



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Validace metody přímé detekce cirkulujících
nádorových buněk u pacientů s kolorektálním
karcinomem**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Tereza Přikrylová
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Pavel Stejskal
Supervizor:	MUDr. Josef Srovnal, Ph.D.
Rok:	2023

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Tereza Přikrylová
Název práce	Validace metody přímé detekce cirkulujících nádorových buněk u pacientů s kolorektálním karcinomem
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Pavel Stejskal
Rok obhajoby	2023
Abstrakt	Teoretická část bakalářské práce se zabývá podstatou rozvoje a progresu kolorektálního karcinomu, světově třetím nejrozšířenějším nádorovým onemocněním. Velmi často dochází k progresi onemocnění a šíření nádorových buněk, tedy prekursorů metastáz, z primárního nádoru do vzdálených orgánů, což je spojeno s tvorbou metastáz. Dominující příčinou je pozdní diagnostika karcinomu v pokročilém stádiu, kdy jsou již zjevné příznaky. Bakalářská práce se zabývá detekcí cirkulujících nádorových buněk, které úzce souvisí s diseminací tumoru a metastáz. Pomocí jejich detekce lze charakterizovat karcinom z hlediska jeho heterogenity a dynamiky v čase. Cílem praktické části bakalářské práce byla validace a optimalizace detekce cirkulujících nádorových buněk přístrojem CytoTrack CT11TM. Nejprve proběhla validace s použitím nádorové linie SW480 a následně bylo přistoupeno k aplikaci metody na vzorky periferní krve pacientů s kolorektálním karcinomem. Byla započata rutinní analýza patientských vzorků s předpokladem uplatnění i na další typy tumorů.
Klíčová slova	Kolorektální karcinom, cirkulující nádorové buňky, metastáze, CytoTrack CT11 TM
Počet stran	50
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Tereza Přikrylová
Title of thesis	Validation of a method for direct detection of circulating tumor cells in patients with colorectal cancer
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Pavel Stejskal
The year of presentation	2023
Abstract	The theoretical part of bachelor thesis deals with the development and progression of colorectal cancer, the third most common cancer worldwide. The progression of the disease and the spread of tumor cells, i.e. precursors of metastases, from the primary tumor to distant organs is very often associated with the formation of metastases. The predominant cause is late diagnosis of cancer at an advanced stage when symptoms are already evident. The bachelor thesis deals with the detection of circulating tumor cells, which are closely related to tumor dissemination and metastasis. Their detection can be used to characterize the carcinoma in terms of its heterogeneity and dynamics over time. The aim of the practical part of bachelor thesis was to validate and optimize the detection of circulating tumor cells with the CytoTrack CT11TM instrument. First, validation was performed using the SW480 tumor cell line and then the method was applied to peripheral blood samples from colorectal cancer patients. Routine analysis of patient samples was initiated with the expectation of application to other tumor types.
Keywords	Colorectal cancer, circulating tumor cells, metastases, CytoTrack CT11 TM
Number of pages	50
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Pavla Stejskala za použití citované literatury.

V Olomouci dne 11.5.2023

Tereza Příkrylová

Poděkování

Bakalářská práce vznikla za podpory projektů AZV NV18-03-0047 a IGA_LF UP_2023_006. Tímto bych ráda poděkovala Mgr. Pavlu Stejskalovi za odborné vedení, ochotu, trpělivost a cenné rady při vypracování bakalářské práce. Dále děkuji Mgr. Veronice Černohorské, MUDr. Josefu Srovnalovi, Ph.D. a celému kolektivu Ústavu molekulární a translační medicíny za vstřícnost a ochotu při zpracování experimentální části bakalářské práce.

Obsah

1 Úvod	8
2 Cíle práce:.....	9
3 Současný stav řešené problematiky	10
3.1 Kolorektální karcinom	10
3.1.1 Obecná charakteristika kolorektálního karcinomu.....	10
3.1.2 Klasifikace kolorektálního karcinomu	11
3.1.3 Molekulárně-patologická podstata onemocnění.....	11
3.1.3.1 Mutace genů kolorektálního karcinomu.....	12
3.1.3.2 Familiární adenomatózní polypóza	13
3.1.3.3 Lynchův syndrom.....	13
3.2 Progrese onemocnění a diseminace tumoru.....	14
3.2.1 Nádorové mikroprostředí	15
3.2.2 Nádorové kmenové buňky	16
3.3 Cirkulující nádorové buňky	16
3.3.1 Epitelo-mesenchymální tranzice	16
3.3.1.1 Důsledky epitelo-mesenchymální tranzice v léčbě	17
3.3.2 Markery cirkulujících nádorových buněk	17
3.3.3 Interakce imunitního systému a cirkulujících nádorových buněk.....	18
3.3.4 Metody detekce cirkulujících nádorových buněk	19
3.3.5 Význam detekce cirkulujících nádorových buněk	21
4 Experimentální část	23
4.1 Materiál a metody	24
4.1.1 Detekce cirkulujících nádorových buněk systémem CytoTrack CT11™.....	24
4.1.1.1 Zpracování krevního vzorku	24
4.1.1.2 Aplikace vzorku na CytoDisc™	24
4.1.1.3 Skenování vzorku za použití CytoTrack™ software	25
4.1.1.4 Vyhodnocení výsledku programem CytoTrack CT11™ software	25
4.1.2 Validace metody detekce cirkulujících nádorových buněk systémem CytoTrack CT11™	26
4.1.2.1 Stanovení stability krevních vzorků.....	26
4.1.2.2 Stanovení senzitivity metody přímé imunofluorescence	26
4.1.3 Analýza krevních vzorků pacientů s kolorektálním karcinomem systémem CytoTrack CT11™.....	27
5 Výsledky	28
5.1 Stanovení stability krevních vzorků.....	28

5.2 Stanovení senzitivity metody přímé imunofluorescence	29
5.3 Analýza krevních vzorků pacientů s kolorektálním karcinomem systémem CytoTrack CT11 TM	29
6 Diskuze	36
7 Závěr	39
8 Literatura	40
9 Seznam použitých zkratek a symbolů	49

1 Úvod

Podle aktualizované databáze Globocan zkoumající incidenci a úmrtnost nádorových onemocnění bylo v roce 2020 odhaleno 19,3 milionů nových případů rakoviny a téměř 10 milionů lidí na ni zemřelo (Sung et al., 2021). Rakovina tlustého střeva a konečníku (CRC, z anglického termínu „Colorectal Cancer“) je celosvětově třetím nejčastěji vyskytujícím se nádorovým onemocněním a druhou nejčastější příčinou úmrtí na rakovinu (Bray et al., 2018). V České republice incidence CRC v posledních letech významně stoupala a patřila k nejvyšším na světě (Zastera et al., 2010). Zásadním problémem léčby a následného přežití pacientů je diagnostika karcinomu až v pokročilém stádiu s postiženými lymfatickými uzlinami a výskytem vzdálených metastáz (Cardoso et al., 2020).

Rozšíření nádorových buněk do vzdálených orgánů a tvorba metastáz jsou jedny z hlavních příčin úmrtí pacientů s CRC (Biller & Schrag, 2021). CTCs (CTCs, z anglického termínu „Circulating Tumor Cells“) jsou buňky uvolněné z primárního či metastatického nádoru a volně cirkulující v krevním řečišti. Jsou známy pro svoji schopnost zakládat sekundární nádory, metastázy (Lozar et al., 2019). Detekce CTCs byla v posledních letech předmětem zájmu mnohých výzkumů (Habli et al., 2020). Bylo představeno mnoho technologií založených na fyzikálních, morfologických či molekulárních vlastnostech CTCs detekovaných prostřednictvím pestré škály analyzátorů. Význam jejich detekce spočívá především ve včasné diagnostice, výběru vhodné léčby či terapie, čímž se významně může zlepšit prognóza pacienta (Lin et al., 2021).

V této bakalářské práci byla zoptimalizována a následně validována metoda přímé detekce CTCs u pacientů s CRC systémem CytoTrack CT11TM založeným na imunohistochemickém značení a následné semiautomatické detekci nádorových buněk (Ferreira et al., 2016). Následně byla metoda zavedena v rutinní analýze krevních vzorků pacientů s CRC pro vyšetření přítomnosti CTCs.

2 Cíle práce:

1. Provést literární rešerši v oblasti cirkulujících nádorových buněk u pacientů s kolorektálním karcinomem.
2. Získat teoretické a praktické znalosti metod detekce cirkulujících nádorových buněk se zaměřením na technologii CytoTrack CT11TM.
3. Zoptimalizovat a validovat metodu přímé detekce cirkulujících nádorových buněk v periferní krvi u pacientů s kolorektálním karcinomem za použití systému CytoTrack CT11TM.
4. Vyšetřit vzorky periferní krve pacientů s kolorektálním karcinomem na přítomnost cirkulujících nádorových buněk.

3 Současný stav řešené problematiky

3.1 Kolorektální karcinom

3.1.1 Obecná charakteristika kolorektálního karcinomu

CRC je heterogenní onemocnění a na základě klinických a molekulárních charakteristik rozlišujeme několik podtypů s typickými molekulárně morfologickými změnami (Nguyen & Duong, 2018). Počátek rozvoje CRC je spojen se vznikem benigních polypů (adenomů) z buněk sliznice tlustého střeva, které procházejí buněčnými změnami vedoucími k formaci karcinomů. Ten postupně prorůstá do okolních tkání, což se projevuje poruchou trávení. Důsledkem je krvácivost nebo střevní neprůchodnost (Rosty et al., 2013). Rozvoj CRC je dlouhodobý proces, proto je vhodný pravidelný kolorektální screening, díky kterému lze odhalit karcinom včas (Nguyen & Duong, 2018).

Mezi ovlivnitelné rizikové faktory patří špatné stravovací návyky a téměř žádná fyzická aktivita. Bylo zjištěno, že povětšinou obézní lidé, kteří mají sedavý způsob zaměstnání a minimální fyzickou aktivitu mají až 70% pravděpodobnost vzniku CRC (Martinez-Useros & Garcia-Foncillas, 2016). Fyzická aktivita zvyšuje rychlost metabolismu, a především motilitu střev, díky které je umožněno efektivní trávení potravy (Robertson, 2012). Dalším rizikovým faktorem při vzniku CRC je kouření a nadměrné pití alkoholu. Bylo například zjištěno, že nikotin se dostává do střev a ve větším množství může přispívat k tvorbě polypů, které se mohou vyvinout v karcinom (Rawla et al., 2019).

Pokud je u pacienta diagnostikován CRC přistupuje se v závislosti na stádiu onemocnění k endoskopickému či chirurgickému odstranění nádoru v kombinaci s chemo – a radioterapií, u vyšších stádií případně k paliativní léčbě (Kala, 2018). Nejběžnější chirurgickou léčbou je laparoskopie což je endoskopická operační metoda dutiny břišní (Keck et al., 2022).

Protinádorová chemoterapie je metoda, která přímo cílí na nádorové buňky (Bukowski et al., 2020). Cytostatika jsou léky, které jsou zacílené na buněčný cyklus buňky a zabraňují jejímu dělení. Cytostatika podávána před operací se nazývají neadjuvantní, jejichž cílem je zmenšení nádoru před dalším léčebným postupem. Naopak chemoterapie podávána po operaci, adjuvantní, má za cíl zničit zbývající nádorové buňky (Barchitta et al., 2019). Adjuvantní nebo neadjuvantní radioterapie je velmi účinná metoda léčby karcinomu (Voegeli & Wicki, 2018). Je zde využíváno ionizujícího záření, které ničí nádorové buňky. Velmi často se radioterapie spojuje s chemoterapií a vytváří tak chemoradioterapii, čímž se zvyšuje účinek léčby karcinomu (Zhang et al., 2019). I když chemo-i radioterapie cílí na nádor, záření většinou zasáhne i okolní

tkáň, čímž se mohou dostavit vedlejší účinky (Liu et al., 2021). U chemoterapie se využívá chemická látka k zahubení nádorových buněk navozením apoptózy. Chemická látka ovšem působí i na nenádorové buňky, které také podstupují apoptózu (Lash & Gilman, 2013).

3.1.2 Klasifikace kolorektálního karcinomu

CRC se dělí na tři základní formy. Mezi častěji se vyskytující řadíme karcinom sporadický, který tvoří 70 % případů (Whiffin et al., 2014) a vzniká z adenomů (polypů) z buněk sliznice tlustého střeva. Nejčastěji se vyskytuje v distálním tračníku u pacientů ve středním věku (Zauber et al., 2012). U této formy nelze prokázat dědičný charakter, ale převládá zde velký podíl exogenních faktorů (Yamagishi et al., 2016). Vyšší výskyt byl prokázán u pacientů s diabetem a pacientů, kteří trpí metabolickými poruchami (Tsang, 2014). Často u tohoto typu dochází k akumulaci mutací v tumor supresorových genech a onkogenech. Příkladem tumor supresorového genu je gen adenomatózní polypózy tlustého střeva (APC, z anglického termínu „Adenomatous Polyposis Coli“). Dalšími doprovodnými mutacemi jsou mutace genů *KRAS* (z anglického termínu „Kirsten Ret Sarcoma Viral Oncogene Homolog“), *TP53* (z anglického termínu „Tumor Protein 53“) a *DCC* (z anglického termínu „Deleted in Colon Cancer“) (Yamagishi et al., 2016).

Naproti tomu rozlišujeme hereditární formu CRC, která se vyskytuje méně často a vzniká na základě dědičné mutace v konkrétním genu či genech. Dědičnost této formy se předává po autozomálně dominantní alele. Znamená to, že je 50% pravděpodobnost předání této alely z rodičů na potomky. U této formy se vyskytují typické genetické syndromy, mezi které se řadí hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (HNPCC z anglického termínu „Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer“) a familiární adenomatózní polypóza (FAP) (Jasperson et al., 2010). Tito pacienti většinou potřebují více specifikovaný léčebný postup naproti pacientům se sporadickou formou CRC (Ma et al., 2018). Pokud není známa genetická příčina mutovaného genu, jedná se o familiární typ CRC, u něhož je postiženo více členů rodiny, kteří mají vrozenou predispozici k výskytu karcinomu (Campos, 2014).

3.1.3 Molekulárně-patologická podstata onemocnění

Rozvoj CRC je vícestupňový proces, který zahrnuje vznik benigních adenomů vlivem genetických či epigenetických změn v onkogenech a tumor supresorových genech, které často vyústí v maligní transformaci buněk a tkáně (Müller et al., 2016). U CRC na základě změn rozlišujeme tři molekulární rysy, konkrétně strukturní změny chromozomů označované jako chromozomální nestabilita (CIN, z anglického termínu „Chromosomal Instability“), mutace v DNA opravných mechanismech vedoucí k tzv. mikrosatelitní nestabilitě (MSI, z anglického

termínu „Microsatellite Instability“) a genovou hypermetylaci spojenou s inhibicí tumor supresorových genů a označovanou jako CpG ostrovní methylátorový fenotyp (CIMP, z anglického termínu „CpG Island Methylator Phenotype“) (Aghagolzadeh & Radpour, 2016).

3.1.3.1 Mutace genů kolorektálního karcinomu

Významnou roli ve sporadických, ale i hereditárních typech CRC hraje gen *APC*. Je důležitý v buněčné proliferaci, migraci, opravě DNA, v apoptóze a řízení buněčného cyklu (Liu et al., 2021), a v kontextu CRC je znám pro vysoký výskyt mutací (Zhao et al., 2017). Následkem mutace *APC* genu může být zkrácení *APC* proteinů a tím ztráty jejich tumor supresivního účinku (Berger et al., 2011). Bylo prokázáno, že vysoké hladiny β -kateninu, produktu genu *CTNNB1* (z anglického termínu „Catenine Beta 1“), souvisí se špatnou prognózou pacientů s CRC (Bruun et al., 2014). β -katenin je protein, který se spojuje s *APC* a tvoří kadherinový komplex, který udržuje adhezi dvou buněk a reguluje genovou transkripci (Pai et al., 2017). Při mutaci dochází k nadměrné expresi β -kateninu, který uniká do jádra a indukuje transkripci genů a proliferaci buňky. β -katenin je stabilizován v cytoplazmě a přesouván do jádra v důsledku dysfunkce degradačního komplexu, který je způsoben nadregulací Wnt signalizační kaskády (Pai et al., 2017).

Gen *KRAS* je nejběžněji mutovaný onkogen CRC kódující G-protein K-Ras. Ten se nachází na vnitřní straně buněčné membrány a je součástí signální dráhy receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR, z anglického termínu „Epidermal Growth Factor Receptor“). EGFR je transmembránový receptorový protein přenášející signály z vnějšku dovnitř buňky (Li et al., 2020).

Je-li inaktivace K-Ras znemožněna v důsledku mutace *KRAS*, dochází k abnormální a kontinuální signalizaci při současné absenci vazby ligandu na EGFR. Důsledkem toho může být nekontrolovatelná proliferace buněk, a tedy růst tumoru (Timar & Kashofer, 2020). Gen *TP53* je důležitý tumor supresorový gen kódující protein p53. Protein p53 je transkripční faktor, který kontroluje přechod z G_1 do S fáze buněčného cyklu skrze monitorování poškození DNA (Li et al., 2019). Pokud je DNA poškozena dochází k uvolnění proteinu p53 ze svého přenašeče MDM2, čímž se stává aktivní a skrze gen *p21* indukuje zastavení buněčného cyklu (Liu et al., 2015). Somatické mutace a výskyt polymorfismů genu *TP53* jsou příčinou vzniku sporadické formy CRC (Naccarati et al., 2012).

DCC je tumor supresorový gen, pro něhož je u CRC typická ztráta heterozygoty. *DCC* kóduje protein s receptorovou funkcí, na který se váže ligand Netrin-1. Svým účinkem dokáže

ovlivnit růst a směr axonů. Axon je dlouhý výběžek nervové buňky, který přenáší informaci mezi neurony a jinými buňkami v lidském těle (Castets et al., 2012). Při snížení koncentrace Netrin-1 dochází k dějům, které mají za následek ztrátu přenosu vnějšího signálu mezi vnitřními buňkami a organelami. Při mutaci *DCC* receptory nejsou schopny navázat Netrin-1, což způsobí inhibici apoptózy a stálou proliferaci buňky, která může vyústit v rozvoj tumoru (Duman-Scheel, 2012).

Tabulka 1: Přehled nejčastěji mutovaných genů u kolorektálního karcinomu a jejich důsledky

Zkratka genu	Název genu	Funkce genu	Aberace	Důsledky
<i>APC</i>	Adenomatous polyposis coli	Tumor supresorový gen, kontrola buněčných procesů	Zkrácení APC proteinů	Ztráta tumor supresivního účinku, stálá proliferace buňky
<i>CTNNB1</i>	Catenine beta 1	Gen kódující protein β -katenin, který udržuje buněčnou regulaci a adhezi	Nadměrná exprese	Nepřetržitá transkripce cílových genů
<i>KRAS</i>	Kirsten rat sarcoma virus	Onkogen, kóduje protein s GTPázovou aktivitou	Intracelulární signalizace prostřednictvím vazby ligandu na EGFR	Nadměrná signalizace, nadměrná proliferace
<i>TP53</i>	P53 tumor protein	Tumor supresorový gen, kóduje protein p53, který reguluje buněčné dělení	Přechod z G ₁ do S fáze buněčného cyklu	Zástava buněčného cyklu
<i>DCC</i>	Deleted in colorectal cancer	Tumor supresorový gen, pomocí ligandu Netrin-1 přenos informace mezi vnějším a vnitřním prostředím buňky	Ztráta vazby Netrin-1	Inhibice apoptózy a stálá proliferace buňky

3.1.3.2 Familiární adenomatózní polypóza

Mezi hereditární formu CRC se řadí onemocnění, za kterými je dědičná predispozice. Familiární adenomatózní polypóza (FAP) je dědičné, autozomálně dominantní onemocnění, u něhož je téměř 100% jistota rozvoje CRC (Biondi et al., 2021). FAP je nejčastěji vyskytující se geneticky podmíněný syndrom, který je spojený se vznikem CRC. Onemocnění je podmíněné genovou mutací a následným zkrácením APC proteinů a tím ztráty kontroly nad proliferací buňky. To vede k formaci stovek až tisíců polypů tlustého střeva, které se začínají objevovat během života (Campos, 2014). U této charakteristické formy CRC lze rozlišit formu atenuovanou (lehčí), pro níž je typický menší výskyt polypů a rozvoj onemocnění v pozdějším věku (Half et al., 2009).

3.1.3.3 Lynchův syndrom

Lynchův syndrom, často také nazýván jako HNPCC, je dědičné autozomálně dominantní onemocnění, které zvyšuje riziko vzniku karcinomů, mezi které se řadí i CRC (Chen et al.,

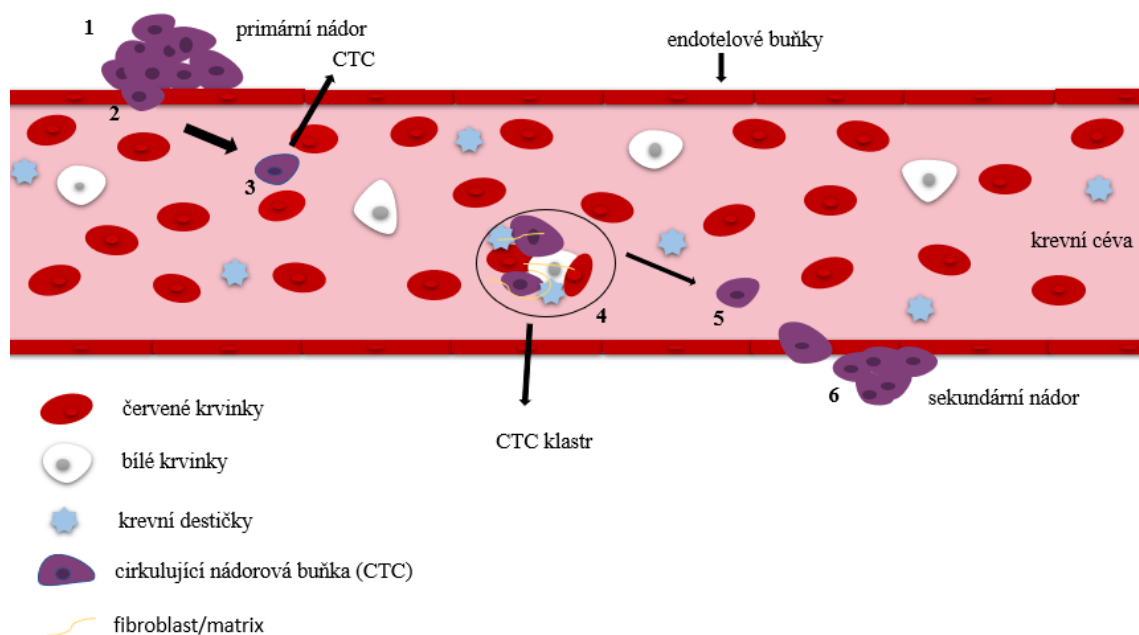
2018). Toto onemocnění je charakterizováno mutacemi v genech kódující proteiny zajišťující opravy chybného párování bází při replikaci DNA (DNA MMR, z anglického termínu „DNA Mismatch Repair“) (Pellat et al., 2019). Za nefunkčnost těchto proteinů jsou odpovědné mutace, díky nimž při dalších replikacích dochází k hromadění chyb v nesprávném párování a ke zvýšení pravděpodobnosti vzniku karcinomu (Kašubová et al., 2019).

Lynchův syndrom je diagnostikován na základě molekulárně patologického vyšetření. Bylo objeveno, že nejčastěji vyskytující se geny se zárodečnými mutacemi jsou *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* a *EpCAM* (z anglického termínu „Epithelial Cell Adhesion Molecule“). Tyto geny jsou mapovány a sekvenovány, proto je možná jejich identifikace, zjištění příslušné funkce a přesné mutace na chromozomu. Mutace jsou detekovány nejčastěji u prvních dvou zmíněných genů (Li et al., 2021).

3.2 Progrese onemocnění a diseminace tumoru

Progrese CRC je značně spojena s šířením nádorového onemocnění a rozvojem vzdálených metastáz (Agarwal et al., 2018). Proces začíná uvolněním nádorových buněk z primárního nádoru a vstupem do krevního řečiště, v němž mohou doputovat do vzdálených tkání a založit zde metastázy (Ju et al., 2022). Ovšem jen několik CTCs doputuje krevním řečištěm do dané tkáně, protože většina je eliminována imunitním systémem, případně podstupuje buněčnou smrt v důsledku změn okolního prostředí. Příkladem může být typ buněčné smrti anoikis, což je typ programované buněčné smrti doprovázející uvolnění z extracelulární matrix (Micalizzi et al., 2017).

Diseminace nádorových buněk z primárního tumoru a založení metastáz je proces, který je složen z několika kroků. Nejprve dochází k lokalizované invazi přes bazální membránu a průnik CTCs do cév, které slouží jako transportní systém (Zavvalova et al., 2019). Může také docházet ke tvorbě klastrů s imunitními a NK buňkami (Szczurba et al., 2019). Tyto klastry putují a zastavují se v kapilárním řečišti orgánů, kde unikají z cévy a migrují do mikroprostředí vybrané tkáně a mohou vytvářet mikrometastázy (Stock, 2022). Schéma progrese nádorového onemocnění je znázorněno na Obr. 1.



Obr. 1 Progrese nádorového onemocnění. Prvním krokem je invaze cévy nádorovými buňkami (1), následuje intravazace (2) a transport CTC v prostředí cévy (3). CTC tvoří klastry s dalšími buňkami cévy, čímž přežívá v krevním řečišti (4). Migrací se CTC dostává do mikroprostředí vybrané tkáně a probíhá extravazace, únik z cévy do okolní tkáně (5), kde tvoří sekundární nádory (6). (Převzato a upraveno podle Ju et al., 2022)

3.2.1 Nádorové mikroprostředí

Bylo zjištěno, že významný vliv na tvorbu nádoru a následných metastáz má nádorové mikroprostředí (TME, z anglického termínu „Tumor Microenvironment“), které je složené z buněčné i nebuněčné složky nádorové tkáně. Řadí se zde fibroblasty, extracelulární matrix a imunitní buňky. Tyto složky zároveň interagují s okolními složkami zdravé tkáně a vzájemně se ovlivňují (Novellasdemunt et al., 2015). Podle závěru studie Chandra *et al.* hraje TME zásadní roli v podpoře růstu, proliferace a vytváření nových metastatických ložisek. TME podporuje přísun kyslíku a živin nádorovým buňkám a zároveň odstranění metabolických produktů (Chandra et al., 2021; Anderson & Simon, 2020). Nádorové buňky mají však vysoké metabolické nároky a nekontrolovanou proliferaci, z tohoto důvodu je TME často chudé na živiny. A proto se buňky ve snaze uniknout nekróze a apoptóze oddělují od masy tumoru a směřují za zdrojem živin (Lyssiotis & Kimmelman, 2017; Roma-Rodrigues et al., 2019). Doprovázejícím krokem je angiogeneze, přísně regulovaný a skupinou angiogenních faktorů, receptorů a ligandů zprostředkovaný proces, při kterém se z endoteliálních buněk tvoří nové krevní cévy, které vyživují nádor a podněcují ho k růstu (Jain, 2005; Mousa et al., 2015).

3.2.2 Nádorové kmenové buňky

Hlavní příčinou neúspěšné léčby pacientů s CRC je rezistence nádorových kmenových buněk (CSCs, z anglického termínu „Cancer Stem Cells“) na chemo – a radioléčbu (He et al., 2014). CSCs jsou částí populace buněk rakovinných. Mají charakteristické vlastnosti jako zvýšená tumorigeneze, sebeobnova a nadměrná proliferace (Zhou et al., 2018). Nejvíce se uplatňují v procesu metastazování a pro svoji chemo i radiorezistenci představují významnou komplikaci v léčbě (Shen, 2012) kvůli možným recidivám onemocnění (Hardin et al., 2017).

CSCs jsou výrazně heterogenní buňky, které se vyznačují velkým množstvím subpopulací a lepšímu přizpůsobení měnícím se podmínkám v závislosti na tumorigenezi (Tang, 2012). Mezi hlavní povrchové markery CSCs se řadí CD44, CD133, CD166, Lgr5, ALDH1 a EpCAM (Manhas et al., 2016). Nicméně CSCs jsou fenotypově a funkčně velmi heterogenní, proto není exprese těchto povrchových markerů příliš prediktivní (Hirata et al., 2019)

3.3 Cirkulující nádorové buňky

Z primárního nádoru se zpravidla uvolňuje relativně velké množství CTCs, ovšem vliv imunitního systému (viz sekce 3.3.3 níže) a oxidačního či fyzikálního stresu v novém prostředí překoná jen zlomek z nich (Alix-Panabières & Pantel, 2014; Xu et al., 2022). CTCs, které přežijí, se šíří do krevního řečiště nebo do lymfatického systému a unikají do okolní tkáně, ve které mohou tvořit prekurzory metastáz, což obvykle značí špatnou prognózu (Lin et al., 2021; Pantel & Speicher, 2016). Mohou existovat jako jednotlivé buňky s odlišným fenotypem či jako shluky, které se vážou na krevní destičky nebo makrofágy (Shao et al., 2016). CTCs jsou obvykle větší než bílé krvinky imunitního systému, lze je tak tedy odlišit při izolaci (Pantel & Speicher, 2016).

3.3.1 Epitelo-mesenchymální tranzice

Významným jevem v procesu uvolnění CTCs z primárního nádoru je EMT (z anglického termínu „Epithelial to Mesenchymal Transition“). Tento termín charakterizuje změnu epiteliálního fenotypu buněk na fenotyp mezenchymální (Alix-Panabières & Pantel, 2014). Během tohoto procesu dochází ke ztrátě mezibuněčné adheze a polarity, změně tvaru buňky, zvýšené schopnosti motility, zvýšené produkce složek extracelulární matrix a zejména pak zvýšení rezistence vůči apoptóze (Xu et al., 2018). Výsledkem je přeuspořádání cytoskeletu, což má za následek transformaci buňky na mezenchymální typ (Huang et al., 2012). Tento proces je důležitý pro uvolnění CTCs z primárního nádoru a putování do krevního řečiště (Wan et al., 2013). Regulace EMT je zajištěna prostřednictvím translačních faktorů, epigenetických

a posttranslačních modulátorů, miRNA a zejména skrze signální dráhy TGF – β , Wnt, Notch (Gonzalez & Medici, 2014).

3.3.1.1 Důsledky epitel-mesenchymální tranzice v léčbě

EMT zvyšuje migrační a invazní kapacitu nádorových buněk, tedy schopnost migrovat do krve (Liu et al., 2015). Výrazné zlepšení v léčbě rakoviny by mohlo přinést zacílení výzkumu na signalizační dráhy v EMT, jelikož hrají důležitou roli v progresi nádoru. Jsou však značně složité a komplexní, z tohoto důvodu je cílená léčba velmi komplikovaná (Cho et al., 2019; Mak et al., 2016). Bylo zjištěno, že EMT dokáže regulovat imunitní odpověď a podporovat tak odolnost vůči protinádorové terapii, čímž znesnadňuje léčbu (Terry et al., 2017). Při úniku do okolní tkáně mohou CTCs podstoupit reverzní proces k EMT, který se nazývá mesench-epiteliární tranzici (MET, z anglického termínu „Mesenchymal to Epithelial Transition“). Při změně fenotypu z EMT na MET nádorové buňky opět obnovují svoji adhezi, čímž je usnadněno usazení buněk v nové tkáni a případný růst epitelálních metastáz (Banyard & Bielenberg, 2015; Hamilton & Rath, 2017).

3.3.2 Markery cirkulujících nádorových buněk

U detekce kolorektálních CTCs se využívají dva typy markerů, epitelální a specifické pro kolorektální tkáň (Hardingham et al., 2015). Nejrozšířenější marker CTCs je EpCAM. Jedná se o povrchový glykoprotein, který je exprimován u epitelálních tumorů (Gires et al., 2020). EpCAM slouží především k regulaci buněčné adheze, proliferaci a migraci. Vysoká exprese EpCAM je důsledkem vyšší proliferace a metastatického růstu, a proto u CRC souvisí se špatnou prognózou (Eslami-S et al., 2020; Marcuello et al., 2019).

Expresa EpCAM je vysoce variabilní, čímž může být ovlivněna detekce CTCs. Nízká exprese EpCAM může souviset s vyšší mírou falešné negativity u detekce CTCs (Wang et al., 2015). Z tohoto důvodu je využíván epitelální povrchový marker CEA (z anglického termínu „Carcinoembryonic Antigen“). CEA je nadměrně exprimován u CRC, čímž umožňuje dokonalejší detekci diseminovaných CTCs (Boogerd et al., 2018). Vyšší hladiny CEA jsou charakteristické u pacientů s progresí rakoviny. Po chirurgickém odstranění nádoru se předpokládá snížení hladiny CEA (Campos-da-Paz et al., 2018).

Cytokeratiny (CK) jsou proteiny tvořící intermediární filamenta, které jsou součástí cytoskeletu epitelálních buněk. U CRC se hojně vyskytují CK 18,19 a 20 (Welinder et al., 2015). Vyšší či nižší exprese CK vzniká na základě narušení nebo nekontrolovatelného růstu cytoskeletu buňky, což je hlavní znak pro nádorové buňky (Pastuszak et al., 2015). CK se

vyskytují jako komplexy několika fragmentů nebo jako volně cirkulující epiteliální fragmenty, které vznikly proteolytickým odštěpením z apoptických nebo nekrotických buněk při progresi maligního nádoru (Kaušitz et al., 2014).

Jiným velmi významným markerem nádorových buněk CRC je Vimentin (VIM). Tento protein je součástí intermediárních filament. Je exprimován v mezenchymálních buňkách a hraje důležitou roli v metastatickém CRC (Satelli & Li, 2011). Bylo prokázáno, že gen kódující VIM je vysoce methylován u CRC. Methylaci lze využít jako diagnostický nástroj a tím následně dopomoci pacientovi k přežití. Podle studie Conga *et al.* byl Vimentin methylován především v pokročilém stádiu CRC (CONG et al., 2016).

Tabulka 2: Vybrané markery cirkulujících nádorových buněk a jejich charakteristika

Zkratka	Název	Charakteristika	Funkce
EpCAM	Epithelial Cell Adhesion Molecule	Glykoprotein na povrchu epiteliálních buněk	Buněčná adheze, proliferace a migrace
CEA	Carcinoembryonic Antigen	Glykoprotein na povrchu epiteliálních buněk během fetálního vývoje	Buněčná adheze
CK	Cytokeratin	Proteiny mezenchymálních buněk v intermediárních filamentech	Stabilizace jádra, udržení buněčné morfologie
VIM	Vimentin	Protein intermediárních filament	Strukturální funkce v cytolazmě

3.3.3 Interakce imunitního systému a cirkulujících nádorových buněk

Je známo, že pouze několik CTCs přežije v krevním řečišti a založí sekundární léze. Příčinou je zejména eliminace CTCs imunitním systémem (Alix-Panabières & Pantel, 2014). Primární obranou imunitního systému proti CTCs jsou NK buňky (z anglického termínu „Natural Killer“), T – lymfocyty a dendritické buňky, které rozpoznají CTCs na základě povrchových antigenů (Leone et al., 2018). Pokud CTCs změni svůj fenotyp, tak při průniku do periferní krve je eliminována interakce s extracelulárním matrix a buňkami stromatu. Tímto způsobem „ztrácí“ imunitní systém kontrolu nad CTCs a ty mu tak unikají (Kitamura et al., 2015; Mittal et al., 2014).

Změna fenotypu CTCs je závislá na modifikacích molekul, díky kterým je umožněno překonání imunitního systému a metastazování (Mohme et al., 2017). Mohou nastat modifikace

buňky v molekulách hlavního histokompatibilního komplexu glykoproteinu 1. třídy (MHCI, z anglického termínu „Major Histocompatibility Complex Class I“), což je transmembránová molekula, která zprostředkovává vazbu antigenu CD8⁺ cytotoxickým T-lymfocytům (Watson et al., 2006). Dalšími mechanismy úniku CTCs před imunitní systémem jsou modifikace mimo MHCI molekuly, například ztráta exprese apoptických molekul FAS či FASL, které následně indukují apoptózu T-buněk (Merting et al., 2022). Třetím mechanismem je zvýšená exprese povrchových markerů CTCs, mezi které se řadí například EpCAM, díky kterým je znemožněna inhibice CTCs imunitním systémem (Parcesepe et al., 2016).

3.3.4 Metody detekce cirkulujících nádorových buněk

V posledních letech došlo k výrazné inovaci na poli diagnostických neinvazivních metod odhalující karcinom a metastáze (Pantel & Speicher, 2016). Detekce CTCs byla v poslední dekádě předmětem zájmu výzkumu v oblasti tekuté biopsie. Přítomnost CTCs byla popsána u více druhů karcinomů, včetně CRC (Lei Xu et al., 2015). Analýzou CTCs lze odhalit časná stadia nádorových onemocnění, recidivu rakoviny nebo účinnost léčby (Jiang et al., 2021). Zásadním problémem v zachytu CTCs je jejich malé množství v krvi, velmi krátká životnost, různorodost, proměnlivost v čase a fenotypová plasticita způsobená zejména EMT (Riggi et al., 2018; Wang et al., 2018). Z provedených studií bylo zjištěno, že existuje předpoklad pro stanovení metastáz na základě počtu CTCs v periferní krvi. Limitní hodnota byla stanovena na 3 a více CTCs v 7 ml periferní krve. Z důvodu absence standardizace metod detekce CTCs je zapotřebí více studií na větších kohortách, aby byla limitní hodnota potvrzena (Cohen et al., 2009).

V posledních letech bylo vyvinuto mnoho technik na detekci CTCs, z nichž každá využívá jejich charakteristických vlastností. Snahou všech technik detekce je dosažení vysoké senzitivity, specifity a nízké invazivity, což je stále velká výzva (Habli et al., 2020).

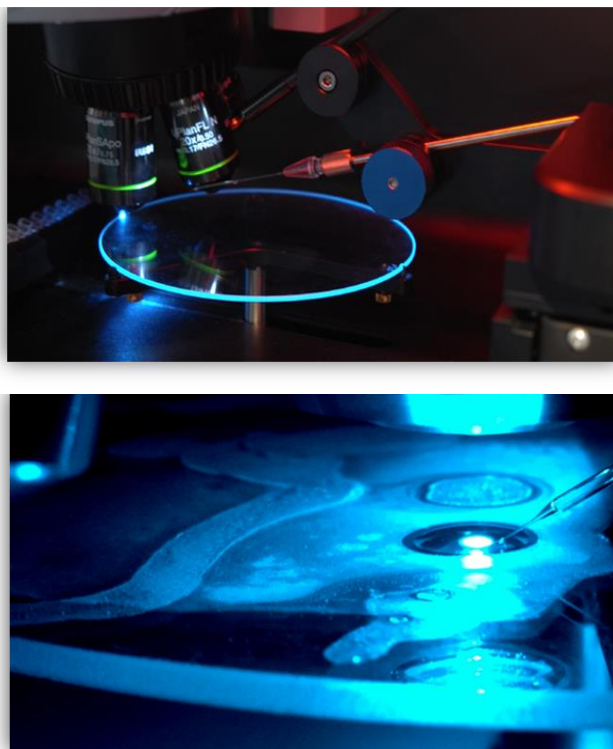
Nejrozšířenější metodou je detekce CTCs na základě vazby značené protilátky s povrchovým antigenem nádorové buňky (Patriarca et al., 2012). Jedna z metod, které využívají afinitu antigenu k příslušné protilátce se nazývá CellSearch[®] (Veridex LLC, Raritan, NJ). Tato metoda byla dosud jako jediná schválena Americkým úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA, z anglického termínu „Food and Drug Administration“). Tato metoda se hojně využívá nejen u CRC (Wang et al., 2016). Principem technologie je značení ferrofluidními nanočásticemi asociovanými s protilátkami proti EpCAM, pozitivního markeru, a použití negativního selekčního markeru CD45 (Swennenhuis et al., 2016). Tato metoda spočívá pouze

na expresi EpCAM a nezaměřuje se na další potenciální markery (Gabriel et al., 2016). Tento problém řeší otevřený systém CytoTrack CT11TM (2C A/S, Lyngby, Dánsko), který může díky použití vlastní kombinace značících protilátek brát v potaz i další markery (Hillig et al., 2014). Principem této metody je značení CTCs protilátkami konjugovanými s fluorofory umožňující identifikaci daných buněk pomocí fluorescence. Vzorek je nanesen a skenován na speciálním disku (CytoDiscTM) (Gerges et al., 2010). Následně jsou vyselektovány jednotlivá místa na disku, které jsou následně manuálně analyzována pomocí optických filtrů (Ferreira et al., 2016). Z výsledků studie, která srovnávala metodu CellSearch[®] a CytoTrack CT11TM vyplývá, že tyto dvě metody detekce CTCs jsou srovnatelné (Hillig et al., 2015).

Jinou technikou, kterou je možné provádět detekci CTCs jsou mikrofluidní čipy. Jedná se o velké plochy pokryté protilátkami, které dokážou zachytit CTCs (Dan & Daxiang, 2018). CTCs se zachytí na čipu a ostatní buňky jsou vymyty. Je zde využívána EpCAM protilátka na povrchu mikrokanálku, tak aby se zajistila detekce CTCs (Hong & Zu, 2013). CellCollector[®] (GILUPI GmbH, Německo) je celosvětově první izolační *in vivo* metoda CTCs, která má ovšem komplikovaný krok obohacení a s tím spojenou dlouhou dobu detekce (Neumann et al., 2017). Přímá detekce s vysokou senzitivitou je umožněna pomocí SERS systému. Pomocí vysoce senzitivních a citlivých nanočástic s cílícím ligandem jsou schopny rozpoznat CTCs v periferní krvi (Wang et al., 2011). Další techniky jsou založené na fyzikálních vlastnostech CTCs jako je velikost, denzita nebo snížená deformovatelnost (Bankó et al., 2019).



Obr. 2: Přístroj pro detekci CTCs CytoTrack CT11TM. Zdroj: <https://www.2c.dk/>



Obr. 3: Skenovací aparatura s vloženým CytoDiscem™ (výše) a detail mikromanipulace s nástrojem CytoPicker™ (níže). Zdroj: Propagační materiály 2C A/S.

3.3.5 Význam detekce cirkulujících nádorových buněk

Vzhledem k vysoké mortalitě a morbiditě pacientů s CRC se snaží vědci a lékaři nalézt metodu pro včasnou detekci metastáz, čímž by se mohla usnadnit včasná léčba. Detekce CTCs se ukazuje jako prediktivní metoda pro včasnou diagnostiku progresu onemocnění, formulaci prognózy a zvýšení míry přežití pacientů (Yadav et al., 2021).

V současné době se u CRC nejvíce používá histopatologická biopsie, která je však velmi invazivní a limitována pro svoji lokálnost. Tato metoda není schopna zachytit heterogenitu tumoru (Jiang et al., 2021). Tekutá biopsie je souhrnný název pro metody, které se vyznačují analýzou biomarkerů jako CTCs, cirkulující DNA, miRNA a extracelulárních vezikul. Tekutá biopsie nám dokáže dát informace o heterogenitě nádoru v reálném čase (Alix-Panabières & Pantel, 2013).

Molekulární a fenotypové vlastnosti CTCs mohou odhalit mechanismus patogeneze a genové změny, což může zvýšit účinnost léčby (Delgado-Ureña et al., 2018). Detekce CTCs má však stále svá úskalí, o jejichž překonání se snaží mnohé výzkumy. Mezi ta základní patří absence standardizace, jelikož se stále využívá mnoho různorodých metod detekce (Page et al., 2019). Technologie detekce CTCs založené na mezenchymálních markerech mohou vykazovat falešnou pozitivitu. Příčinou je možná kontaminace CTCs fibroblasty asociované s nádorem

nebo endoteliálními shluky (Lozar et al., 2020). Technologie založené na fyzikálních vlastnostech obsahují také značné riziko kontaminací CTCs buňkami, které mají stejné či podobné fyzikální vlastnosti (Lin et al., 2021). Stále je tedy potřeba mnoho klinických studií a experimentů, které by odstranily tyto výzvy. Ale i přesto je detekce CTCs velmi významný prognostický ukazatel rozvoje CRC a s průběžně získávanými poznatky jde o perspektivní diagnostiku karcinomu (Habli et al., 2020).

4 Experimentální část

Chemikálie:

Chlorid sodný (Mikrochem, Slovensko)

Chlorid draselný (Lach-Ner, Česká republika)

Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného (Lach-Ner, Česká republika)

Dihydrogenfosforečnan draselný (VWR Chemicals, Pennsylvania, USA)

Glycerol pro fluorescenční mikroskopii (Merck Life Science, Darmstadt, Germany)

1M Trizma® hydrochloride solution, pH 7,4 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

FixoGum® (Marabu, Tamm, Německo)

Lyzační roztok BD FACSTM Lysing Solution 10x Concentrate (BD Biosciences, USA)

Přístrojové vybavení:

Laminární box Scanlaf Mars Safety Classe 2 (LaboGene, Bjareksvej, Dánsko)

Centrifuga Eppendorf (Eppendorf, Hamburg, Německo)

Laboratorní váha Sartorius ED423-CW (Sartorius, Goettingen, Německo)

Kombinovaná chladnička (Liebherr, Bulle, Švýcarsko)

Mrazicí box -80 °C (New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA)

CytoTrack CT11™ (2C A/S, Copenhagen, Dánsko)

Yokogawa Cell Voyager cv7000 (Tokio, Japonsko)

Příslušenství a pomůcky:

15 ml falkony (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

2,0 ml zkumavky (Eppendorf, Hamburg, Německo)

Cell-Free DNA BCT® (Streck, Inc., USA)

Cytotrack Reagent Kit (CytoTrack Aps, Dánsko)

CytoCover™ (CytoTrack Aps, Dánsko)

CytoDics™ (CytoTrack Aps, Dánsko)

epDualfilter T.I.P.S. (Eppendorf, Hamburg, Německo)

Pipety (Eppendorf, Německo)

Software:

CytoTrack CT11™ software (2C A/S, Lyngby, Dánsko)

4.1 Materiál a metody

4.1.1 Detekce cirkulujících nádorových buněk systémem CytoTrack CT11™

4.1.1.1 Zpracování krevního vzorku

Prvním krokem byla izolace buffy coatu, bílé vrstvy mezi plazmou a erytrocyty, která je bohatá na leukocyty a trombocyty. Krev ze zkumavky Cell-Free DNA BCT® (Streck Inc., USA) byla přelita do 15ml zkumavky (falkony). Dalším krokem pro získání buffy coatu byla centrifugace krevního vzorku při pokojové teplotě po dobu 15 minut při 2500 x g. Následovala izolace plazmy do 2 ml zkumavek (4 ml) tak, aby zůstalo 0,5 ml nad buffy coatem. Plazma byla dále uchována v mrazáku pro další využití. Buffy coat (asi 2 ml) byl krouživým pohybem špičky pipety izolován a přenesen do nové 15 ml falkony.

Po izolaci buffy coatu následovala lýze erytrocytů. K buffy coatu byl přidán 1x FACS lyzační roztok tak, aby výsledný objem činil 10 ml. Vzorek byl inkubován po dobu 15 minut na výkyvné kývačce při pokojové teplotě. Následovala centrifugace po dobu 15 minut při 4000 x g a opatrné odlití supernatantu do odpadu.

Dalším krokem bylo barvení CTCs pomocí CTC Stain barvicí směsi, která obsahovala protilátky proti pan-cytokeratin, EpCAM, CD45 a DAPI. Barvicí směs byla centrifugována při pokojové teplotě po dobu 15 minut při 2500 x g. Ke vzorku se supernatantem bylo přidáno 100 µl CTC Stain barvicí směsi a výsledný roztok byl několikrát propipetován, tak aby byla buněčná peleta resuspendována.

Vzorek byl inkubován na ledu ve tmě při 2-8 °C po dobu 60 minut. Následovalo promývání vzorku v 10 ml 1% BSA ředěného 1x PBS (vychlazený na 2 až 8 °C). Vzorek byl opakovaným převrácením ve falkoně promíchán a inkubován 5 minut ve tmě při 2-8 °C. Po inkubaci následovala centrifugace při 8 °C po dobu 15 minut při 4000 x g. Supernatant byl odlit a byly přidány 3 ml 0,5 % BSA ředěného 1x PBS a pipetou byla resuspendována buněčná peleta. Ke vzorku byl přidán 0,5% BSA ředěného 1x PBS tak, aby výsledný objem ve falkoně činil 10 ml. Vzorek byl centrifugován po dobu 15 minut při 8 °C a 4000 x g. Supernatant byl odstraněn opatrným slitím a odsátím pipetou. Peleta byla resuspendována v 1 ml MiliQ vodě.

4.1.1.2 Aplikace vzorku na CytoDisc™

Celý objem vzorku byl pipetou nanesen na CytoDisc™ a pomocí špičky rozetřen od středu po celém disku, tak aby zůstal 1 cm od okraje prázdný. CytoDisc™ byl inkubován v laminárním boxu ve tmě při pokojové teplotě po dobu minimálně dvou hodin. Po vysušení disku bylo do středu přidáno 370 µl Mounting media a CytoDisc™ byl překryt krycím sklem CytoCover™.

Sklo bylo mírně přitlačeno pro vytlačení případných bublin. Okraje disku byly očištěny a zalepeny lepidlem FixoGum a ponechány v laminárním boxu při pokojové teplotě po dobu 45 minut. Po inkubaci byl zalepený disk skladován ve tmě v lednici při 2 až 8 °C mezi papírovými ubrousky.

4.1.1.3 Skenování vzorku za použití CytoTrack™ software

Disk byl vytažen z lednice a řádně očištěn 70% ethanolem, aby nebyly znečištěny objektivy případnými nečistotami uvolňujícími se během rotace disku. Víko přístroje bylo otevřeno a disk byl vložen krycím sklem vzhůru, zároveň byl zvolen vhodný objektiv s parfokální délkou 20x/0,75. Víko přístroje bylo zavřeno.

V CytoTrack™ software bylo v nabídce „Navigate sample“ zvoleno tlačítko „Load disc“ a ve vyskakovacím okně zadán název vzorku. Byla zapnuta kamera, laser a zvolen filtr pro DAPI. Následovalo zaostření vybraných pozic fokusací vzorku jako celku a jejich uložení do tabulky. Při zaostřování bylo pozorováno množství buněk a intenzity fluorescence přepnutím na filtr FITC.

Následovalo otevření víka přístroje a změna objektivu na skenovací objektiv 20x/0,50, vypnutí kamery a laseru, zavření víka. Dalším krokem bylo ověření následujících hodnot v sekci Scanning area. Radius start: 1 mm Radius stop: 56 mm. V horní liště bylo zvoleno tlačítko „Scan sample“, dále se zvolila intenzita laseru podle kvality a intenzity fluorescence. Následně byly zvoleny příslušné parametry: Velocity: 160, Track width: 50, Sampling: 1, PMT gain: 0,8 a v poslední řadě tlačítko „Start scan“, čímž bylo zahájeno skenování vzorku. Po ukončení skenování, které trvalo 10 minut následovalo nahrání hotspotů, které objektiv zachytil.

4.1.1.4 Vyhodnocení výsledku programem CytoTrack CT11™ software

Po samotném skenování následovalo předělání objektivu 20x/0,75 a vypnutí kamery, laseru a zavření. Postupně byly manuálně vyhodnoceny všechny hotspoty, které byly v průběhu zaostřování s využitím všech optických filtrů dle potřeby. Při vyloučení výskytu CTCs byl hotspot klasifikován číslem 0. Pokud byl pozorován signál buňky, číslo hotspotu se změnilo na 1. Následovalo vygenerování všech suspektních signálů s číslem 1, které byly dále vyloučeny, či potvrzeny jako přítomnost CTCs, a tedy označen číslem 2 a následně byl vyfocen pro archivaci.

Přítomnost CTCs byla hodnocena na základě přítomnosti povrchových markerů. Signály by měly být zřetelně odlišitelné od pozadí. Pokud vzorek obsahoval suspektní či špatně

hodnotitelný signál, tak bylo přihlíženo k celkovému stavu vzorku. Pokud se jednalo o lytický vzorek, byla větší pravděpodobnost výskytu drobných buněčných artefaktů fluorescenčně odpovídající CTCs. Po vyhodnocení signálu následovalo uložení tabulky tlačítkem „Save table“ do příslušné složky a archivaci. Software byl po dokončení práce uzavřen, počítač vypnut a vydány výsledky.

4.1.2 Validace metody detekce cirkulujících nádorových buněk systémem CytoTrack CT11™

4.1.2.1 Stanovení stability krevních vzorků

Z důvodu transportu krevních vzorků k analýze ze vzdálených pracovišť byla provedena analýza stability CTCs. Za tímto účelem byly odebrány vzorky 10 ml krve (v duplikátech) dvou zdravých dárců (AD1 a AD2) ve 4 zkumavkách Cell-Free DNA BCT®. Následně byly ve spolupráci s Laboratoří buněčné biologie (ÚMTM) zkumavky s krví spikovány 100 buňkami nádorové linie SW480 odvozené od kolorektálního adenokarcinomu sortovaných metodou průtokové cytometrie (BD FACS Aria™) a ponechány při pokojové teplotě 1, 3, 7 a 14 dnů. Vzorky byly v daných intervalech zpracovány dle bodu 4.1.1.1 výše a analyzovány metodou přímé imunofluorescence na přístroji CytoTrack CT11™. Dále byl vypočítán poměr získaných buněk (tzv. návratnost, %) za pomoci stanovení integrity buněk po sortingu (viz dále).

Při spikování vzorků průtokovou cytometrií mohlo dojít k degradaci části buněk a zatížení analýzy jejich stability. Proto byla provedena analýza integrity buněk nádorové linie SW480 během sortování. Ze zmíněných buněk nádorové linie SW480 byla sortována koncentrační řada 10, 30, 50 a 100 buněk vždy v triplicátech do 96jamkového panelu obsahující PBS. Tato připravená koncentrační řada buněk byla naskenována pomocí konfokální mikroskopie na přístroji Yokogawa Cell Voyager cv7000. Byly porovnány průměrné počty sortovaných a pozorovaných intaktních buněk pro následnou kalkulaci návratnosti.

4.1.2.2 Stanovení senzitivity metody přímé imunofluorescence

Po stanovení stability a integrity buněk při sortování byla dále stanovována citlivost metody přímé imunofluorescence. Pro stanovení byly vzorky krve dvou zdravých dárců (označené jako AD1 a AD2) odebrány do 3 zkumavek Cell-Free DNA BCT® spikovány 10, 30 a 50 buňkami nádorové linie SW480 a ponechány při pokojové teplotě 24 hod. Vzorky byly následně zpracovány podle bodu 3.2.1 výše a vyšetřeny metodou přímé imunofluorescence na CytoTrack CT11™. Nakonec byla vypočítána návratnost za pomoci stanovení integrity buněk při sortingu.

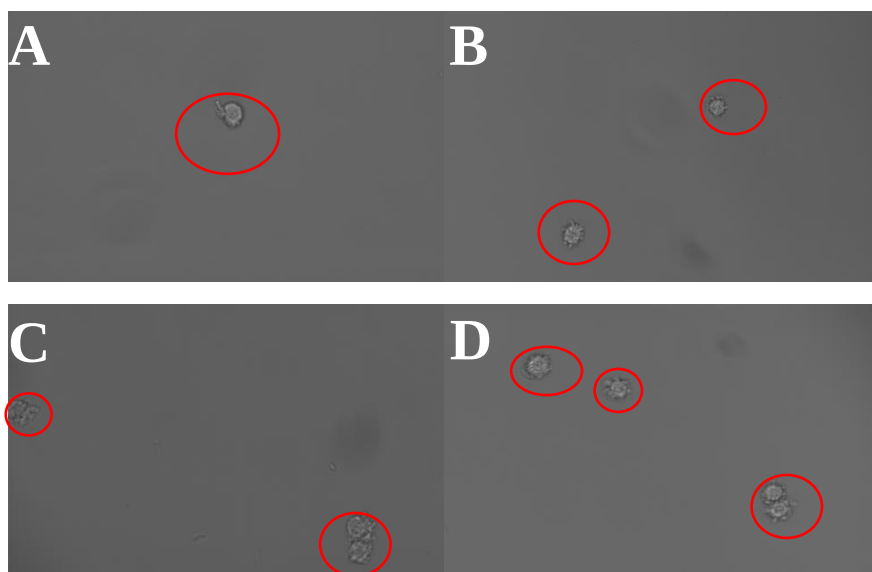
4.1.3 Analýza krevních vzorků pacientů s kolorektálním karcinomem systémem CytoTrack CT11™

S využitím postupu popsaného v sekci 4.1.1 a v návaznosti na validaci metody popsané v sekci 4.1.2 byly pilotně analyzovány krevní vzorky pacientů s CRC podstupující radikální či laparoskopický chirurgický výkon. Krevní vzorky byly odebírány s informovaným souhlasem pacientů do zkumavek Cell-Free DNA BCT® v rámci studie zabývající se vlivem opioidní analgesie na výskyt CTCs. Pacienti byli hospitalizováni v Krajské nemocnici Tomáše Bati ve Zlíně, Fakultní nemocnici v Ostravě a Vojenské nemocnici v Praze. Vzorky byly anonymizovány. Krevní vzorky odebírané před zákrokem byly označeny SK1, jeden den po zákroku SK2 a 30 dní po zákroku byly označeny SK3. U pacientů byla využívána rozdílná analgesie (epidurální, piritramidová a morfinová). Byly sledovány počty detekovaných buněk a výskyt s ohledem na jednotlivé časové intervaly. Sledování vlivu morfinové analgesie na výskyt CTCs nebylo předmětem této bakalářské práce.

5 Výsledky

5.1 Stanovení stability krevních vzorků

Analýza integrity buněk nádorové linie SW480 během sortování ukázala, že průměrný počet intaktních buněk nádorové linie SW480 detekovaných konfokálním mikroskopem (Obrázek 4) byl 55 % ze všech testovaných koncentrací (Tabulka 3). Průměrné počty pozorovaných buněk, resp. jejich procentuální část z původního počtu sortovaných buněk (faktor integrity po sortování pro jednotlivé koncentrace buněk) byly dále použity v kalkulaci návratnosti.



Obr. 4 Snímky z konfokálního mikroskopu Yokogawa Cell Voyager cv7000. Ukázka pozorování buněk nádorové linie SW480 pro účely analýzy míry degradace během sortování z koncentrační řady 10 (A), 30 (B), 50 (C) a 100 (D) buněk. Zvětšení 40x.

Tabulka 3: Stanovení integrity buněk po sortování průtokovou cytometrií pomocí konfokální mikroskopie na přístroji Yokogawa Cell Voyager cv7000.

Počet sortovaných buněk	Počet pozorovaných buněk			Průměrný počet pozorovaných buněk	Směrodatná odchylka	Návratnost (%)	Průměr souhrnně (%)
	Opakování						
	A	B	C				
10	3	5	5	4,3	0,9	43,3	55
30	22	20	15	19	2,9	63,3	
50	31	25	29	28,3	2,5	56,7	
100	63	53	54	56,7	4,5	56,7	

Následně byla hodnocena stabilita buněk linie Cell-Free DNA BCT[®]. Stanovení stability krevních vzorků, ve kterých byly obsaženy CTCs, prokázalo vhodnost jejich použití k analýze po dobu 7 dnů při pokojové teplotě (Tabulka 4). Po této době již návratnost klesala pod 50 %.

Tabulka 4: Stanovení stability krevních vzorků obsahujících cirkulující nádorové buňky ve zkumavkách Cell-Free DNA BCT[®] metodou přímé imunofluorescence na přístroji CytoTrack CT11[™] se započtením faktoru integrity.

	Počet detekovaných buněk (sortováno vždy 100 buněk)		Návratnost (%)	
	AD1	AD2	AD1	AD2
Den 1	47	53	82,9	93,5
Den 3	36	31	63,5	54,7
Den 7	26	34	45,9	60,0
Den 14	5	9	8,8	15,9

AD1 (anonymizovaný vzorek dárce 1); AD2 (anonymizovaný vzorek dárce 2)

5.2 Stanovení senzitivity metody přímé imunofluorescence

Při stanovení senzitivity metody přímé detekce pomocí CytoTrack CT11[™] bylo zjištěno, že metoda umožňuje spolehlivě detekovat 10 a méně nádorových buněk ve vzorku 10 ml periferní krve (Tabulka 5). Po započtení faktoru integrity sortovaných buněk pro jednotlivé koncentrace těchto buněk (43,3 % pro 10 buněk, 63,3 % pro 30 buněk a 56,7 % pro 50 buněk) byla v závislosti na koncentraci nádorových buněk ve vzorku návratnost přes 70 %.

Tabulka 5: Stanovení senzitivity a návratnosti metody přímé imunofluorescence na přístroji CytoTrack CT11[™] krevních vzorků pacientů obsahujících cirkulující nádorové buňky ve zkumavkách Cell-Free DNA BCT[®] (Streck Inc., USA).

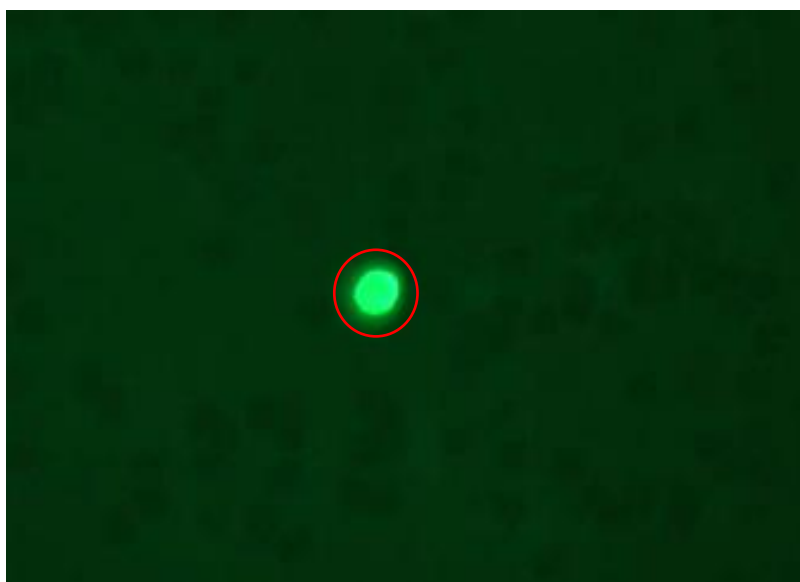
Počet sortovaných buněk	Počet pozorovaných buněk		Návratnost (%)		Průměr (%)
	AD1	AD2	AD1	AD2	
10 buněk	3	4	69,8	93,0	81,4
30 buněk	15	12	78,9	63,2	71,1
50 buněk	23	25	81,3	88,3	84,8

AD1 (anonymizovaný vzorek dárce 1); AD2 (anonymizovaný vzorek dárce 2)

5.3 Analýza krevních vzorků pacientů s kolorektálním karcinomem systémem CytoTrack CT11[™]

Na základě předchozí validace byla metoda přímé detekce CTCs pomocí platformy CytoTrack CT11[™] zavedena pro analýzu krevních vzorků od pacientů s CRC v rámci studie vlivu opiátové analgesie na výskyt CTCs s předpokladem širšího uplatnění v dalších studiích. Bylo analyzováno 42 vzorků (15 vzorků předoperačních, 15 vzorků z 1. pooperačního dne a 12 kontrolních vzorků cca 30 dnů od operace) od 15 pacientů, s celkovou pozitivitou na CTCs 33 %. Nejvyšší pozitivita (41,9 %) byla pozorována u vzorků odebraných 1. pooperační den.

Na obr. 5–8 je uveden příklad detekce CTC na pozadí leukocytů u pacienta s CRC zachyceném na snímcích z platformy CytoTrack CT11™. Krevní vzorek pacienta byl vyhodnocen jako pozitivní, o čemž svědčí jasný fluorescenční signál pro pan-cytokeratin (obr. 5), který překrývá jedno velké jádro při značení DAPI (obr. 6). Tato CTC má pravidelný tvar, je intaktní, vykazuje relativně nižší intenzitu positivity na povrchový marker EpCAM (obr. 7). Absence signálu pro negativní selekční marker CD45 potvrzuje předpoklad výskytu nádorové buňky (obr. 8, pro přehlednost není dále tento kanál uváděn). Ze snímků je také patrné, že okolí CTC neobsahuje zásadnější nečistoty a jednotlivé krevní elementy jsou rovnoměrně naneseny na povrchu skla. Jedná se tedy o kvalitní mikroskopický preparát. Pro zjednodušení jsou dále CTC zobrazeny s menší okolní plochou preparátu.



Obr. 5 Snímek z platformy CytoTrack CT11™. Červené kolečko označuje detekovanou CTC v krevním vzorku pacienta. Značeno anti-pan cytokeratin protilátkou. Zvětšení 20x.



Obr. 6 Snímek z platformy CytoTrack CT11TM. Červené kolečko označuje jádro detekované CTC v krevním vzorku pacienta. Značeno DAPI. Zvětšení 20x.

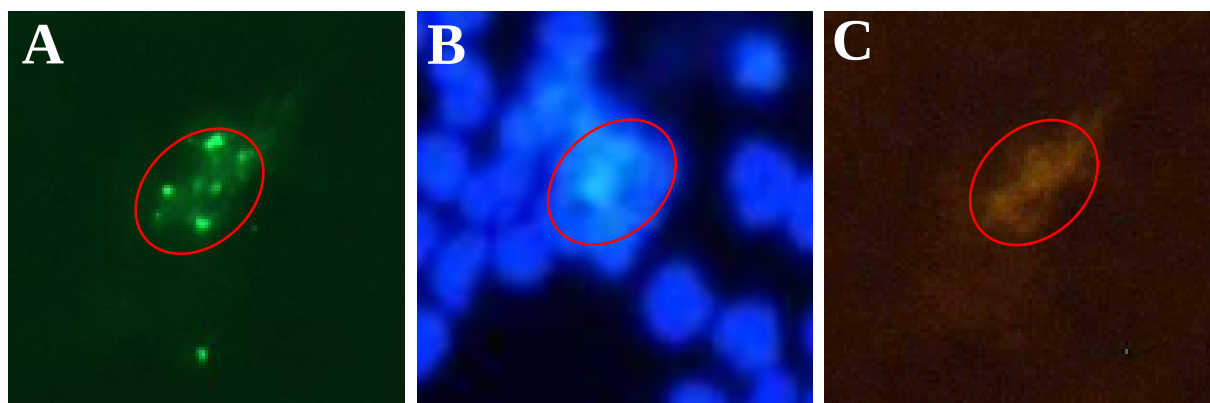


Obr. 7 Snímek z platformy CytoTrack CT11TM. Červené kolečko označuje fluorescenční signál pro detekovanou CTC v krevním vzorku pacienta. Značeno anti-EpCAM protilátkou. Zvětšení 20x.



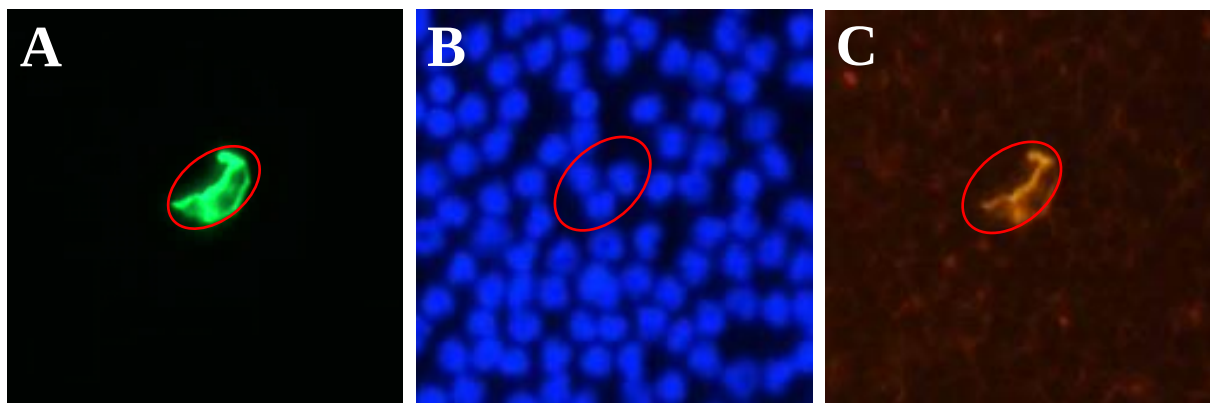
Obr. 8. Snímek z platformy CytoTrack CT11TM. Absence fluorescenčního signálu pro negativní selekční marker CD45 u detekované nádorové buňky v krevním vzorku pacienta. Na snímku lze pozorovat signály leukocytů. Značeno anti-CD45 protilátkou. Zvětšení 20x.

V krevním vzorku dalšího pacienta byla detekována CTC, která je viditelně lyzovaná (obr. 9). Na snímcích A-C lze pozorovat neucelený fluorescenční signál, který však stále odpovídá přítomnosti CTC. Tento jev mnohdy souvisel s opožděným zpracováním vzorku v důsledku jeho delšího transportu do laboratoře.



Obr. 9 Snímek z platformy CytoTrack CT11TM. Červené kolečko označuje detekovanou zlyzovanou CTC v krevním vzorku pacienta. Značeno anti pan-cytokeratin protilátkou (A), DAPI (B) a anti EpCAM protilátkou (C). Zvětšení 20x.

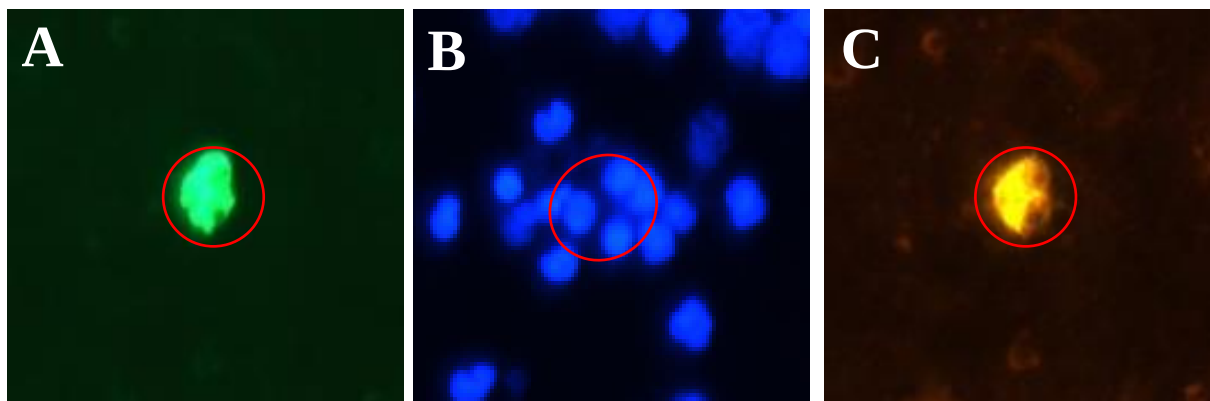
V krevním vzorku dalšího pacienta byl detekován klastr složený ze 3 CTCs, je intaktní a vyznačuje se vysokou EpCAM pozitivitou (obr. 10).



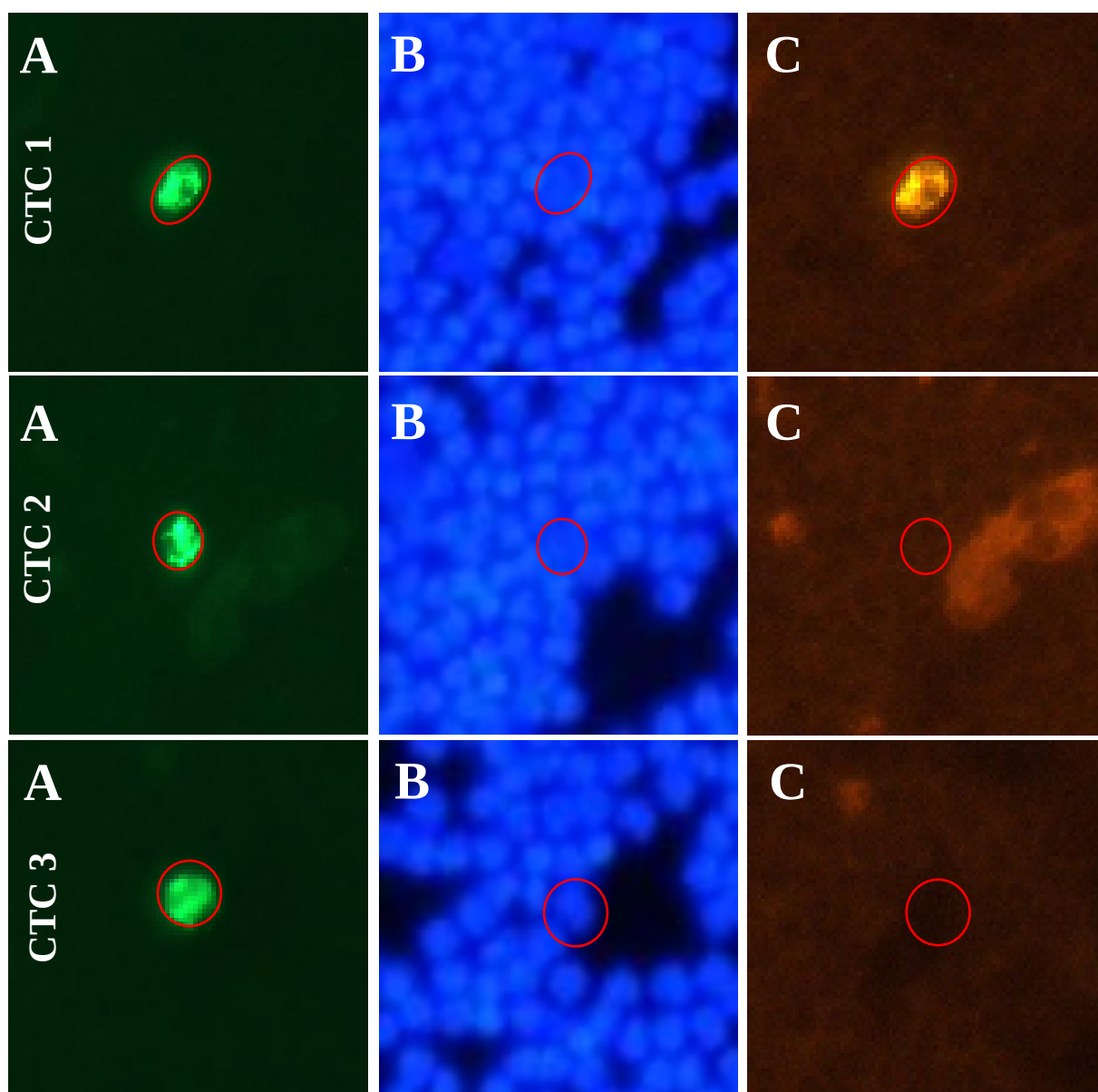
Obr. 10 Snímek z platformy CytoTrack CT11TM. Červené kolečko označuje detekovaný klastř tří CTCs v krevním vzorku pacienta. Značeno anti pan-cytokeratin protilátkou (A), DAPI (B) a anti-EpCAM protilátkou (C).
Zvětšení 20x.

V krevním vzorku jiného pacienta bylo detekováno celkem 46 CTCs. Na obr. 11 je jedna z detekovaných CTC. CTCs mají nepravidelný tvar, jsou intaktní a mají relativně vysokou EpCAM pozitivitu, což lze pozorovat na snímku C. Kromě samostatných CTCs byly detekovány také klastry.

U krevního vzorku následujícího pacienta byl pozorován jev proměnlivosti EpCAM. Některé CTCs byly zřetelně EpCAM pozitivní (viz obr. 12 C CTC1, a některé EpCAM negativní (viz obr. 12 C CTC2). Mimo to byl opět pozorován klastř dvou CTCs (viz obr. 12 CTC3).



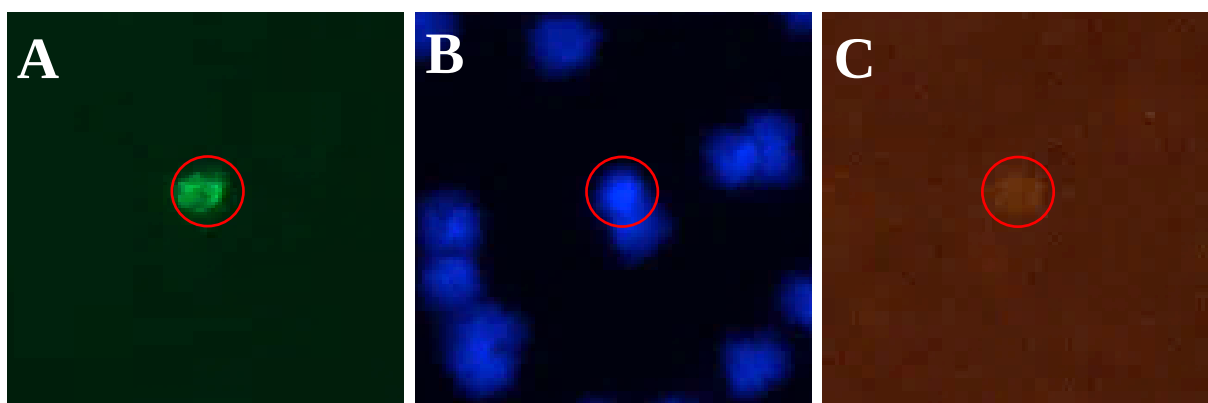
Obr.11 Snímky z přístroje CytoTrack CT11TM. Červené kolečko označuje jednu z 46 detekovaných CTC v krevním vzorku pacienta. Detekovaný fluorescenční signál buňky značené protilátkou anti pan-cytokeratin (A), vyznačené jádro detekované buňky pomocí DAPI (B), silný signál nádorové buňky značený anti-EpCAM protilátkou (C). Zvětšení 20x.



Obr. 12 Snímky z platformy CytoTrack CT11™. Červená kolečka označují detekované CTCs v krevním vzorku pacienta. Snímek A CTC1 znázorňuje detekovanou CTC, která je EpCAM pozitivní a snímek C CTC2 CTC, která je EpCAM negativní. Na snímcích CTC3 jsou znázorněny dvě buňky, které tvoří klastr (zvýrazněno červeným kroužkem), zároveň je tato buňka EpCAM negativní, protože není pozorován žádný signál (snímek C CTC3)).

Zvětšení 20x.

Další krevní vzorek pacienta vykazoval obecně nižší míru fluorescence a oproti krevním vzorkům pacientů výše byla také pozorována ztráta integrity jader, a tedy degradace biologického materiálu (snímek B na obr. 13).



Obr. 13 Snímky z platformy CytoTrack CT11™. Krevní vzorky pacienta, které byly skladovány delší dobu. Lze pozorovat rozpadlé buňky na snímku buněk značených DAPI (B). Je také zřetelná menší intenzita fluorescence na snímku C značeného anti-EpCAM protilátkou (C). Zvětšení 20x.

6 Diskuze

Vzorky krve jsou transportovány z odběrových pracovišť do míst vybavených pro vyšetření CTCs, což je spojeno s časovou prodlevou před zpracováním. Z tohoto důvodu použití klasických odběrových zkumavek není dostatečné, protože by došlo k degradaci vzorku (Adcock Funk et al., 2012). Výrobce udává, že odběrové zkumavky Cell Free DNA BCT[®], které obsahují blíže nespecifikované stabilizační činidlo bez formaldehydu, stabilizují buněčnou složku krevního vzorku až po dobu 14 dnů (Norton et al., 2013). Z našich výsledků ovšem vyplývá, že zkumavky Cell Free DNA BCT[®] stabilizují buněčnou složku v krevních vzorcích po dobu 7 dnů. Snížená schopnost detekovat CTCs ve starších vzorcích mohla kromě postupné degradace jaderných buněk však souviset i s metodou detekce. Při celkovém poklesu kvality vzorku (nutně ne v důsledku degradace jaderných buněk), může docházet k nárůstu pozadí komplikující fluorescenční analýzu při skenování vzorku.

Jedna z největších výzev pro detekci CTCs je jejich velmi nízký počet, proto je potřeba použití dostatečně citlivé technologie (Habli et al., 2020). Ze stanovené senzitivity přístroje CytoTrack CT11[™], která činila 10 a méně buněk ve vzorku plné krve, byla prokázána schopnost detekce CTCs i přes jejich nízký počet. Námi zjištěný výsledek koreluje s výsledky ze studie Hillig *et al.*, (2015), kde byl proveden citlivostní experiment na buněčné linii lidského adenokarcinomu prsu MCF-7. Dostatečná citlivost této metody může být dána vhodnou kombinací značených protilátek, díky čemuž je umožněna analýza více nádorových markerů nezávisle na expresi EpCAM (Wang et al., 2015). Byla prokázána srovnatelná návratnost buněk linie rakoviny prsu MCF-7 nasycených do krve dárců a analyzovaných metodami CellSearch[®] a CytoTrack CT11[™]. (Hillig et al., 2015).

V rámci pilotní analýzy krevních vzorků od pacientů s CRC byla v případě positivity pozorována zpravidla jedna až dvě CTCs na vzorek. Tato hodnota koreluje se studiemi, které byly provedeny pomocí metody CellSearch[®] (Dizdar et al., 2019). Nejvíce CTCs bylo pozorováno u vzorků odebraných den po operaci, což může být způsobeno mechanickým narušením tkáně při operaci (Micalizzi et al., 2017). Významnou roli však mohl hrát vliv opioidní analgesie na výskyt CTCs. Pacientům, u kterých byly analyzovány krevní vzorky na přítomnost CTCs, byla kromě epidurální analgesie podáván různý typ opioidní analgesie (piritramidová a morfinová) a podstupovali rozdílný typ zákroku, laparoskopického či chirurgického. Opioidy jsou analgetika pro potlačení akutní chronické bolesti, které se pojí s nádorovým onemocněním, a hlavně s imunosupresí (Paul et al., 2021). Bylo zjištěno, že pacienti, kteří byli léčeni morfinovou analgesií vykazovali zvýšené hladiny CTCs po operaci

oproti pacientům, kteří byli léčeni epidurální nebo piritramidovou analgesií (Stejskal et al., 2022). Pozorované CTCs u pacientů s morfinovou analgesií tak může být přisuzována tomuto efektu, nicméně efekt nebyl na vybraném setu analyzovaných vzorků pozorován a studium vlivu opioidní analgesie na výskyt CTCs nebylo předmětem předkládané bakalářské práce.

Detekce CTCs je obecně zatížena jejich nízkým výskytem v krevním řečišti z důvodu jejich relativně omezeného uvolňování (v závislosti na velikosti tumoru) a omezené schopnosti přežít v krevní cirkulaci v důsledku eliminace nádorových buněk imunitními buňkami a jinými mechanismy (Alix-Panabières & Pantel, 2014). Ojedinele byly pozorovány vyšší počty CTCs. U jednoho z analyzovaných vzorků bylo detekováno počet 46 CTCs. Zvýšený počet detekovaných CTCs může souviset s anamnézou. Pacient při výšce 177 cm vážil 110 kilo, což je dle BMI obezita druhého stupně. Obezita je obecně považována za přítěžující okolnost, protože může vyvolávat metabolické poruchy, které mají za následek nesprávnou funkci CD8+ T buněk a tím možné zhoršené vychytávání nádorových buněk (Fang et al., 2023). Ačkoliv přesné hodnocení výsledku v kontextu klinických dat bylo předmětem budoucích analýz v rámci studie zkoumající vliv opioidní analgesie na výskyt CTCs, pozorovaný počet CTCs lze obecně považovat za nepříznivý pro pacienta. Ze studie Bork *et al.* (2015) totiž vyplývá, že CTCs byly detekovány častěji u pacientů s metastatickým CRC. Navíc bylo zjištěno, že CTCs jsou prekursori metastáz a jejich počty korelují s rizikem vzniku metastáz a nižší mírou přežití (Maheswaran & Haber, 2010). V patientských vzorcích byly dále pozorovány klastry CTCs o 2–3 buňkách (viz obr. 10, 11 a 12 CTC3 výše). Buněčné klastry mají obecně vyšší metastatický potenciál, což značí taktéž horší prognózu pro pacienta (Hong et al., 2016). Výskyt vyššího počtu CTCs či klastrů CTCs může být do určité míry také důsledkem chirurgického výkonu. Při zásahu do tkáně pacienta může dojít k mechanickému uvolnění CTCs do krve pacienta (Micalizzi et al., 2017)

Pilotní analýza patientských vzorků ukázala dále řadu praktických poznatků a odhalila některé rizikové aspekty analýzy, kterým je potřeba věnovat zvýšenou pozornost. Při detekci CTCs bylo například pozorováno, že nádorová buňka byla mnohdy v rozkladu – lýzi (viz obr. 9 výše). Mohlo to být způsobeno porušením integrity membrány z důvodu osmotického tlaku, který mohl být zapříčiněn působením protilátek (Goodhead & MacMillan, 2017). Tento jev mohl být ale také způsoben chybou při zpracování (neopatrné promývání buněčné suspenze či rozetření na sklo) či v extrémních případech počínající degradací buněčné složky v důsledku prodlevy před zpracováním vzorku. Mikroskopické preparáty byly z hlediska intenzity fluorescence stabilní při 8 °C v řádu týdnů, ale při delším skladování (v řádu měsíců) či

opakovaném rozmrazení může nastat zeslábnutí fluorescenčního signálu a rozpad buněk. Tento jev byl například pozorován u jednoho z krevních vzorků pacienta s CRC (viz obr. 13).

Mezi možné limitace této metody patří aspekty pojící se obecně s mikroskopickými preparáty jako závislost na preciznosti při zpracování preparátu a biologická variabilita ovlivňující jeho mikroskopickou kvalitu. Přestože je zaváděná metoda časově náročnější z hlediska přípravy krevních vzorků a vyhodnocení analýzy, tak po patřičném osvojení si celého postupu je uživatelsky přívětivá a neobsahuje mnoho potenciálně kritických kroků. S ohledem na kapacitu, rychlost skenování a pozorovanou citlivost je tato metoda detekce CTCs velmi přínosná z hlediska efektivního vyšetření přítomnosti CTCs ze vzorku 10 ml plné krve bez nutnosti předchozího obohacení.

7 Závěr

V rámci teoretické části bakalářské práce byla vypracována literární rešerše shrnující poznatky o kolorektálním karcinomu (CRC) a cirkulujících nádorových buňkách (CTCs). Literární rešerše byla vypracována se zaměřením na obecnou charakteristiku, podstatu rozvoje a progresu CRC spojenou s uvolňováním CTCs jako prekursorů metastáz. Součástí rešerše je také popis metod detekce a detekčních markerů CTCs, které jsou v současnosti využívány.

V praktické části byla provedena optimalizace a validace metody přímé detekce CTCs. Pro validaci metody byla využita nádorová buněčná linie SW480 odvozená od kolorektálního adenokarcinomu a zahrnovala stabilitní a citlivostní experimenty. Z validačních experimentů vyplývá, že metoda automatické fluorescenční mikroskopie s využitím zařízení CytoTrack CT11TM je vhodná a dostatečně citlivá pro detekci CTCs na základě detekce specifických markerů.

Po validaci přístroje CytoTrack CT11TM byla započata rutinní analýza krevních vzorků pacientů s CRC pro vyšetření přítomnosti CTCs s předpokladem dalšího využití v následných studiích zabývajících se CTCs.

8 Literatura

- Adcock Funk, D., Lippi, G., & Favaloro, E. (2012). Quality Standards for Sample Processing, Transportation, and Storage in Hemostasis Testing. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 38(06), 576-585. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1319768>
- Agarwal, A., Balic, M., El-Ashry, D., & Cote, R. (2018). Circulating Tumor Cells. *The Cancer Journal*, 24(2), 70-77. <https://doi.org/10.1097/PPO.0000000000000310>
- Aghagolzadeh, P., & Radpour, R. (2016). New trends in molecular and cellular biomarker discovery for colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 22(25). <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i25.5678>
- Alix-Panabières, C., & Pantel, K. (2013). Circulating Tumor Cells: Liquid Biopsy of Cancer. *Clinical Chemistry*, 59(1), 110-118. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2012.194258>
- Alix-Panabières, C., & Pantel, K. (2014). Challenges in circulating tumour cell research. *Nature Reviews Cancer*, 14(9), 623-631. <https://doi.org/10.1038/nrc3820>
- Anderson, N., & Simon, M. (2020). The tumor microenvironment. *Current Biology*, 30(16), R921-R925. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.06.081>
- Bankó, P., Lee, S., Nagygyörgy, V., Zrínyi, M., Chae, C., Cho, D., & Telekes, A. (2019). Technologies for circulating tumor cell separation from whole blood. *Journal of Hematology & Oncology*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0735-4>
- Banyard, J., & Bielenberg, D. (2015). The role of EMT and MET in cancer dissemination. *Connective Tissue Research*, 56(5), 403-413. <https://doi.org/10.3109/03008207.2015.1060970>
- Barchitta, ., Maugeri, ., Destri, ., Basile, ., & Agodi, . (2019). Epigenetic Biomarkers in Colorectal Cancer Patients Receiving Adjuvant or Neoadjuvant Therapy: A Systematic Review of Epidemiological Studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(15). <https://doi.org/10.3390/ijms20153842>
- Berger, A., Knudson, A., & Pandolfi, P. (2011). A continuum model for tumour suppression. *Nature*, 476(7359), 163-169. <https://doi.org/10.1038/nature10275>
- Biller, L., & Schrag, D. (2021). Diagnosis and Treatment of Metastatic Colorectal Cancer. *JAMA*, 325(7). <https://doi.org/10.1001/jama.2021.0106>
- Biondi, A., Basile, F., & Vacante, M. (2021). Familial adenomatous polyposis and changes in the gut microbiota: New insights into colorectal cancer carcinogenesis. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 13(6), 495-508. <https://doi.org/10.4251/wjgo.v13.i6.495>
- Booger, L., van der Valk, M., Boonstra, M., Prevoo, H., Hilling, D., van de Velde, C., Sier, C., Farina Sarasqueta, A., & Vahrmeijer, A. (2018). Biomarker expression in rectal cancer tissue before and after neoadjuvant therapy. *OncoTargets and Therapy*, 11, 1655-1664. <https://doi.org/10.2147/OTT.S145473>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R., Torre, L., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394-424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Bruun, J., Kolberg, M., Nesland, J., Svindland, A., Nesbakken, A., & Lothe, R. (2014). Prognostic Significance of β -Catenin, E-Cadherin, and SOX9 in Colorectal Cancer: Results from a Large Population-Representative Series. *Frontiers in Oncology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00118>
- Bukowski, K., Kciuk, M., & Kontek, R. (2020). Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9). <https://doi.org/10.3390/ijms21093233>
- Campos-da-Paz, M., Dórea, J., Galdino, A., Lacava, Z., & de Fatima Menezes Almeida Santos, M. (2018). Carcinoembryonic Antigen (CEA) and Hepatic Metastasis in Colorectal Cancer:

- Update on Biomarker for Clinical and Biotechnological Approaches. *Recent Patents on Biotechnology*, 12(4), 269-279. <https://doi.org/10.2174/1872208312666180731104244>
- Campos, F. (2014). Surgical treatment of familial adenomatous polyposis: Dilemmas and current recommendations. *World Journal of Gastroenterology*, 20(44). <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i44.16620>
- Cardoso, R., Guo, F., Heisser, T., Hoffmeister, M., & Brenner, H. (2020). Utilisation of Colorectal Cancer Screening Tests in European Countries by Type of Screening Offer: Results from the European Health Interview Survey. *Cancers*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/cancers12061409>
- Castets, M., Broutier, L., Molin, Y., Brevet, M., Chazot, G., Gadot, N., Paquet, A., Mazelin, L., Jarrosson-Wuilleme, L., Scoazec, J., Bernet, A., & Mehlen, P. (2012). DCC constrains tumour progression via its dependence receptor activity. *Nature*, 482(7386), 534-537. <https://doi.org/10.1038/nature10708>
- Cohen, S., Punt, C., Iannotti, N., Saidman, B., Sabbath, K., Gabrail, N., Picus, J., Morse, M., Mitchell, E., Miller, M., Doyle, G., Tissing, H., Terstappen, L., & Meropol, N. (2009). Prognostic significance of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer. *Annals of Oncology*, 20(7), 1223-1229. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdn786>
- CONG, H., YAO, R., SUN, Z., QIU, W., YAO, Y., FENG, T., XIN, C., LIANG, J., & YUE, L. (2016). DNA hypermethylation of the vimentin gene inversely correlates with vimentin expression in intestinal- and diffuse-type gastric cancer. *Oncology Letters*, 11(1), 842-848. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.3937>
- Dan, Z., & Daxiang, C. (2018). Advances in isolation and detection of circulating tumor cells based on microfluidics, 15(4). <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2018.0256>
- Delgado-Ureña, M., Ortega, F., de Miguel-Pérez, D., Rodríguez-Martínez, A., García-Puche, J., Ilyine, H., Lorente, J., Exposito-Hernandez, J., Garrido-Navas, M., Delgado-Ramirez, M., & Serrano, M. (2018). Circulating tumor cells criteria (CyCAR) versus standard RECIST criteria for treatment response assessment in metastatic colorectal cancer patients. *Journal of Translational Medicine*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1624-2>
- Dizdar, L., Fluegen, G., van Dalum, G., Honisch, E., Neves, R., Niederacher, D., Neubauer, H., Fehm, T., Rehders, A., Krieg, A., Knoefel, W., & Stoecklein, N. (2019). Detection of circulating tumor cells in colorectal cancer patients using the GILUPI CellCollector: results from a prospective, single-center study. *Molecular Oncology*, 13(7), 1548-1558. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12507>
- Duman-Scheel, M. (2012). Deleted in Colorectal Cancer (DCC) Pathfinding: Axon Guidance Gene Finally Turned Tumor Suppressor. *Current Drug Targets*, 13(11), 1445-1453. <https://doi.org/10.2174/138945012803530215>
- Eslami-S, Z., Cortés-Hernández, L., & Alix-Panabières, C. (2020). Epithelial Cell Adhesion Molecule: An Anchor to Isolate Clinically Relevant Circulating Tumor Cells. *Cells*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/cells9081836>
- Fang, H., Wu, Y., Chen, L., Cao, Z., Deng, Z., Zhao, R., Zhang, L., Yang, Y., Liu, Z., & Chen, Q. (2023). Regulating the Obesity-Related Tumor Microenvironment to Improve Cancer Immunotherapy. *ACS Nano*. <https://doi.org/10.1021/acsnano.2c11159>
- Ferreira, M., Ramani, V., & Jeffrey, S. (2016). Circulating tumor cell technologies. *Molecular Oncology*, 10(3), 374-394. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2016.01.007>
- Gabriel, M., Calleja, L., Chalopin, A., Ory, B., & Heymann, D. (2016). Circulating Tumor Cells: A Review of Non-EpCAM-Based Approaches for Cell Enrichment and Isolation. *Clinical Chemistry*, 62(4), 571-581. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2015.249706>
- Gerges, N., Rak, J., & Jabado, N. (2010). New technologies for the detection of circulating tumour cells. *British Medical Bulletin*, 94(1), 49-64. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldq011>

- Gires, O., Pan, M., Schinke, H., Canis, M., & Baeuerle, P. (2020). Expression and function of epithelial cell adhesion molecule EpCAM: where are we after 40 years?. *Cancer and Metastasis Reviews*, 39(3), 969-987. <https://doi.org/10.1007/s10555-020-09898-3>
- Gonzalez, D., & Medici, D. (2014). Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition. *Science Signaling*, 7(344). <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005189>
- Goodhead, L., & MacMillan, F. (2017). Measuring osmosis and hemolysis of red blood cells. *Advances in Physiology Education*, 41(2), 298-305. <https://doi.org/10.1152/advan.00083.2016>
- Habli, Z., AlChamaa, W., Saab, R., Kadara, H., & Khraiche, M. (2020). Circulating Tumor Cell Detection Technologies and Clinical Utility: Challenges and Opportunities. *Cancers*, 12(7). <https://doi.org/10.3390/cancers12071930>
- Half, E., Bercovich, D., & Rozen, P. (2009). Familial adenomatous polyposis. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/1750-1172-4-22>
- Hamilton, G., & Rath, B. (2017). Mesenchymal-Epithelial Transition and Circulating Tumor Cells in Small Cell Lung Cancer. *Isolation and Molecular Characterization of Circulating Tumor Cells*, 229-245. https://doi.org/10.1007/978-3-319-55947-6_12
- Hardingham, J., Grover, P., Winter, M., Hewett, P., Price, T., & Thierry, B. (2015). Detection and Clinical Significance of Circulating Tumor Cells in Colorectal Cancer—20 Years of Progress. *Molecular Medicine*, 21(1), S25-S31. <https://doi.org/10.2119/molmed.2015.00149>
- Hardin, H., Zhang, R., Helein, H., Buehler, D., Guo, Z., & Lloyd, R. (2017). The evolving concept of cancer stem-like cells in thyroid cancer and other solid tumors. *Laboratory Investigation*, 97(10), 1142-1151. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2017.41>
- He, Y., Zhou, F., Shen, Y., Liao, D., & Cao, D. (2014). Apoptotic Death of Cancer Stem Cells for Cancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(5), 8335-8351. <https://doi.org/10.3390/ijms15058335>
- Hillig, T., Horn, P., Nygaard, A., Haugaard, A., Nejlund, S., Brandslund, I., & Sölétormos, G. (2015). In vitro detection of circulating tumor cells compared by the CytoTrack and CellSearch methods. *Tumor Biology*, 36(6), 4597-4601. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3105-z>
- Hillig, T., Nygaard, A., Nekiunaite, L., Klingelhöfer, J., & Sölétormos, G. (2014). In vitro validation of an ultra-sensitive scanning fluorescence microscope for analysis of Circulating Tumor Cells. *APMIS*, 122(6), 545-551. <https://doi.org/10.1111/apm.12183>
- Hirata, A., Hatano, Y., Niwa, M., Hara, A., & Tomita, H. (2019). Heterogeneity of Colon Cancer Stem Cells. In A. Birbrair (ed.), *Stem Cells Heterogeneity in Cancer* (pp. 115-126). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-14366-4_7
- Hong, B., & Zu, Y. (2013). Detecting Circulating Tumor Cells: Current Challenges and New Trends. *Theranostics*, 3(6), 377-394. <https://doi.org/10.7150/thno.5195>
- Huang, R., Guilford, P., & Thiery, J. (2012). Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition. *Journal of Cell Science*, 125(19), 4417-4422. <https://doi.org/10.1242/jcs.099697>
- Chandra, R., Karalis, J., Liu, C., Murimwa, G., Voth Park, J., Heid, C., Reznik, S., Huang, E., Minna, J., & Brekken, R. (2021). The Colorectal Cancer Tumor Microenvironment and Its Impact on Liver and Lung Metastasis. *Cancers*, 13(24). <https://doi.org/10.3390/cancers13246206>
- Chen, E., Xu, X., & Liu, T. (2018). Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer and Cancer Syndromes: Recent Basic and Clinical Discoveries. *Journal of Oncology*, 2018, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2018/3979135>
- Cho, E., Kang, H., Kim, N., & Yook, J. (2019). Therapeutic implications of cancer epithelial-mesenchymal transition (EMT). *Archives of Pharmacal Research*, 42(1), 14-24. <https://doi.org/10.1007/s12272-018-01108-7>

- Jain, R. (2005). Normalization of Tumor Vasculature: An Emerging Concept in Antiangiogenic Therapy. *Science*, 307(5706), 58-62. <https://doi.org/10.1126/science.1104819>
- Jasperson, K., Tuohy, T., Neklason, D., & Burt, R. (2010). Hereditary and Familial Colon Cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2044-2058. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.01.054>
- Jiang, M., Jin, S., Han, J., Li, T., Shi, J., Zhong, Q., Li, W., Tang, W., Huang, Q., & Zong, H. (2021). Detection and clinical significance of circulating tumor cells in colorectal cancer. *Biomarker Research*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s40364-021-00326-4>
- Ju, S., Chen, C., Zhang, J., Xu, L., Zhang, X., Li, Z., Chen, Y., Zhou, J., Ji, F., & Wang, L. (2022). Detection of circulating tumor cells: opportunities and challenges. *Biomarker Research*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s40364-022-00403-2>
- Kala, Z. (2018). In L. Petruželka, *Kolorektální karcinom* (První, pp. 74-75). Farmakon Press, spol. s r.o.
- Kašubová, I., Kalman, M., Jašek, K., Burjanivová, T., Malicherová, B., Vaňochová, A., Meršáková, S., Lasabová, Z., & Plank, L. (2019). Stratification of patients with colorectal cancer without the recorded family history. *Oncology Letters*. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10018>
- Kaušitz, J., Topolčan, O., Karlíková, M., Svobodová, Š., Fradera, J., Barac, V., Bartošová, Z., Costigliola, V., Kaušitzová, E., Sabolová, L., Sanislo, L., Závodná, K., & Zezulová, M. (2014). *Biomarkery v onkologii* (První). Tribun EU.
- Keck, J., Gaedcke, J., Ghadimi, M., & Lorf, T. (2022). Surgical Therapy in Patients with Colorectal Liver Metastases. *Digestion*, 1-8. <https://doi.org/10.1159/000524022>
- Kitamura, T., Qian, B., & Pollard, J. (2015). Immune cell promotion of metastasis. *Nature Reviews Immunology*, 15(2), 73-86. <https://doi.org/10.1038/nri3789>
- Lash, B., & Gilman, P. (2013). Principles of Cytotoxic Chemotherapy. *Cancer Immunotherapy*, 167-185. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394296-8.00012-9>
- Lei Xu, ., Jonathan Shamash, ., & Yong-Jie Lu, . (2015). Circulating Tumor Cells: A Window to Understand Cancer Metastasis, Monitor and Fight Against Cancers. *Journal of Cancer Research Updates*, 4(1). <https://doi.org/10.6000/1929-2279.2015.04.01.2>
- Leone, K., Poggiana, C., & Zamarchi, R. (2018). The Interplay between Circulating Tumor Cells and the Immune System: From Immune Escape to Cancer Immunotherapy. *Diagnostics*, 8(3). <https://doi.org/10.3390/diagnostics8030059>
- Li, H., Zhang, J., Tong, J., Chan, A., Yu, J., Kang, W., & To, K. (2019). Targeting the Oncogenic p53 Mutants in Colorectal Cancer and Other Solid Tumors. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23). <https://doi.org/10.3390/ijms20235999>
- Lin, D., Shen, L., Luo, M., Zhang, K., Li, J., Yang, Q., Zhu, F., Zhou, D., Zheng, S., Chen, Y., & Zhou, J. (2021). Circulating tumor cells: biology and clinical significance. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00817-8>
- Lin, D., Shen, L., Luo, M., Zhang, K., Li, J., Yang, Q., Zhu, F., Zhou, D., Zheng, S., Chen, Y., & Zhou, J. (2021). Circulating tumor cells: biology and clinical significance. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00817-8>
- Liu, F., Lu, X., Zhou, X., & Huang, H. (2021). APC gene promoter methylation as a potential biomarker for lung cancer diagnosis: A meta-analysis. *Thoracic Cancer*, 12(21), 2907-2913. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.14151>
- Liu, H., Zhang, X., Li, J., Sun, B., Qian, H., & Yin, Z. (2015). The biological and clinical importance of epithelial-mesenchymal transition in circulating tumor cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 141(2), 189-201. <https://doi.org/10.1007/s00432-014-1752-x>
- Liu, J., Zhang, C., Hu, W., & Feng, Z. (2015). Tumor suppressor p53 and its mutants in cancer metabolism. *Cancer Letters*, 356(2), 197-203. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.12.025>

- Liu, Y., Wang, X., He, D., & Cheng, Y. (2021). Protection against chemotherapy- and radiotherapy-induced side effects: A review based on the mechanisms and therapeutic opportunities of phytochemicals. *Phytomedicine*, 80. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2020.153402>
- Li, X., Liu, G., & Wu, W. (2021). Recent advances in Lynch syndrome, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s40164-021-00231-4>
- Li, Z., Zhao, L., Yu, L., & Wei, M. (2020). BRAF and KRAS mutations in metastatic colorectal cancer: future perspectives for personalized therapy. *Gastroenterology Report*, 8(3), 192-205. <https://doi.org/10.1093/gastro/goaa022>
- Lozar, T., Gersak, K., Cemazar, M., Kuhar, C., & Jesenko, T. (2019). The biology and clinical potential of circulating tumor cells. *Radiology and Oncology*, 53(2), 131-147. <https://doi.org/10.2478/raon-2019-0024>
- Lozar, T., Jesenko, T., Kloboves Prevodnik, V., Cemazar, M., Hosta, V., Jericevic, A., Nolde, N., & Grasic Kuhar, C. (2020). Preclinical and Clinical Evaluation of Magnetic-Activated Cell Separation Technology for CTC Isolation in Breast Cancer. *Frontiers in Oncology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.554554>
- Lyssiotis, C., & Kimmelman, A. (2017). Metabolic Interactions in the Tumor Microenvironment. *Trends in Cell Biology*, 27(11), 863-875. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.06.003>
- Maheswaran, S., & Haber, D. (2010). Circulating tumor cells: a window into cancer biology and metastasis. *Current Opinion in Genetics & Development*, 20(1), 96-99. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2009.12.002>
- Ma, H., Brosens, L., Offerhaus, G., Giardiello, F., de Leng, W., & Montgomery, E. (2018). Pathology and genetics of hereditary colorectal cancer. *Pathology*, 50(1), 49-59. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2017.09.004>
- Mak, M., Tong, P., Diao, L., Cardnell, R., Gibbons, D., William, W., Skoulidis, F., Parra, E., Rodriguez-Canales, J., Wistuba, I., Heymach, J., Weinstein, J., Coombes, K., Wang, J., & Byers, L. (2016). A Patient-Derived, Pan-Cancer EMT Signature Identifies Global Molecular Alterations and Immune Target Enrichment Following Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Clinical Cancer Research*, 22(3), 609-620. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0876>
- Manhas, J., Bhattacharya, A., Agrawal, S., Gupta, B., Das, P., Deo, S., Pal, S., & Sen, S. (2016). Characterization of cancer stem cells from different grades of human colorectal cancer. *Tumor Biology*, 37(10), 14069-14081. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5232-6>
- Marcuello, M., Vymetalkova, V., Neves, R., Duran-Sanchon, S., Vedeld, H., Tham, E., van Dalum, G., Flügen, G., Garcia-Barberan, V., Fijneman, R., Castells, A., Vodicka, P., Lind, G., Stoecklein, N., Heitzer, E., & Gironella, M. (2019). Circulating biomarkers for early detection and clinical management of colorectal cancer. *Molecular Aspects of Medicine*, 69, 107-122. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2019.06.002>
- Martinez-Useros, J., & Garcia-Foncillas, J. (2016). Obesity and colorectal cancer: molecular features of adipose tissue. *Journal of Translational Medicine*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s12967-016-0772-5>
- Merting, A., Poschel, D., Lu, C., Klement, J., Yang, D., Li, H., Shi, H., Chapdelaine, E., Montgomery, M., Redman, M., Savage, N., Nayak-Kapoor, A., & Liu, K. (2022). Restoring FAS Expression via Lipid-Encapsulated FAS DNA Nanoparticle Delivery Is Sufficient to Suppress Colon Tumor Growth In Vivo. *Cancers*, 14(2). <https://doi.org/10.3390/cancers14020361>
- Micalizzi, D., Maheswaran, S., & Haber, D. (2017). A conduit to metastasis: circulating tumor cell biology. *Genes & Development*, 31(18), 1827-1840. <https://doi.org/10.1101/gad.305805.117>

- Mittal, D., Gubin, M., Schreiber, R., & Smyth, M. (2014). New insights into cancer immunoediting and its three component phases—elimination, equilibrium and escape. *Current Opinion in Immunology*, 27, 16-25. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.01.004>
- Mohme, M., Riethdorf, S., & Pantel, K. (2017). Circulating and disseminated tumour cells — mechanisms of immune surveillance and escape. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 14(3), 155-167. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.144>
- Mousa, L., Salem, M., & Mikhail, S. (2015). Biomarkers of Angiogenesis in Colorectal Cancer. *Biomarkers in Cancer*, 71. <https://doi.org/10.4137/BIC.S25250>
- Müller, M., Ibrahim, A., & Arends, M. (2016). Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Archiv*, 469(2), 125-134. <https://doi.org/10.1007/s00428-016-1956-3>
- Naccarati, A., Polakova, V., Pardini, B., Vodickova, L., Hemminki, K., Kumar, R., & Vodicka, P. (2012). Mutations and polymorphisms in TP53 gene--an overview on the role in colorectal cancer. *Mutagenesis*, 27(2), 211-218. <https://doi.org/10.1093/mutage/ger067>
- Neumann, M., Schneck, H., Decker, Y., Schömer, S., Franken, A., Endris, V., Pfarr, N., Weichert, W., Niederacher, D., Fehm, T., & Neubauer, H. (2017). Isolation and characterization of circulating tumor cells using a novel workflow combining the CellSearch® system and the CellCelector™. *Biotechnology Progress*, 33(1), 125-132. <https://doi.org/10.1002/btpr.2294>
- Nguyen, H., & Duong, H. (2018). The molecular characteristics of colorectal cancer: Implications for diagnosis and therapy (Review). *Oncology Letters*. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8679>
- Norton, S., Luna, K., Lechner, J., Qin, J., & Fernando, M. (2013). A New Blood Collection Device Minimizes Cellular DNA Release During Sample Storage and Shipping When Compared to a Standard Device. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 27(4), 305-311. <https://doi.org/10.1002/jcla.21603>
- Novellasademunt, L., Antas, P., & Li, V. (2015). Targeting Wnt signaling in colorectal cancer. A Review in the Theme: Cell Signaling. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 309(8), C511-C521. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00117.2015>
- Page, K., Shaw, J., & Guttery, D. (2019). The liquid biopsy: towards standardisation in preparation for prime time. *The Lancet Oncology*, 20(6), 758-760. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30310-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30310-9)
- Pai, S., Carneiro, B., Mota, J., Costa, R., Leite, C., Barroso-Sousa, R., Kaplan, J., Chae, Y., & Giles, F. (2017). Wnt/beta-catenin pathway: modulating anticancer immune response, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0471-6>
- Pantel, K., & Speicher, M. (2016). The biology of circulating tumor cells. *Oncogene*, 35(10), 1216-1224. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.192>
- Pantel, K., & Speicher, M. (2016). The biology of circulating tumor cells. *Oncogene*, 35(10), 1216-1224. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.192>
- Parcesepe, P., Giordano, G., Laudanna, C., Febbraro, A., & Pancione, M. (2016). Cancer-Associated Immune Resistance and Evasion of Immune Surveillance in Colorectal Cancer. *Gastroenterology Research and Practice*, 2016, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2016/6261721>
- Pastuszak, M., Groszewski, K., Pastuszak, M., Dyrła, P., Wojtuń, S., & Gil, J. (2015). Cytokeratins in gastroenterology. Systematic review. *Gastroenterology Review*, 2, 61-70. <https://doi.org/10.5114/pg.2015.51182>
- Patriarca, C., Macchi, R., Marschner, A., & Mellstedt, H. (2012). Epithelial cell adhesion molecule expression (CD326) in cancer: A short review. *Cancer Treatment Reviews*, 38(1), 68-75. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2011.04.002>

- Paul, A., Smith, C., Rahmatullah, M., Nissapatorn, V., Wilairatana, P., Spetea, M., Gueven, N., & Dietis, N. (2021). Opioid Analgesia and Opioid-Induced Adverse Effects: A Review. *Pharmaceuticals*, 14(11). <https://doi.org/10.3390/ph14111091>
- Pellat, A., Netter, J., Perkins, G., Cohen, R., Coulet, F., Parc, Y., Svrcek, M., Duval, A., & André, T. (2019). Syndrome de Lynch : quoi de neuf ? *Bulletin du Cancer*, 106(7-8), 647-655. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2018.10.009>
- Rawla, P., Sunkara, T., & Barsouk, A. (2019). Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Gastroenterology Review*, 14(2), 89-103. <https://doi.org/10.5114/pg.2018.81072>
- Riggi, N., Aguet, M., & Stamenkovic, I. (2018). Cancer Metastasis: A Reappraisal of Its Underlying Mechanisms and Their Relevance to Treatment. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 13(1), 117-140. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020117-044127>
- Robertson, D. (2012). ABC of Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, 143(3), 868-869. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.07.090>
- Roma-Rodrigues, C., Mendes, R., Baptista, P., & Fernandes, A. (2019). Targeting Tumor Microenvironment for Cancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(4). <https://doi.org/10.3390/ijms20040840>
- Rosty, C., Hewett, D., Brown, I., Leggett, B., & Whitehall, V. (2013). Serrated polyps of the large intestine: current understanding of diagnosis, pathogenesis, and clinical management. *Journal of Gastroenterology*, 48(3), 287-302. <https://doi.org/10.1007/s00535-012-0720-y>
- Satelli, A., & Li, S. (2011). Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(18), 3033-3046. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0735-1>
- Shao, H., Chung, J., & Issadore, D. (2016). Diagnostic technologies for circulating tumour cells and exosomes. *Bioscience Reports*, 36(1). <https://doi.org/10.1042/BSR20150180>
- Shen, Y. (2012). Hepatocellular carcinoma stem cells: origins and roles in hepatocarcinogenesis and disease progression. *Frontiers in Bioscience*, 4(1). <https://doi.org/10.2741/448>
- Stejskal, P., Srovnal, J., Berta, E., Rehulkova, A., Vecera, L., Haiduk, F., Michalek, P., & Hajdich, M. (2022). Abstract 1956: Perioperative opioid analgesia affects the circulating tumor cells levels in colorectal cancer patients. *Cancer Research*, 82(12), 1956-1956. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2022-1956>
- Stock, C. (2022). Circulating Tumor Cells: Does Ion Transport Contribute to Intravascular Survival, Adhesion, Extravasation, and Metastatic Organotropism?. In C. Stock & L. Pardo (eds.), *From Malignant Transformation to Metastasis* (pp. 139-175). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/112_2021_68
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Swennenhuis, J., van Dalum, G., Zeune, L., & Terstappen, L. (2016). Improving the CellSearch® system. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 16(12), 1291-1305. <https://doi.org/10.1080/14737159.2016.1255144>
- Szczerba, B., Castro-Giner, F., Vetter, M., Krol, I., Gkountela, S., Landin, J., Scheidmann, M., Donato, C., Scherrer, R., Singer, J., Beisel, C., Kurzeder, C., Heinzelmann-Schwarz, V., Rochlitz, C., Weber, W., Beerenwinkel, N., & Aceto, N. (2019). Neutrophils escort circulating tumour cells to enable cell cycle progression. *Nature*, 566(7745), 553-557. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0915-y>
- Tang, D. (2012). Understanding cancer stem cell heterogeneity and plasticity. *Cell Research*, 22(3), 457-472. <https://doi.org/10.1038/cr.2012.13>

- Terry, S., Savagner, P., Ortiz-Cuaran, S., Mahjoubi, L., Saintigny, P., Thiery, J., & Chouaib, S. (2017). New insights into the role of EMT in tumor immune escape. *Molecular Oncology*, 11(7), 824-846. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12093>
- Timar, J., & Kashofer, K. (2020). Molecular epidemiology and diagnostics of KRAS mutations in human cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 39(4), 1029-1038. <https://doi.org/10.1007/s10555-020-09915-5>
- Tsang, A. (2014). Current and future molecular diagnostics in colorectal cancer and colorectal adenoma. *World Journal of Gastroenterology*, 20(14). <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i14.3847>
- Voegeli, M., & Wicki, A. (2018). Neoadjuvante, adjuvante und palliative onkologische Therapie beim kolorektalen Karzinom. *Therapeutische Umschau*, 75(10), 622-626. <https://doi.org/10.1024/0040-5930/a001049>
- Wang, J., Lu, W., Tang, C., Liu, Y., Sun, J., Mu, X., Zhang, L., Dai, B., Li, X., Zhuo, H., & Jiang, X. (2015). Label-Free Isolation and mRNA Detection of Circulating Tumor Cells from Patients with Metastatic Lung Cancer for Disease Diagnosis and Monitoring Therapeutic Efficacy. *Analytical Chemistry*, 87(23), 11893-11900. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b03484>
- Wang, L., Balasubramanian, P., Chen, A., Kummar, S., Evrard, Y., & Kinders, R. (2016). Promise and limits of the CellSearch platform for evaluating pharmacodynamics in circulating tumor cells. *Seminars in Oncology*, 43(4), 464-475. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2016.06.004>
- Wang, W., Zhang, X., Peng, J., Li, X., Wang, A., Bie, Y., Shi, L., Lin, M., & Zhang, X. (2018). Survival Mechanisms and Influence Factors of Circulating Tumor Cells. *BioMed Research International*, 2018, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2018/6304701>
- Wang, X., Qian, X., Beitler, J., Chen, Z., Khuri, F., Lewis, M., Shin, H., Nie, S., & Shin, D. (2011). Detection of Circulating Tumor Cells in Human Peripheral Blood Using Surface-Enhanced Raman Scattering Nanoparticles. *Cancer Research*, 71(5), 1526-1532. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3069>
- Wan, L., Pantel, K., & Kang, Y. (2013). Tumor metastasis: moving new biological insights into the clinic. *Nature Medicine*, 19(11), 1450-1464. <https://doi.org/10.1038/nm.3391>
- Watson, N., Ramage, J., Madjd, Z., Spendlove, I., Ellis, I., Scholefield, J., & Durrant, L. (2006). Immunosurveillance is active in colorectal cancer as downregulation but not complete loss of MHC class I expression correlates with a poor prognosis. *International Journal of Cancer*, 118(1), 6-10. <https://doi.org/10.1002/ijc.21303>
- Welinder, C., Jansson, B., Lindell, G., & Wenner, J. (2015). Cytokeratin 20 improves the detection of circulating tumor cells in patients with colorectal cancer. *Cancer Letters*, 358(1), 43-46. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.12.024>
- Whiffin, N., Hosking, F., Farrington, S., Palles, C., Dobbins, S., Zgaga, L., Lloyd, A., Kinnersley, B., Gorman, M., Tenesa, A., Broderick, P., Wang, Y., Barclay, E., Hayward, C., Martin, L., Buchanan, D., Win, A., Hopper, J., Jenkins, M. et al. (2014). Identification of susceptibility loci for colorectal cancer in a genome-wide meta-analysis. *Human Molecular Genetics*, 23(17), 4729-4737. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu177>
- Xu, H., Huang, Y., Lan, Q., Zhang, Y., Zeng, Y., Zhang, T., Chen, C., Su, P., Chu, Z., Lai, W., & Chu, Z. (2018). The mechanisms of colorectal cancer cell mesenchymal-epithelial transition induced by hepatocyte exosome-derived miR-203a-3p. *Journal of Bio-X Research*, 1(2), 62-72. <https://doi.org/10.1097/JBR.0000000000000013>
- Xu, Z., Li, K., Xin, Y., Tan, K., Yang, M., Wang, G., & Tan, Y. (2022). Fluid shear stress regulates the survival of circulating tumor cells via nuclear expansion. *Journal of Cell Science*, 135(10). <https://doi.org/10.1242/jcs.259586>

- Yadav, A., Kumar, A., & Siddiqui, M. (2021). Detection of circulating tumour cells in colorectal cancer: Emerging techniques and clinical implications. *World Journal of Clinical Oncology*, 12(12), 1169-1181. <https://doi.org/10.5306/wjco.v12.i12.1169>
- Yamagishi, H., Kuroda, H., Imai, Y., & Hiraishi, H. (2016). Molecular pathogenesis of sporadic colorectal cancers. *Chinese Journal of Cancer*, 35(1). <https://doi.org/10.1186/s40880-015-0066-y>
- Zastera, J., Roewer, L., Willuweit, S., Sekerka, P., Benesova, L., & Minarik, M. (2010). Assembly of a large Y-STR haplotype database for the Czech population and investigation of its substructure. *Forensic Science International: Genetics*, 4(3), e75-e78. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2009.06.005>
- Zauber, A., Winawer, S., O'Brien, M., Lansdorp-Vogelaar, I., van Ballegooijen, M., Hankey, B., Shi, W., Bond, J., Schapiro, M., Panish, J., Stewart, E., & Waye, J. (2012). Colonoscopic Polypectomy and Long-Term Prevention of Colorectal-Cancer Deaths. *New England Journal of Medicine*, 366(8), 687-696. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1100370>
- Zavyalova, M., Denisov, E., Tashireva, L., Savelieva, O., Kaigorodova, E., Krakhmal, N., & Perelmuter, V. (2019). Intravasation as a Key Step in Cancer Metastasis. *Biochemistry (Moscow)*, 84(7), 762-772. <https://doi.org/10.1134/S0006297919070071>
- Zhang, S., Wang, Q., Zhou, C., Chen, K., Chang, H., Xiao, W., & Gao, Y. (2019). Colorectal cancer, radiotherapy and gut microbiota. *Chinese Journal of Cancer Research*, 31(1), 212-222. <https://doi.org/10.21147/j.issn.1000-9604.2019.01.16>
- Zhao, B., Wang, L., Qiu, H., Zhang, M., Sun, L., Peng, P., Yu, Q., & Yuan, X. (2017). Mechanisms of resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Oncotarget*, 8(3), 3980-4000. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14012>
- Zhou, Y., Xia, L., Wang, H., Oyang, L., Su, M., Liu, Q., Lin, J., Tan, S., Tian, Y., Liao, Q., & Cao, D. (2018). Cancer stem cells in progression of colorectal cancer. *Oncotarget*, 9(70), 33403-33415. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23607>

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

APC – adenomatózní polypóza coli (z anglického termínu „Adenomatous Polyposis Coli“)

CEA – karcinoembryonální antigen (z anglického termínu „Carcinoembryonic Antigen“)

CIMP – CpG ostrovní methylátorový fenotyp (z anglického termínu „CpG Island Methylator Phenotype“)

CIN – chromozomální nestabilita (z anglického termínu „Chromosomal Instability“)

CK – cytokeratin

CTNNB1 – Katenin beta 1 (z anglického termínu „Catenine beta 1“)

CRC – kolorektální karcinom (z anglického termínu „Colorectal Cancer“)

CSC – nádorová kmenová buňka („Cancer Stem Cell“)

CTC – cirkulující nádorová buňka (z anglického termínu „Circulating Tumor Cells“)

DAPI – 4',6-diamino-2-fenylindol

DCC – tumor supresorový gen, mutace vedou k rozvoji CRC (z anglického termínu „Deleted in Colorectal Cancer“)

DNA MMR – DNA reparace chybného párování

EGFR – receptor epidermálního růstového faktoru (z anglického termínu „Epidermal Growth factor receptor“)

EMC – extracelulární matrix

EMT – epitel-mezenchymální tranzice (z anglického termínu „Epithelial to Mesenchymal Transition“)

EpCAM – adhezí molekula epiteliálních buněk (z anglického termínu „Epithelial Cell Adhesion Molecule“)

FDA – Úřad pro kontrolu potravin a léčiv

FAP – familiární adenomatózní polypóza

FAS – apoptický receptor

FASL – ligand receptoru FAS

FITC – fluorescein-5-isothiokyanát

HNPCC – hereditární nepolypózní kolorektální karcinom (z anglického termínu „Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer“)

KRAS – protein s GTPázovou aktivitou (z anglického termínu „Kirsten RA_t Sarcoma viral oncogene homolog“)

MHC1 – hlavní histokompatibilní komplex (z anglického termínu „Major histocompatibility complex“)

MCSC – migrující nádorová kmenová buňka (z anglického termínu „Migrating Stem Cell“)

MSI – mikrosatelitní nestabilita (z anglického termínu „Microsatellite Instability“)

MTE – mesencho-epiteliální tranzice (z anglického termínu „Mesenchymal to Epithelial Transition“)

NK buňky – buňky imunitního systému (z anglického termínu „Natural Killer“)

SCSC – stacionární nádorové kmenové buňky (z anglického termínu „Stationary Cancer Stem Cells“)

TGF- β – transformující růstový faktor β (z anglického termínu „Transforming Growth Factor β “)

TME – nádorové mikroprostředí (z anglického termínu „Tumor Microenvironment“)

TP53 – nádorový protein 53 (z anglického termínu „Tumor protein 53“)

VIM – vimentin

Wnt – signalizační kaskáda (z anglického termínu „Wingless/Int-1“)