi.org/10.1016/j.hpb.2019.11.003>
- Xun, Y., Cao, Q., Zhang, J., Guan, B., Wang, M., 2020. Clinicopathological and prognostic significance of circulating tumor cells in head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol* 104, 104638. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2020.104638>
- Yabusaki, M., Sato, J., Kohyama, A., Kojima, T., Nobuoka, D., Yoshikawa, T., Sawada, Y., Murakami, K., Gohda, K., Okegawa, T., Nakamura, M., Takamatsu, K., Ito, M., Kaneko, K., Nakatsura, T., 2014. Detection and preliminary evaluation of circulating tumor cells in the peripheral blood of patients with eight types of cancer using a telomerase-specific adenovirus. *Oncol Rep* 32, 1772–1778. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3436>
- Ye, Y., Li, S.-L., Wang, J.-J., Liu, B., 2019. The diagnostic value of circulating tumor cells for lung cancer. *Medicine (Baltimore)* 98. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000014936>
- Zhao, Q., Yuan, Z., Wang, H., Zhang, H., Duan, G., Zhang, X., 2021. Role of circulating tumor cells in diagnosis of lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Int Med Res* 49. <https://doi.org/10.1177/0300060521994926>
- Zhu, Y., Zhang, H., Chen, N., Hao, J., Jin, H., Ma, X., 2020. Diagnostic value of various liquid biopsy methods for pancreatic cancer. *Medicine (Baltimore)* 99. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000018581>

8. Přílohy

Publikace č. 1, přehledný článek: Circulating cells in gynecological malignancies

Publikace č. 2, originální práce: Correlation between disease stage and the presence of viable circulating tumor cells in endometrial cancer

Publikace č. 3, originální práce: Circulating endometrial cells: A new source of information on endometriosis dynamics

Publikace č. 4, originální práce: Circulating endometrial Cells in women with spontaneous pneumothorax