

UNIVERZITA KARLOVA  
**3. LÉKAŘSKÁ FAKULTA**

*Urologická klinika 3.LF UK a Fakultní Nemocnice Královské  
Vinohrady*



**MUDr. Petr Klézl, MBA**

**Možnost nastavení diagnostických a  
terapeutických algoritmů ke skríníngu a  
efektivní léčbě nádorů ledvin jako prevence  
selhání léčby.**

*The possibility of setting diagnostic and therapeutic  
algorithms for screening and effective treatment of kidney  
tumours as prevention of treatment failure.*

*Disertační práce*

Praha, červenec 2020

## **Prohlášení**

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

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

Petr Klézl

V Praze, 20. července 2020

## Identifikační záznam

**Pro tvorbu identifikačního záznamu se řiďte normami ČSN ISO 690 a ČSN ISO 690-2.**

Klézl Petr. *Možnost nastavení diagnostických a terapeutických algoritmů ke skríningu a efektivní léčbě nádorů ledvin jako prevence selhání léčby. [The possibility of setting diagnostic and therapeutic algorithms for screening and effective treatment of kidney tumours as prevention of treatment failure.]* Praha, 2020, počet stran: 87, počet příloh: 2. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 3. lékařská fakulta, urologická klinika Fakultní nemocnice Královské Vinohrady, vedoucí disertační práce Doc. MUDr. Robert Grill, PhD, MHA, odborný školitel Doc. MUDr. Alexander Čelko, CSc.

**Klíčová slova: karcinom ledviny, skrínung, ultrazvuk, CTC**

**Key words: renal cancer, screening, ultrasound, CTC**

## **Poděkování**

Na tomto místě bych rád poděkoval mému školiteli Doc. MUDr. Robertu Grillovi, Ph.D., MHA a též odbornému školiteli Doc. MUDr. Alexandru Čelkovi CSc. za vedení mého doktorandského studia, za trpělivost a cenné rady, které mi pomohly překonat složitosti dané problematiky.

Současně bych rád poděkoval za spolupráci kolektivu genetické laboratoře FN Královské Vinohrady vedené Prof. MUDr. Vladimírem Bobkem, Ph.D a dále jmenovitě Mgr. Kataríně Kološtové, Ph.D a Ing. Elišce Pospíšilové. V neposlední řadě moje díky patří kolektivu urologické kliniky FN Královské Vinohrady, který se podílel na klinické práci v péči o pacienty hodnocené v mých souborech.

V samotném závěru bych chtěl poděkovat své rodině, která mi byla oporou v průběhu náročného studia a při psaní této práce.

# Obsah

<b>OBSAH</b> .....	<b>5</b>
<b>ÚVOD</b> .....	<b>7</b>
<b>1 STRUČNÝ PŘEHLED ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b> .....	<b>7</b>
<b>1.1 OBECNÁ EPIDEMIOLOGICKÁ DATA</b> .....	<b>7</b>
<b>1.2 EPIDEMIOLOGICKÁ SITUACE V ČR</b> .....	<b>10</b>
<b>1.3 SKRÍNING</b> .....	<b>10</b>
<b>1.4 TYPY A CÍLE ONKOLOGICKÝCH PREVENTIVNÍCH PROGRAMŮ V ČESKÉ REPUBLICCE</b> .....	<b>11</b>
1.4.1 Primární prevence .....	11
1.4.2 Sekundární prevence.....	12
<b>1.5 MARKERY V LÉČBĚ KARCINOMU LEDVINY</b> .....	<b>13</b>
1.5.1 Molekulární markery v léčbě karcinomu ledviny.....	15
1.5.1.1 Molekulární markery získané ze séra .....	16
1.5.1.2 Molekulární markery v moči.....	18
<b>1.6 NÁDOROVÁ HETEROGENITA A TKÁŇOVÉ BIOMARKERY</b> .....	<b>20</b>
1.6.1.1 Tkáňové biomarkery .....	21
1.6.1.2 Podskupiny imunitních buněk a nádorové mikroprostředí (Tumor microenvironment - TME).....	22
<b>1.7 CÍRKULUJÍCÍ NÁDOROVÉ MARKERY</b> .....	<b>23</b>
1.7.1 ctDNA .....	23
1.7.2 Cirkulující nádorové buňky (CTC) u karcinomu ledvin .....	24
<b>1.8 ANALÝZA CÍRKULUJÍCÍCH NÁDOROVÝCH BUNĚK (CTC)</b> .....	<b>24</b>
1.8.1 Metody izolace a detekce CTC .....	27
<b>2 CÍL PRÁCE</b> .....	<b>33</b>
<b>3 PACIENTI A METODY</b> .....	<b>34</b>
<b>3.1 EPIDEMIOLOGICKÁ STUDIE</b> .....	<b>34</b>
3.1.1 Soubory vyšetřovaných pacientů v epidemiologické studii. Vlastní soubor diagnostický a vlastní soubor operovaných pacientů v období 2011 – 2016. ....	34
3.1.2 Hodnocení diagnostických metod v iniciační diagnostice nádorů ledvin u pacientů operovaných v období 2011-2016. ....	35
3.1.3 Statistické zpracování.....	37
<b>3.2 MATERIÁL A METODY VE STUDII CTC</b> .....	<b>38</b>
3.2.1 Pacienti .....	38
3.2.2 Izolace CTC.....	39
3.2.3 Cytomorfologická analýza CTC .....	41
3.2.4 Analýza genové exprese CTC .....	43
<b>4 VÝSLEDKY</b> .....	<b>45</b>
<b>4.1 EPIDEMIOLOGICKÁ STUDIE</b> .....	<b>45</b>
<b>4.2 VÝSLEDKY CTC</b> .....	<b>46</b>
4.2.1 Prevalence CTC buněk .....	46
4.2.2 Cytomorfologické parametry CTC .....	47
4.2.3 Metabolická aktivita CTC .....	48

4.2.4 Analýza genové exprese CTC .....	49
5 DISKUZE.....	50
6 ZÁVĚR .....	57
7 SOUHRN .....	58
8 SUMMARY .....	60
9 SEZNAM TABULEK A OBRÁZKŮ .....	62
10 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	62
11 PŘÍLOHY .....	76
12 SEZNAM ZKRATEK.....	86

## Úvod

Téma disertační práce jsem si zvolil na základě svého dlouholetého zaměření na problematiku nádorů ledvin jak z pohledu diagnostického, tak z pohledu chirurgického.

K zhodnocení možností časné diagnostiky v první části dizertační práce mě vedl hlavně fakt, že nádory ledvin jsou chemo a radiorezistentní a pouze časná stadia onemocnění mají na naději na úplné vyléčení pacienta. S tím souvisí skutečnost, že časná diagnostika nádorů ledvin aktuálně není zahrnuta v preventivních programech Ministerstva zdravotnictví ČR.

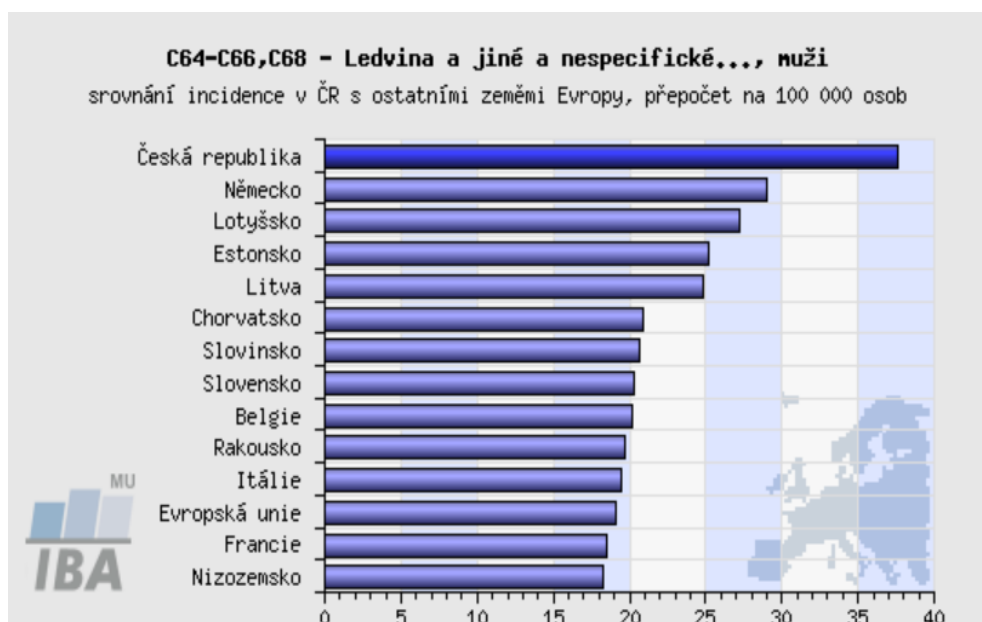
V druhé části mé práce je detailně zdokumentována problematika cirkulujících nádorových buněk (CTC z angl. Circulating tumor cells) u nádorů ledvin. Zejména jejich možné využití při sledování pacientů po operacích ledvin, kdy lze standardním odběrem periferní krve a testem na přítomnost CTC odhalit počáteční stav rekurence nádorového onemocnění. Zároveň je možné do budoucna pomocí analýzy genové exprese CTC lépe cílit stále rozšířenější a pro pacienty dostupnější biologickou léčbu.

## 1 Stručný přehled řešené problematiky

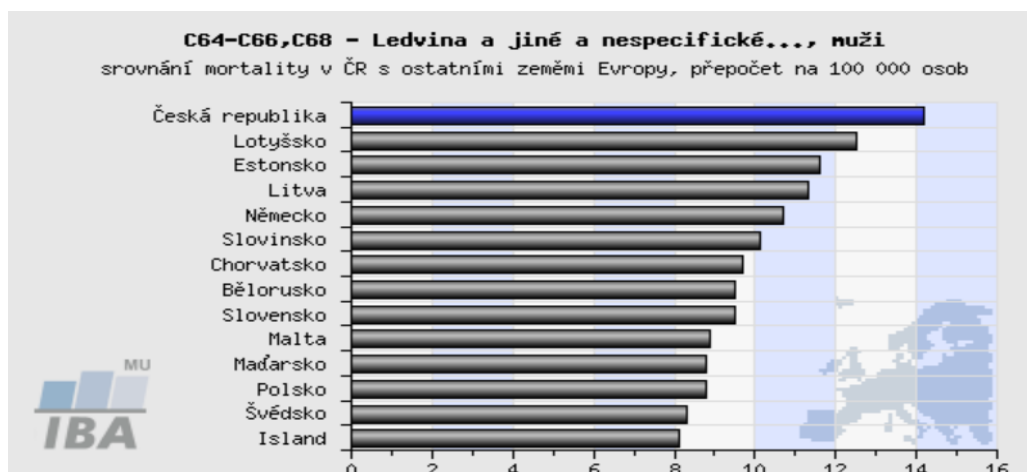
### 1.1 Obecná epidemiologická data

Karcinom ledviny (RCC) představuje 2-3 % všech maligních nádorů (European Network of Cancer Registries, 2016) s nejvyšší incidencí v západních zemích. V posledních dvou dekadách se incidence karcinomu ledviny zvýšila asi o 2 %, celosvětově a i v Evropě. V západních zemích se v poslední dekádě incidence ustálila (Lindblad, 2016). V roce 2012 bylo v Evropské Unii zjištěno 84,400 nových případů karcinomu ledviny a 34,700 úmrtí spojených s karcinomem ledviny (Ferlay, a další, 2018). V Evropě se celková mortalita zvyšovala až do 90. let a poté se stabilizovala nebo se snižovala (Levi, a další, 2008). Mortalita se snížila od 80. let ve skandinávských zemích, od 90. let ve Francii, Německu, Rakousku, Holandsku a v Itálii. Nicméně v některých evropských zemích (Chorvatsko, Estonsko, Řecko, Irsko, Slovensko) mortalita má stoupající trend (King, Pollack, Li, King, & Master, 2014).

**Obr. 1 Srovnání incidence renálního karcinomu s ostatními zeměmi Evropy**  
(zdroj uroweb.cz).



**Obr. 2 Srovnání mortality na renální karcinom s ostatními zeměmi Evropy**  
(zdroj [www.uroweb.cz](http://www.uroweb.cz)).



Predominance postižení mužů je 1,5:1 a vrchol incidence mezi 60 a 70 lety (Levi, a další, 2008). Mezi etiologické faktory patří kouření a obezita (Bergström, Hsieh, Lindblad, Lu, Cook, & Wolk, 2001) a hypertenze. Mnoho dalších faktorů je spojeno s nižším nebo vyšším rizikem karcinomu ledviny. Tyto faktory zahrnují specifické dietní návyky, expozice kancerogenům při výkonu povolání, acetaminophen a nesteroidní antiflogistika (Choueiri, Je, & Cho, Analgesic use and the risk of kidney cancer, 2014), košťálová zelenina (Liu, a další, 2013), nefrolitiáza (Cheungpasitporn, a další, 2015), a virová hepatitida (Macleod, 2013; Gonzalez, 2015). Současná data nejsou zatím přesvědčivá (Weikert, 2008; Daniel, 2012). Efektivní způsob profylaxe zahrnuje vynechání kouření (Macleod, 2013; Gonzalez, 2015) a redukce hmotnosti



(Tahbaz, Schmid, & Merseburger, 2018). Renální karcinom je nejčastějším solidním nádorem ledviny a představuje asi 90 % všech nádorů ledviny. Pojem renální karcinom v sobě zahrnuje řadu histologických podtypů a jsou popsány v klasifikaci WHO z roku 2016 (Moch, Cubilla, Humphrey, Reuter, & Ulbright, 2016). Hlavní tři histologické typy renálního karcinomu jsou světlobuněčný, papilární a chromofobní karcinomy. Vedle klasifikace histologického typu ještě hodnotíme nukleární grade, lymfovaskulární invazi, sarkomatoidní rysy, nekrozy a invazi do perirenálního tuku nebo do vývodního systému ledviny. Dalším hodnocením je určení TNM systému (Moch, Cubilla, Humphrey, Reuter, & Ulbright, 2016).

**Tab. 1 TNM klasifikační systém renálního karcinomu .**

(Dle aktuálního European Association of Urology Guidelines, 2020)

<b>T- primární tumor</b>		
<b>Tx</b>	<b>Primární nádor nelze hodnotit</b>	
<b>T0</b>	<b>Nádor není přítomen</b>	
<b>T1</b>	<b>Nádor 7cm a méně omezený na ledvinu</b>	
	T1a	Nádor < 4cm
	T1b	Nádor >4cm a <7cm
<b>T2</b>	<b>Nádor &gt; 7 cm omezený na ledvinu</b>	
	T2a	Nádor >7 cm ale ≤ 10cm
	T2b	Nádor > 10cm
<b>T3</b>	<b>Nádor se propaguje do velkých cév nebo do perinefrické tkáně ale ne do ipsilaterální nadledviny</b>	
	T3a	Nádor se šíří do renální žíly nebo segmentálních větví nebo nádor invaduje do perirenálního tuku/nebo tuku renálního sinu ale ne přes Gerotovu fascii
	T3b	Nádor invaduje do dolní duté žíly pod bránici
	T3c	Nádor invaduje do dolní duté žíly nad bránici nebo stěnu dolní duté žíly
<b>T4</b>	<b>Nádor invaduje přes Gerotovu fascii / zahrnuje infiltraci přilehlé nadledviny</b>	
<b>N -Regionální uzliny</b>		
	Nx	Regionální uzliny nelze hodnotit
	N0	Žádné metastatické uzliny
	N1	Metastatické postižení regionálních uzlin
		Regionální uzliny nelze hodnotit
<b>M - Vzdálené metastázy</b>		
	M0	Nejsou přítomné vzdálené metastázy
	M1	Přítomné vzdálené metastázy
<b>pTNM stadia</b>		
	Stadium I	T1 N0 M0
	Stadium II	T2 N0 M0
	Stadium III	T3 N0 M0
		T1, T2, T3 N1 M0
	Stadium IV	T4 jakékoliv N M0
		Jakékoliv T jakékoliv N M1

## 1.2 Epidemiologická situace v ČR

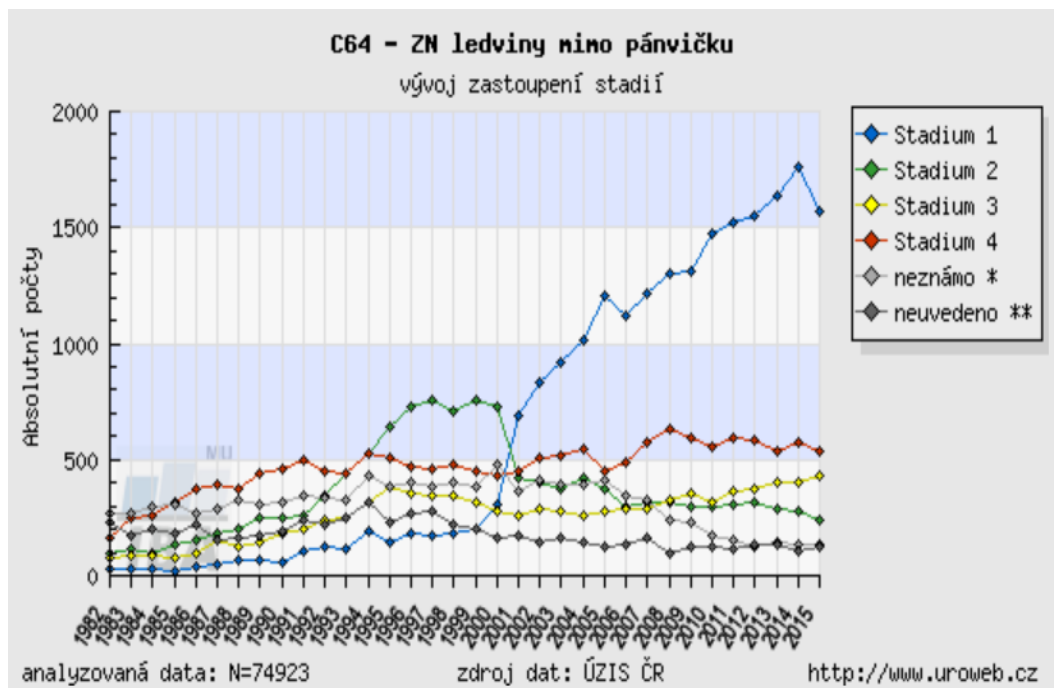
V České Republice jsme svědky trvale narůstající incidence karcinomu ledviny, ale stabilní mírou mortality od druhé poloviny 90. let. Tento vývoj svědčí pro odhalení časných stádií (Ústav Zdravotnických Informací a Statistiky, 2020). Mnoho nádorů ledvin je asymptomatických až do pozdních stádií. Více než 50 % renálních karcinomů je zjištěno náhodně při vyšetřování zobrazovacími metodami provedenými pro nespecifické symptomy (Jayson & Sanders, 1998). Klesající míru úmrtnosti navzdory rostoucí incidenci ovlivňuje zvyšující se kvalita lékařské péče a lepší organizace protinádorové léčby (např. vznik Komplexních onkologických center v roce 2005). Dalším faktorem je dostupnost nových diagnostických prostředků a časnější diagnostika nádorových onemocnění. Zvýšená detekce nádorů ledvin ultrazvukem a počítačovou tomografií vede ke zvýšení incidentálně zjištěných nádorů ledvin. Tyto nádory jsou obvykle menší a nižších stádií (Patard, 2002; Tsui, 2000). Vyšší procento případů je diagnostikováno v prognosticky příznivějších stádiích onemocnění i v souvislosti se skrínigovými programy (Ústav Zdravotnických Informací a Statistiky, 2020).

## 1.3 Skrínig

Skrínig je metoda vyhledávání onemocnění v časném stadiu, ve kterém se onemocnění neprojevuje žádnými příznaky. Skrínig se provádí, pokud je v populaci vysoké riziko daného onemocnění a existuje vhodná diagnostická metoda. Metoda testování musí být jednoduchá, která nepřináší větší dyskomfort pacientovi a časná intervence je schopná zlepšit prognózu pacientů.

Samo onemocnění musí též splňovat některá kritéria. Musí způsobovat podstatnou morbiditu a mortalitu, pokud neléčeno, musí být relativně časté a časné zjištění musí mít lepší výsledky (Malaeb, a další, 2005). Lepší přežití pacientů s náhodně zjištěným RCC ve srovnání s pacienty s klinicky manifestním onemocněním, zjištěné v řadě studií (Konnak, 1985; DeKernion, 1992; Licht, 1994; Kessler, 1994; Harass, 1996), podporuje zavedení nějaké formy skrínigových programů. Indikátorem úrovně kvality této prevence je poměr lokalizovaných nádorů k ostatním pokročilým stádiím a vývoj úmrtnosti na dané zhoubné nádory dle jednotlivých kategorií.

Obr. 3 Vývoj incidence renálního karcinomu podle stadií onemocnění v ČR (Mužík, Dušek, Babjuk, Kubásek, Fínek, & Petruželka, 2020).



## 1.4 Typy a cíle onkologických preventivních programů v České Republice

Hlavní teze onkologické prevence a onkologických skriningových programů definovala Česká onkologická společnost ČLS JEP a Ministerstvo zdravotnictví ČR. Onkologická prevence znamená předvídání a předcházení nežádoucím událostem, souvisejícími se vznikem a progresí zhoubných nádorů.

### 1.4.1 Primární prevence

Primární prevence má za úkol snížit výskyt zhoubných nádorů. Jde o snižování až eliminaci rizikových faktorů, které mají prokazatelný a přímý vliv na vznik malignit. Indikátorem úrovně primární prevence je vývoj incidence zhoubných nádorů.

**Programy v rámci primární prevence** (Screeningové programy MZČR, 2020)

- Boj proti kouření
- Boj s alkoholismem
- Ochrana kůže před neúměrnou expozicí slunečnímu záření
- Eradikace infekcí žaludku *Helicobacterem Pylori*
- Vakcinace proti hepatitídám
- Vakcinace proti papilomavirům
- Výchova ke zdravé výživě a zdravému životnímu stylu

- Analýza hodnocení komerčních produktů z hlediska možné kancerogenity
- Analýza stavu životního prostředí z hlediska kancerogenity, zejména vodních zdrojů

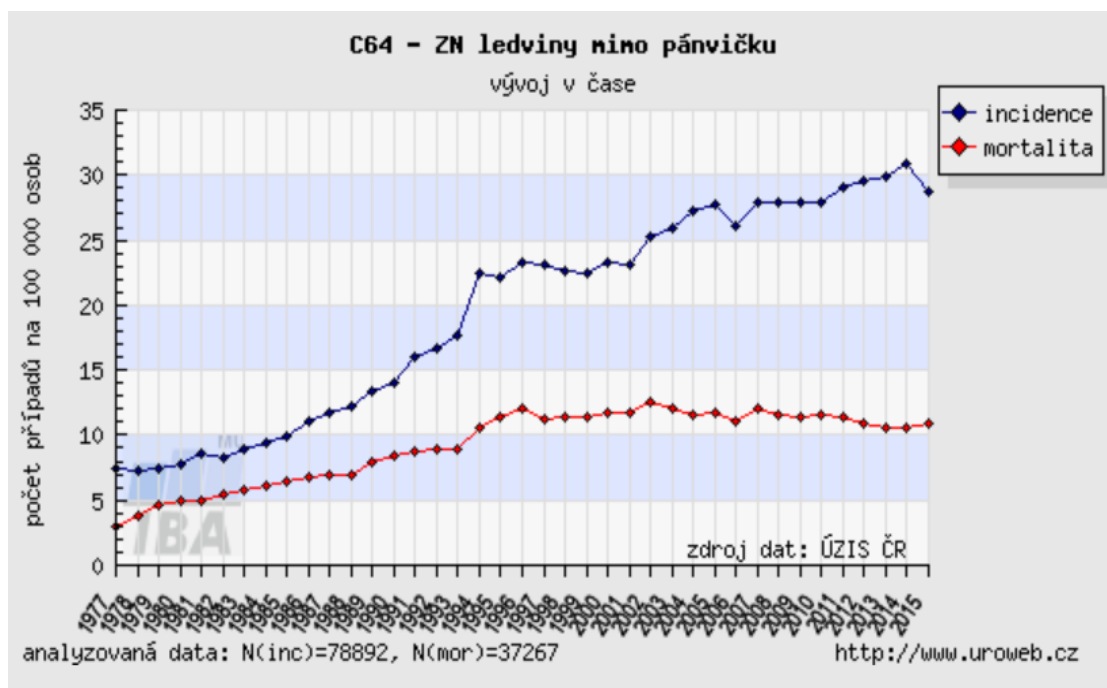
### 1.4.2 Sekundární prevence

Sekundární prevence je zaměřena na záchyt zhoubných nádorů v časném, pokud možno plně vyléčitelném stadiu. Indikátorem úspěšnosti je poměr lokalizovaných stádií nádorů k ostatním pokročilejším stádiím a vývoj úmrtnosti na zhoubné nádory

Vhodným skrínigovým vyšetřením se ukazuje ultrazvukové vyšetření díky rozšířenosti ultrazvukových přístrojů v urologických ambulancích. Vyšetření, které navazuje na fyzikální vyšetření, je rychlé, levné a bez radiační zátěže.

Ultrazvukové vyšetřování k detekci nádorů ledvin chápeme jako sekundární prevenci, tj. vyšetření je zaměřeno na zachycení zhoubných nádorů v časném, plně léčitelném stadiu. V současné době je v ČR realizováno preventivní skrínigové vyšetřování pro nádory prsu, děložního čípku a nádory tlustého střeva. Ministerstvo zdravotnictví ČR ve spolupráci se zdravotními pojišťovnami připravilo projekt „Systém podpory prevence vybraných nádorových onemocnění v ČR – skrínigové programy“, který byl zahájen v roce 2014 (Screeningové programy MZČR, 2020).

Obr. 4 Vývoj incidence a úmrtnosti na renální karcinom v ČR (Mužík, Dušek, Babjuk, Kubásek, Fínek, & Petruželka, 2020)



## 1.5 Markery v léčbě karcinomu ledviny

Druhá část dizertační práce je zaměřená na problematiku vyšetření cirkulujících nádorových buněk (CTC z angl. Circulating tumor cells). Vzhledem k absenci biomarkeru charakterizujícímu nádory ledvin bylo snahou využít možnosti vyšetření CTC u pacientů operovaných pro nádor ledvin. Vyšetření CTC buněk je součástí skupiny vyšetření tzv. tekuté biopsie (liquid biopsy). Tato metoda byla ověřena a částečně metodicky schválena FDA, jako užitečný prognostický nástroj pro řadu onkologických onemocnění (Bielčíková, Jakobová, Pinkas, Zemanová, Kološtová, & Bobek, 2017). Toto vyšetření je již personifikovanou léčbou, která přizpůsobuje preventivní a terapeutické plány objektivním parametrům, které charakterizují biologickou individualitu jednotlivého pacienta a jeho onemocnění. Tento přístup, který přináší větší naději na dosažení lepších výsledků léčby, je umožněn současnou mírou znalostí o etiopatogenezi nádorových onemocnění a technickou vyspělostí na úrovni diagnostických metod a léčebných prostředků.

V klinické onkologii jsou stále hledány lepší diagnostické prostředky odhalující primární nádor. Stejně závažná je časná identifikace metastatického procesu nebo reziduálního onemocnění podobně jako podmínky, za kterých dochází k tvorbě metastáz. Časná diagnostika primárního nádoru a zároveň co nejrychlejší identifikace sekundárního tumoru, rozhodují o úspěšnosti léčby. Léčba spočívá v odstranění primárního nádoru nebo v likvidaci tumorózních ložisek v přilehlém regionu, lymfatickém systému, kostní dřeni nebo ve vzdálených orgánech. Bohužel v současné době naše diagnostické metody nejsou schopné makroskopicky tato ložiska identifikovat. Zatím neexistuje rutinní metoda, která by zpřesnila prognózu šíření základního nádorového onemocnění, jak v obecné rovině, tak i u konkrétního pacienta, bezprostředně předpověděla úspěšnost primární terapie a zároveň mohla rozhodným způsobem ovlivnit algoritmus terapeutického procesu u jednotlivých druhů nádorového bujení. Taková terapie by mohla být daleko cílenější, a to nejen ve smyslu lokalizace, ale i zaměřením terapeutických postupů, odvozeného z kvality identifikovaných nádorových buněk. Současně by sloužila ke kontrole jejich eradikace v závislosti na účinnosti typu podané léčby.

Součástí nádorové léčby je u karcinomu ledvin (RCC) léčba chirurgická, která si vyžaduje zcela oprávněně individualizované chirurgické rozhodování, a to zejména u nádorů metastatických.

Historicky byli pacienti s metastatickým RCC zvažováni pro počáteční cytoreduktivní nefrektomii vzhledem k celkovým přínosům: snížení nádorové zátěže, zmírnění příznaků spojených s většími hmotnostmi tumoru a co je nejdůležitější, zlepšení přežití v éře terapií založených na interferonu (Flanigan, 2001; Mickisch, 20021). Aktuálně, výsledky studie fáze III CARMENA, porovnávající cytoreduktivní nefrektomii následovanou sunitinibem versus samotnou léčbu sunitinibem, tuto praxi zpochybnily (Méjean, a další, 2018). V této studii měli pacienti léčeni pouze sunitinibem výsledky přežití (HR 0,89; 95% CI 0,71–1,10), s mediánem OS 18,4 měsíce ve srovnání s 13,9 měsíce v případě, že byla provedena cytoreduktivní operace. Mezi významná omezení CARMENY patří provádění cytoreduktivní chirurgie u pacientů se špatným rizikovým onemocněním, nerovnost mezi léčebnými rameny a opožděná nefrektomie. **Výsledky studie CARMENA zdůrazňují potřebu přiměřeně stratifikovat pacienty podle rizika při zvažování cytoreduktivní chirurgie. I v tomto bodu by mohly být CTC nápomocny.** Stávající rizikové modely, které předpovídají přínos nefrektomie při stanovení metastatického onemocnění, zahrnují různé laboratorní a klinické parametry. Jeden takový model definuje jako rizikové faktory vysoké sérové hladiny LDH, nízké sérové hladiny albuminu, klinicky invazivní nádory T3–4, retroperitoneální adenopatii, supradiafragmatickou adenopatii, metastázy v játrech a metastazující příznaky: pacienti splňující čtyři nebo více z těchto kritérií prozatím nemají žádný přínos z počáteční cyto-reduktivní nefrektomie (Culp, a další, 2010). Podobně velká retrospektivní analýza mezinárodního konsorcia IMDC ukázala, že pacienti s nejméně čtyřmi špatnými prognostickými markery nemají klinicky prokazatelný účinek z cytoreduktivní nefrektomie a ve skutečnosti by mohli mít tímto postupem poškození (Heng, a další, 2014).

Se zavedením imunoterapie ICI (z angl. Immune-checkpoint inhibitors) a inhibitorů anti- VEGFR (TKI z angl – tyrosine kinase inhibitors) - léčby nové generace se celkové přežívání (OS – z angl. Overall survival) pacientů s pokročilým stadiem RCC výrazně zlepšilo. Pravděpodobně budou vyvinuty nové kombinace léčebných strategií, které dosáhnou synergie mezi těmito dvěma terapeutickými modalitami nebo jinými třídami léčiv, což nakonec rozšíří terapeutické působení terapií první linie.

Paralelně pokroky v genomickém sekvenování a molekulární charakterizaci RCC (Tab. 2 -3) také rozšířily a umožnily přesnější prognózu onemocnění, ale pro vedení klinického rozhodování jsou nutně zapotřebí prediktivní biomarkery. Diagnostické nástroje, které integrují data biomarkerů, mohou pomoci individuálně upravit plány

léčby na základě odlišných biologických rysů a je třeba je vyvinout společně s novými léčbami. Pokrok vskutku umožnil rychlou a podrobnou individualizaci nádorů s nadějí využití těchto biologických dat při rozhodování v reálném čase je možné v blízké budoucnosti.

Integrace genomických údajů do klinických nomogramů vedla ke zlepšení prognózy rizika u pacientů se světlobuněčným karcinomem ledvin (ccRCC z angl. Clear cell renal carcinoma). V případě nejasných buněčných histologií a dalších klinických parametrů by mělo být zvaženo stanovení mutací v zárodečných liniích k identifikaci genů způsobujících rakovinu.

---

IMDC, mezinárodní konsorcium databáze metastatických renálních buněk; MSKCC, Memorial Sloan Kettering Cancer Center; NGS, sekvenování nové generace.

### **1.5.1 Molekulární markery v léčbě karcinomu ledviny**

V současné době se jako hodnotící prognostické faktory po operacích nádorů ledvin využívají nomogramy, které v sobě obsahují nezávislé prognostické faktory. Mezi stěžejní faktory patří TNM systém a jaderný grading hodnocený podle Fuhrmanové (Ljungberg, a další, 2015). Snahou je získat molekulární marker zjistitelný v tělních tekutinách (např. v krvi nebo moči), který by se uplatnil při skríningu, diagnostice a sledování pacientů po operacích a onkologické léčbě. Problémem analýzy tělních tekutin je většinou spolehlivost vyšetření, které je používané k detekci tohoto markeru. Na straně druhé, úskalím imunohistochemických vyšetření tkáně je, že zásadním způsobem závisí na manipulaci se vzorky, výběru použité protilátky, její koncentraci, fixační technice a dalších technických procedurách. Jako slibné se jeví analýzy genové exprese a exprese proteinů z biologických vzorků tkáně, krve nebo moči. V následující části práce je podán přehled některých potenciálních biomarkerů využitelných u RCC.

### **1.5.1.1 Molekulární markery získané ze séra**

Sérové molekulární markery u pacientů s renálním karcinomem můžeme testovat pomocí imunoesejí (např. ELISA), imunonefelometrie nebo hmotnostnotní spektrofotometrie.

#### **TRAF – 1 – Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor – 1**

Protein, který se účastní regulace přežívání buňky, její proliferace a diferenciace. Hodnoty u pacientů s renálním karcinomem jsou významně vyšší než hodnoty u zdravých jedinců (Rajandram, a další, 2014).

#### **Zánětlivé proteiny**

Existují studie, které zkoumaly vliv zánětlivých imunitních buněk a cytokinů na tumorogenezi u nádorů ledvin ve snaze posoudit možnosti nových strategií léčby na podkladě imunoterapie. Cytokiny IL-1, IL-6 a TNF- $\alpha$  mají vliv na syntézu ostatních zánětlivých mediátorů jako například amyloid A, který má vliv na vývoj imunitních buněk a na indukci enzymů degradující extracelulární matrix. Bylo zjištěno, že Amyloid A má potenciál stát se biomarkerem pro renální karcinom. Amyloid A koreluje se stádiem onemocnění (Fischer, Teil, Hoda, & Fornara, 2012).

Protein podobný Amyloidu A je C reaktivní protein (CRP) u kterého dochází k jeho zvýšení vlivem infekce, traumatu, ischemie a v poslední řadě též u zhoubných onemocnění. De Martino a kolektiv (2013) popsali zvýšené hladiny CRP u pacientů s RCC, u kterých se jednalo o pokročilé onemocnění se špatnou prognózou .

Enzym gamma – glutamyl transferáza (GGT) produkovaný především v játrech (ale též v ledvinách, slezině a slinivce břišní) je aktivní v metabolismu glutationu a je často zvýšen u různých nádorů. Proto se může jednat o další potenciální molekulární marker. Hofbauer a kol. (2014) popsali GGT jako další možný prognostický faktor u RCC .

#### **Proteiny tepelného šoku (Hsp 27 – heat shock protein)**

Hypoxie na podkladě zánětlivé reakce či oxidativních procesů má vliv na tumorogenezi a progresi nádorového onemocnění. Buněčná stresová reakce je ovlivněna „stresovými proteiny“, které se účastní buněčné odpovědi. Do skupiny těchto proteinů



patří heat shock protein 27 (Hsp27), který byl v hyperfosforylované formě zjištěn u vícera nádorových onemocnění. Ve studii White a kol. zjistili (2014) vysoké hladiny Hsp27 v krvi a v moči u pacientů s RCC s vysokým gradingem .

### **Molekuly podílející se na apoptóze**

Buněčné procesy podílející se na regulaci apoptózy se zásadním způsobem podílejí na tumorogenezi. Právě změny fyziologických procesů apoptózy mohou vést k nekontrolované proliferaci nádorových buněk. Podíl na těchto změnách mají abnormální aktivity anti-apoptotických proteinů nebo inhibitorů pro-apoptotických mediátorů. Hlavní molekulou, která působí programovanou smrt buňky je tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL). Toiyama a kol. (2013) zjistili pokles hladiny TRAIL u pacientů s renálním karcinomem. Hodnoty byly měřeny před a po operaci a hodnoty byly srovnány s kontrolní skupinou, a navíc byla provedena korelace s přežíváním pacientů.

V krevním oběhu pacientů s nádorovým onemocněním můžeme měřit produkty apoptózy, cytokeratiny (CK), které se mohou v oběhu cirkulovat ve formě neštěpené nebo štěpené pomocí kaspáz. Zvýšené hladiny CK18 byla pozorovány u pacientů s RCC ve srovnání se zdravými pacienty (Yildiz, a další, 2013).

### **Molekuly charakterizující mikroprostředí nádoru**

Růst nádorů je ovlivněn mikroprostředím, které se skládá z makrofágů, fibroblastů, růstových faktorů, cytokinů a angiogenních faktorů, které jsou zodpovědné za růst nádorů. Faktorem, který zásadním způsobem ovlivňuje toto mikroprostředí, je hypoxie. Proangiogenní faktor vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF z angl. vascular endothelial growth factor) je ovlivněn hypoxií prostřednictvím hypoxia indukujícího faktoru  $-1\alpha$  a  $1\beta$  (HIF- $1\alpha$  a HIF- $1\beta$  z angl. hypoxia inducing factor) (Frew & Moch, 2015). Von-Hippel Lindau (VHL) protein se podílí na stabilizaci HIF-faktorů a proto je zásadním způsobem zodpovědný za vznik většiny světlobuněčných karcinomů ledviny.

Dalším hypoxií indukovaným faktorem je prolyl hydroxyláza 3 (PHD3), jehož exprese je často zvýšena v tkáni nádorů ledvin. Jedná se o faktor, který se podílí na degradaci HIF proteinů ve spolupráci s VHL. Byly zkoumány hladiny u pacientů s RCC a u zdravých jedinců a také titry po chirurgickém výkonu. Byl pozorován pokles hladin PHD3 u pacientů, kteří podstoupily operační výkon (Tanaka, a další, 2011). Hypoxie

navíc může podpořit expresi karboanhydrázy (CA z ang. Carbonic anhydrase). Jejich syntéza může být porušena u některých nádorových onemocnění. Zvýšení **CA IX** bylo pozorováno v séru i tkáních pacientů s RCC. Hodnoty byly porovnány s hladinami u zdravých jedinců (Takacova, 2013).

### **Ostatní biomarkery séra**

U části pacientů s kalcifikacemi pozorujeme hyperkalcemii z důvodů poruchy metabolismu promotorů a inhibitorů kalcifikace. Mezi tyto látky patří Fetuin A, Osteopontin a Osteoprotegerin (Schena, Selvaggi, Gesualdo, Battaglia, & Lombardi, 2018). Zajímavým faktem je, že hladiny Osteopontinu jsou vyšší u papilárního renálního karcinomu oproti ostatním typům RCC. Současně zvýšení hodnot koreluje se stadiem TNM a nukleárním gradem (Papworth, Bergh, Grankvist, Ljungberg, Sandlund, & Rasmuson, 2012). Ubiquitin proteázy, byly pozorovány u renálního karcinomu a dalších nádorů (D'Arcy, 2015).

### **Thymidin kináza 1 (TK1)**

Pyruvát kináza – isoenzym M2, zvýšené hladiny obou enzymů korelují s TNM stadiem a nukleárním gradem (Nisman, 2010).

## **1.5.1.2 Molekulární markery v moči**

### **Protein jaderné matrix 22 (Nuclear Matrix Protein 22)**

Protein jaderné matrix 22 (NMP22) je obsažen ve struktuře jádra a hraje důležitou roli v replikaci DNA, transkripci RNA a regulaci exprese genů. Jsou popsány proteiny, které jsou specifické pro některé orgány, jako prso, tlusté střevo, kosti a urotel. NMP 22 je specifický pro karcinomy uroteliálního původu a existuje diagnostický test pro pacienty v rámci sledování u nádorů močového měchýře. Navíc jsou zmínky o tom, že by se NMP22 mohl uplatnit též jako nástroj skríningu u RCC (Kaya, Ayan, Gokce, Kilicarslan, Yildiz, & Gultekin, 2009).

### **Neutrofilní s gelatinosou asociovaný Lipocalin (NGAL)**

Lipocaliny jsou převážně velikostně malé (25kDa) extracelulární proteiny, které působí jako transportéry hydrofobních ligandů (Flower, 1996). NGAL je exprimován v epitelálních buňkách ledviny a podílí se na vývoji ledviny. NGAL můžeme zaznamenat u poranění ledviny a u některých typů nádorů ledviny jako chromofobní

renální karcinom a papilární renální karcinom. Jejich exprese je vyšší u vyšších nukleárních gradů. Nižší hladiny jsou pozorovány u uroteliálních karcinomů a onkocytomů (Di Carlo, 2013). NGAL, který je uvolněn nádorovými buňkami může být volně filtrován glomerulem, ale díky mechanismu reabsorpce v proximálním tubulu je vylučování omezené. Jeho vylučování do moči je proto možné při současném tubulárním poškození. Podle provedené studie Di Carla (2013) nebyla potvrzena korelace mezi hladinami NGAL a velikostí tumoru nebo stádiem nádorového onemocnění.

### **Kidney Injury Molecule -1 (KIM-1)**

Kidney Injury Molecule KIM-1 je biomarker sledovatelný v moči u nádorů ledvin, ale zároveň u mnoha akutních a chronických onemocnění ledvin, což limituje jeho použití jako diagnostického markeru u RCC (Morrissey, 2011)

### **Perilipin 2**

Perilipin 2 (PLIN2), synonymum je adipocyte-differentiation-related protein, který byl zastížen v moči u pacientů se světlobuněčným a papilárním renálním karcinomem ledviny (Morrissey, 2010).

### **Matrix Metalloproteinázy (MMP)**

Matrix metalloproteinázy jsou endopeptidázy s obsahem zinku, které se účastní degradace částí extracelulární matrix. Přímou či nepřímou mají vliv na růstové faktory podporující zvětšování nádorů. Nejznámějšími jsou MMP-2 (gelatináza A) a MMP-9 (gelatináza B). V současnosti se jejich použití pro potřeby diagnostiky nádorů ledvin neosvědčilo (Di Carlo, 2012).

### **Aquaporin – 1**

Zvýšená exprese proteinu Aquaporine 1 (AQP-1) byla zjištěna v tkáni nádorů ledvin a při současném vylučování ledvinami byly zachycené vyšší koncentrace v moči. Koncentrace nejsou zásadním způsobem ovlivněny jinými nenádorovými stavy (infekce močových cest, diabetická nefropatie) a korelují se stádiem nádorového onemocnění (Morrissey, London, Luo, & Kharasch, 2010).

## 1.6 Nádorová heterogenita a tkáňové biomarkery

Přestože značná část pacientů s nádorovou diagnózou je vyléčena samotnou operací nebo chirurgickou a adjuvantní systémovou léčbou, mnoho pacientů stále umírá v důsledku rozvoje metastatického onemocnění (Valastyan & Weinberg, 2011). Zároveň platí, že nádorové onemocnění má charakter darwinovského vývoje (Aparicio & Caldas, 2013). Tento fakt je potvrzen důkazy ze studií sekvenování nové generace (NGS), kdy v rámci primárního nádoru dochází ke klonální evoluci a tato evoluce je alespoň částečně živena intratumorální heterogenitou (Yates & Campbell, 2012). Tato intratumorální heterogenita je dána především změnami genu Von Hippel-Lindau, LOH 3p (ztráta heterozygoty z angl. Lost of heterozygosity) a epigenetickou inaktivací (epigenetic silencing). Inaktivace VHL genu je zásadní změnou u většiny konvenčních světlobuněčných karcinomů ledviny (Gerlinger, a další, 2012). Samotná inaktivace VHL není dostatečná pro vývoj renálního karcinomu. Procesu se účastní druhotné mutace v genech jako např. PBRM1, SETD2, BAP1, KDM5C, PTEN, MTOR a PIK3CA (Tab. 2). Data ze studie TRACERx dokumentují druhotné mutace a chromozomální změny, které se uplatňují ve vývoji RCC a charakterizují klinickou důležitost těchto změn. (Turajlic, 2018a). Nádory s nízkou intratumorální heterogenitou a nízkou genomickou instabilitou mají běžně nízkou míru malignity. Tumory s vysokou genomovou instabilitou a vysokou intratumorální heterogenitou; včetně PBRM1 mutací, jsou často následované klonálními aktivacemi sekundárních mutací PI3KCA a SETD2, chromozomálními delecemi chromozomu 9 (9p) a 14 (14q) u pokročilejších stádií. Nádory, které se vyznačují nízkou intratumorální heterogenitou, ale vysokou genomickou instabilitou, SETD2 a BAP1 mutacemi jsou odpovědné za agresivní onemocnění s časným vývojem metastatického procesu v době diagnózy (Turajlic, a další, Tracking Cancer Evolution Reveals Constrained Routes to Metastases, 2018b). Delece na 9. chromozomu mají za následek tvorbu metastáz a ve výsledku jsou zodpovědná za špatnou prognózu (Brannon, a další, 2010). Pokud se metastázy vyvinou, pokračuje klonální evoluce pod selekčním tlakem protinádorové léčby (Gerlinger, a další, 2012). U pacientů s nádory ledvin jsme svědky, že se metastatické onemocnění může vyvinout po mnoha letech od diagnózy primárního nádoru. Tyto pozdní recidivy jsou způsobeny nádorovou dormancí, kdy nádorové buňky, které se rozšířily do vzdálených orgánů, zůstávají v nečinnosti, během této doby se v nich hromadí genetické a epigenetické

znaky, které za specifických podmínek mohou vyvolat zjevné metastázy (Aguirre-Ghiso, 2007).

### **1.6.1.1 Tkáňové biomarkery**

Hodnocení exprese ligandu 1 programované buněčné smrti (PD-L1) pomocí imunohistochemie je přímo ovlivněno stanovením protilátek, prahem positivity, získáním čerstvé versus archivní tkáně a předchozí expozicí terapií, což zdůrazňuje potřebu pro pečlivou interpretaci napříč studiemi (Zhu, a další, 2018). Za zmínku stojí, že v hlášených a probíhajících studiích založených na ICI u pacientů s RCC byly použity různé testy pro testování PD-1 a PD-L1, s odchylkami.

Kromě toho, intratumorální a intertumourální heterogenita mezi primárním nádorem a metastatickými místy jsou další otázkou při rutinním použití těchto testů (Callea, a další, 2015).

Vysoká hladina exprese PD-L1 je nicméně nepříznivým prognostickým faktorem spojeným s agresivními rysy RCC, jako je vysoký jaderný grading, postižení lymfatických uzlin a vzdálené metastázy (Thompson, 2004, 2007; Iacovelli, 2016). Navíc vysoké hladiny PD-L1 souvisejí s nepříznivými výsledky anti-VEGFR TKI terapie (Choueiri, a další, 2015).

Zatímco vývoj rané fáze nivolumabu anti-PD-1 monoklonální protilátky (mAb) u pacientů s RCC naznačoval možné korelace mezi stavem exprese PD-L1 a výsledkem (Motzer, a další, 2015a), tento signál nebyl v registrační studii potvrzen. Ve studii fáze III CheckMate 025 srovnávající nivolumab s everolimem u pacientů s dříve léčeným metastatickým RCC byl medián OS s nivolumabem 21,8 21 měsíců u pacientů s nádory PD-L1 + oproti 27,4 měsíců vs. u pacientů s nádory PD-L1. V CheckMate 214, ve fázi III studii, která zkoumala kombinaci anti-cytotoxického T lymfocytárního antigenu 4 (CTLA-4) mAb ipilimumab a nivolumab ve srovnání se sunitinibem, byl u pacientů s PD-L1 pozorován prediktivní signál prospěchu z kombinace ICI. Exprese v  $\geq 1$  % nádorových buněk: PFS 22,8 měsíců a 5,9 měsíců u pacientů s nádory PD-L1 + a PD-L1-nádory a míra objektivní odpovědi (ORR) 58 %, respektive 37 %. Za zmínku stojí, že ORR 37 % u pacientů s nádory PD-L1 podtrhuje výsledky předchozích studií prokazujících klinický přínos nezávislý na stavu PD-L1 (Motzer, a další, 2018). Předběžné výsledky IMmotion151, randomizovaná studie fáze III porovnávající kombinaci atezolizumabu (anti-PD-L1 protilátka) a bevacizumab se sunitinibem, také

vykazovaly korelaci mezi PD-L1 + status a reakcí na onemocnění. V této studii byl stav PD-L1 + definován expresí na  $\geq 1$  % lymfocytů infiltrujících nádor. Střední PFS byl lepší u pacientů s PD-L1 + nemocí, kteří dostávali kombinovanou léčbu (střední PFS (mPFS) 11,2 měsíce oproti 7,7 měsíců; HR 0,74;  $p = 0,022$ ), což naznačuje, že pacienti s nádory PD-L1 + mají při monoterapii sunitinibem nižší výsledky (Rini, a další, 2019).

Ve studii fáze III JAVELIN Renal-101 se kombinace axitinibu a avelumabu prokázala lepší PFS než sunitinib u pacientů s nádory PD-L1 + (mPFS 13,8 měsíce versus 7,2 měsíců; HR 0,61;  $P < 0,0001$ ), lepší ORR (51,4 % oproti 25,7 %; NE 3,10).

Podobně studie fáze III KEYNOTE-426 splnila své dva primární koncové body a prokázala lepší OS a PFS pro kombinaci pembrolizumabu a axitinibu ve srovnání se sunitinibem u všech léčených pacientů ve všech podskupinách (HR pro riziko úmrtnosti 0,53;  $p < 0,0001$ ; HR pro mPFS 0,69;  $p < 0,001$ ), rozdíl, který byl oceněn v analýzách podskupin u pacientů s nádory PD-L1 + a pacientů s onemocněním PD-L1 (Rini, a další, 2019).

Protože obě tyto studie fáze III ukazují nadřazenost imunoterapie vůči sunitinibu bez ohledu na stav PD-L1, jsou zapotřebí další biomarkery založené na tkáni, které pomáhají klinickým lékařům při výběru terapií.

#### **1.6.1.2 Podskupiny imunitních buněk a nádorové mikroprostředí (Tumor microenvironment - TME).**

RCC TME je jedním ze solidních nádorů s nejvyšším stupněm infiltrace imunitního systému. RCC je obohacen o T-buňky a nádorové makrofágy (TAM z angl. Tumor associated macrophages) (Şenbabaoğlu, 2016; Ock, 2016). Přesné vymezení podskupin umožnilo identifikaci až 22 odlišných podskupin T-buněk a 17 samostatných podskupin TAM s různými imunosupresivními a prozánětlivými fenotypy; specifické klastry TAM jsou silně spojeny s oddílem CD8 + PD-1 + T-buňkami a kratším PFS 96. Kromě toho může být infiltrace TAM spojena s výsledky terapie VEGFR TKI 97, zatímco imunitní infiltrace CD8 + T-buňkami v primárních i metastatických místech je spojena se špatnou prognózou, infiltrace se může dynamicky měnit v průběhu terapie anti- VEGFR TKIs (Zizzari, a další, 2018) nebo imunoterapie ICI (Choueiri, a další, 2016).

Data z randomizované studie zaměřené na biomarker CheckMate 009 týkající se různých dávek nivolumabu, která obsahovala analýzu sériových biopsií tkáňových

vzorků, poukazují na dynamický TME s výraznými změnami ve složení imunitních buněk a expresními profily zjištěnými krátce po zahájení léčby nivolumabem (Choueiri, a další, 2016).

Tyto pečlivě prováděné studie a jejich výsledky budou mít nepochybně zásadní dopad na budoucí vývoj léků. Pro budoucí úsilí všechny výše zmíněné data zdůrazňují zásadní význam integrace imunitních a stromálních aspektů TME při stanovování prognostických a prediktivních znaků pro stávající léčebné režimy a co je nejdůležitější pro racionální vývoj nových kombinací léčiv.

## 1.7 Cirkulující nádorové markery

Cirkulující nádorová DNA (ctDNA) a cirkulující nádorové buňky (CTC) pocházející z nádorových buněk jsou detekovatelné v periférii, a proto poskytují příležitost neinvazivně hodnotit primární a metastatická tkáně.

### 1.7.1 ctDNA

Na úrovni ctDNA byly identifikovány vícečetné genomické alterace včetně změn v genech VHL, TP53, EGFR, NF1, ARID1A. Genomické alterace v jakémkoli genu byly detekovány až u 78,6 % pacientů s metastatickým RCC (Pal, a další, 2017).

Cílem další kohortové studie bylo použít ctDNA load (nálož) pro vyhodnocení reakce na terapii (Dizman, a další, 2018), přítomnost detekovatelné ctDNA byla spojena s vyšší radiografickou zátěží onemocnění (Maia, a další, 2017). Mnoho z těchto studií bylo omezeno zahrnutím malého počtu vzorků a nedostatečným porovnáním se vzorky primárních nádorových tkání. V přesněji definovaném genomickém prostředí, jako je například RCC s deletovaným genem MET, by se analýza ctDNA mohla ukázat jako zvláště užitečná při prognózování patientských výsledků a jako náhrada za nádorovou zátěž a odpověď na cílená agens (Ikeda, Schwaederle, Mohindra, Fontes Jardim, & Kurzrock, 2018).

Byly zjištěny rozdíly ve frekvenci detekovaných genomických změn v nastavení léčby frontline a second-line. Předběžné výsledky z velkého hodnocení profilu ctDNA u pacientů, kteří byli léčeni několika prvními nebo druhými liniemi, prokázali zvýšený výskyt genomických změn, zejména těch, které ovlivňují TP53 a MTOR, po léčbě první linie terapií VEGFR TKI. Tyto rozdíly byly navrženy tak, aby odrážely léčebné selektivní tlaky a účinek frontline terapie na ctDNA, ale mohly by také jednoduše odrážet technická omezení hodnocení ctDNA v tomto onemocnění v pokročilých

časových bodech. Ačkoli frekvence genomické alterace může být v primární nádorové tkáni a ctDNA podobná, při testování se může objevit značná míra nesouladu (Hahn, a další, 2017), což zdůrazňuje náročnou rovnováhu mezi heterogenitou nádoru a diagnostickým rozlišením. Velikost fragmentů ctDNA může být také spojena s horšími PFS, což představuje další vlastnosti, které by se pravděpodobně měly vzít v úvahu při analýze (Yamamoto, a další, 2018).

### **1.7.2 Cirkulující nádorové buňky (CTC) u karcinomu ledvin**

Nádory RCC jsou náchylné k přechodům (tranzicím) epitelových buněk na buňky mezenchymální. RCC buňky tudíž postrádají epiteliální markery, a proto CTC obohacení na základě epiteliálních markerů zůstává obtížné a vyžaduje analýzu jednotlivých buněk (Broncy, a další, 2018a). Sjednocujícím rysem ve světlobuněčných buněčných typech RCC je ztráta v genu VHL, která nabízí modelovou příležitost studovat kvalitu stávajících analytických metod pro obohacení CTC. Podrobněji jsou metody k analýze CTC diskutovány v kapitole 3.

## **1.8 Analýza cirkulujících nádorových buněk (CTC)**

Zdá se, že kterýkoli aspekt diagnostiky, léčby a farmakokinetiky onkologického onemocnění může být zásadním způsobem ovlivněn identifikací cirkulujících či diseminovaných nádorových buněk (Lugo, Braun, Cote, Pantel, & Rusch, 2003). Cirkulující nádorové buňky (CTC) poprvé popsal Ashworth (1869) a jejich existence není neznámá. Současné technologické pokroky v detekci a charakterizaci CTC a ctDNA by proto mohly řešit a umožnit personifikovanou léčbu na základě sledování vývoje nádoru v reálném čase.

Novinkou jsou technologie, umožňující určení jejich koncentrace a další zkoumání (imunocytochemické, genetické, genomické a další). V současné době je pouze CellSearch® test schválený FDA (Food and Drug Administration – Úřad pro kontrolu potravin a léčiv USA) k detekci CTC jako pomocná metoda k monitoraci pacientů s metastatickým karcinomem prostaty, prsu a kolorekta. Mnohé další biotechnologické společnosti vyvíjí techniku detekce CTC, ale zatím ještě jejich systémy nebyly schváleny ke klinickému využití, je však pravděpodobné, že se to s dalším vývojem změní.

Pro nádory urogenitálního systému, nezřídka diagnostikované ve stadiu generalizace, je každý příspěvek ke včasnému zahájení terapie velice cenný. Proto



bychom se chtěli pokusit o zařazení těchto vyšetření do diagnostického algoritmu nejen tam, kde jde o relativně známý výzkum (prostata), ale i v oblasti dalších orgánů, zejména tam, kde neexistují spolehlivé biomarkery vypovídající o přítomnosti a rozsahu onemocnění.

**Tab. 2 Genomické varianty renálních karcinomů a s tím spojené syndromové manifestace**

(Převzato z Ritesh R. Kotecha, Robert J. Motzer and Martin H Voss. *Towards individualized therapy for metastatic renal cell carcinoma, Clinical Oncology 2019,16, 621-633 str 623*)

Subtyp	Genomické alterace	Klinická manifestace
Genomické varianty u karcinomu ledviny		
Světlobuněčný karcinom	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mutace ve VHL, PBRM1, SETD2, BAP1, KDM5C, TERT and/or MTOR;</li> <li>• ztráta chromozomálních segmentů 3p, 15q, 9p a /nebo 14q;</li> <li>• zisk chromozomálních segmentů 5q</li> </ul>	• Nejčastější RCC histologický typ
Papilární karcinom typ I	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mutace v MET, NRF2 a/ nebo CUL3;</li> <li>• zisk chromozomů 3, 7 a/nebo 17</li> </ul>	• Biologie nádoru bývá indolentnější než biologie jiných nemutovaných papilárních nádorů I. typu
Papilární karcinom typ II	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mutace ve CDKN2A, CDKN2B (cyklín dependentní inhibitor kinázy 2A ) TERT (reverzní transkriptáza telomer) , NF2 (neurofibromin2) , FH (fumarát hydratáza), MET (protoonkogen) a/nebo SETD2;</li> <li>• translokace TFE3</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Biologie nádoru bývá méně indolentní než biologie papilárních nádorů I. Typu;</li> <li>• Heterogenní třída včetně více definovaných podtypů</li> </ul>
Chromofobní karcinom	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mutace TP53 nebo PTEN (fosfatáza a tenzín homolog) ;</li> <li>• strukturální přestavby v TERT promotoru (reverzní transkriptáza telomer);</li> <li>• mutace v mitochondriální DNA;</li> <li>• ztráta chromozomů 1, 2, 6, 10, 13, 17 a/nebo 21</li> </ul>	• Může mít původ a překrývat se s onkocyty
Medulární renální karcinom	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mutace ve SMARCB1 (známa pod jménem INI1 a BAF47 , aktín dependentní modulátor chromatinu);</li> <li>• amplifikace ABL (tyrozin-kináza protoonkogen)</li> </ul>	• Často spojené s hemoglobinopatiemi
Translokace Xp11.2 (TFE3) nebo 6p21 (TFEB)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Translokace TFE3 a TFEB (Transkripční faktor E3, EB);</li> <li>• časté copy- number variace (CNVs)</li> </ul>	20–40% dětských RCCs a 1–4 % RCC u dospělých
Karcinom sběrného ductu	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mutace ve NF2 (neurofibromin 2), SETD2 (histon lyzín N-metyl transferáza), SMARCB1 (aktín dependentní modulátor chromatinu), CDKN2A (cyklín dependentní inhibitor kinázy 2A) a/nebo FH (fumarát hydratáza)</li> </ul>	• Nádory s agresivním fenotypem; obtížně odlišit od renálních medulárních karcinomů
Mucinózně tubulární a spinocelulární karcinom	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vícečetná ztráta chromozomů ovlivňující chromozomy 1, 4, 6, 8, 9, 13, 14, 15 a/nebo 22</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Biologie nádoru obvykle indolentní</li> <li>• Může být souběžná s nefrolitiázou</li> </ul>
Tubulocystický karcinom	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Chromozomální zisky s 7, 17);</li> <li>• Mutace ve ABL1 (tyrozin-kináza protoonkogen) a/nebo PDGFRA (růstový</li> </ul>	• Biologie nádoru Obvykle indolentní

	faktor odvozený z trombocytů)	
Karcinom asociovaný s cystickou fibrózou	• Vícečetné chromozomální zisky 3, 7, 16, 17 a/nebo Y	• Často se objevuje při cystických onemocněních v konečném stádiu onemocnění ledvin; • Může být multifokální

**Tab. 3 Syndromy renálního karcinomu se zárodečnou mutací**

<b>Subtyp</b>	<b>Genomické alterace</b>	<b>Klinická manifestace</b>
Syndromy renálního karcinomu se zárodečnou mutací		
VHL	• Ztráta genu VHL (Von-Hippel Lindau)	• Hemangioblastomy sítnice a CNS, neuroendokrinní nádory, feochromocytomy a epididymální cystadenomy
Dědičná leiomyomatóza aRCC	• Ztráta genu FH (fumarát hydratáza)	• Mladý věk na začátku (30 let věku), kožní leiomyomy, děložní myomy, feochromocytomy, paragangliomy a leiomyosarkomy
Dědičný papilární RCC	• Ztráta genu MET- proto-onkogenu	• Vysoká penetrance; • Často multifokální a bilaterální nádory ledvin s indolentním růstovým vzorcem
Birt-Hogg-Dubé syndrom	• Ztráta genu FLCN (folliculin)	• Kožní fibrofolikulom, pneumotorax a onkocytomy; • autozomální dominance
Tuberózní skleróza komplex	• Ztráta genu TSC1, TSC2 (hamartin)	• Angiomyolipom, angiofibromy, astrocytom z obřích buněk, srdeční rabdomyomy a / nebo hamartomy
Cowden syndrom	• Ztráta genu PTEN (fosfatáza a tenzín homolog)	• Růst hamartomu a rakoviny prsu, štítné žlázy a endometria a / nebo melanom; • Překrývání se syndromem PTEN hamartoma
Hyperparathyroidism-čelistí nádorový syndrom	• Ztráta genu CDC73 (parafibromin)	• Makrocefalie, rakovina štítné žlázy, rakovina endometria a prsu, rakovina prostaty a / nebo obličejová trichilemomie
BAP1 dědičná predispozice k nádoru	• Ztráta genu BAP1 (ubikvitín carboxyl-terminální hydroláza)	• Uveální a kožní melanom a maligní mezoteliom a / nebo plicní adenokarcinom; • obvykle mají jasné buněčné histologie
MITF-asociovaný melanom a RCC syndrom	• Ztráta genu MITF (melanocyt indukující transkripční faktor)	• Melanom, rakovina pankreatu a / nebo feochromocytom
Dědičný feochromocytóm a paragangliomy	• Ztráta genu SDHB, SDHC nebo SDHD (sukcinát dehydrogenáza)	• bilaterální a extra adrenální feochromocytomy, paragangliom a / nebo gastrointestinální stromální nádory

CNS, centrální nervový systém; RCC, karcinom ledvin; VHL, Von Hippel-Lindau.

CTC jsou maligní buňky nacházející se v periferní krvi, pocházející z tumoru ať už primárního či sekundárního ložiska. Přibývá důkazů o tom, že přítomnost CTC naznačuje přítomnost metastatického onemocnění a horší prognózu (Paterlini-Brechot, 2007; Pantel, 2008). V současné době existuje několik technik vyvinutých k izolaci a charakterizaci CTC. Počty CTC korelují s klinickými výsledky u několika druhů malignit: prsu, prostaty, tlustého střeva a plic. Detekce a charakterizace nádorových buněk cirkulujících v periferní krvi si získaly v posledních letech značnou pozornost. Výzkum genotypu a fenotypu šířících se nádorových buněk poskytuje nové poznatky v biologii šíření nádorových buněk u onkologicky nemocných pacientů a otvírá nové možnosti včasného odhalení metastatického bujení a jeho úspěšné léčby (Pantel & Alix-Panabières, The clinical significance of circulating tumor cells, 2007). Snahy o zlepšení průběhu onkologické terapie zahrnují nalezení lepších metod kvantitativní a kvalitativní analýzy CTC. Izolace a detekce CTC z krevního oběhu mohou být obtížné, vzhledem k jejich malému počtu, resp. koncentraci, a k nedostatku spolehlivých markerů k identifikaci těchto buněk. Ke zdokonalení stávajících metod je zapotřebí dalšího biologického a technického výzkumu, tedy nalezení konkrétnějších markerů pro CTC, jakož i zvýšení citlivosti a funkčnosti současných zařízení (Esmaeilsabzali, Beischlag, Cox, Parameswaran, & Park, 2013). Analýza subpopulace CTC zdůrazňuje význam epiteliálně-mezenchymálního přechodu (EMT z angl. Epithelial mesenchymal transition), procesu, který může být rozhodující pro umožnění nádorovým buňkám napadnout a růst v místech vzdálených od původního místa nádoru. Obdobně může mít významný vliv i objevení markerů rezistence na léčbu, které jsou exprimovány na úrovni CTC. Analýza genomu CTC by mohla pomoci nalézt nové terapeutické cíle v boji proti rezistenci na léčbu. CTC by se mohli stát cenným zdrojem biomarkerů, pakliže není k dispozici biopsie tkáně. In vitro kultury buněk pacientů získaných z CTC-populace mohou umožnit hodnocení terapeutických strategií prováděných ex vivo a v reálném čas (Friedlander, Premasekharan, & Paris, 2014).

### **1.8.1 Metody izolace a detekce CTC**

Sporadicky se vyskytující CTC v periferní krvi (odhadem jedna buňka na miliardu normálních krevních buněk) vyžadují využití pokročilého bioinženýrského vybavení k jejich separaci, identifikaci a určení počtu. Vzhledem k vysoké složitosti, metodologickým omezením a nedostatečné standardizaci je v současnosti klinická

použitelnost většiny technik detekce CTC bohužel omezená. Diseminované a cirkulující nádorové buňky lze nalézt u vzorků pacientů s malignitou v periferní krvi a v kostní dřeni (Bilkenroth, Taubert, Riemann, Rebmann, Heynemann, & Meye, 2001). Odebírání vzorků z kostní dřene je invazivní a je obtížnější v implementaci do běžné denní praxe. Současné metody detekce CTC v periferní krvi jsou limitovány jejich nižšími koncentracemi (Masuda, 2005; Wiedswang, 2006). Bylo vyvinuto mnoho metod *obohacení* CTC k dosažení jejich izolace (Tab. 4).

Nejvíce využívané metody obohacení nádorových buněk z kostní dřene a periferní krve využívají gradientu hustoty při centrifugaci a imunomagnetických technik (Rosenberg, a další, 2002). Metody obohacení založené na hustotě buněk jsou založeny na principu různé gravitace buněk dle jejich vzrůstající hustoty při centrifugaci. Metody založené na protilátkách využívají specifické antigenní znaky na povrchu nádorových buněk k jejich separaci od krvinek a nenádorových krevních buněk. Například pro nádorové buňky je specifický adhezivní protein EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule), který je zvýšeně exprimovaný u mnoha typů malignit a není přítomný u krevních buněk. V literatuře bylo popsáno mnoho přístupů s EpCAM protilátkami konjugovaných s feromagnetickými částicemi a s následnou separací v magnetickém poli (Wu, 2006; Trzpis, 2007). Po obohacení nádorovými buňkami se využívá imunochemických a na PCR založených molekulárních vyšetření k vyloučení falešně pozitivních výsledků. Některé metody užívají pouze metody detekce bez využití obohacení k minimalizování ztrát CTC způsobených nedokonalou separací. Imunologické přístupy jsou založeny buď na specifických epiteliálních, nebo orgánově specifických antigenech, které jsou výlučně exprimovány na nádorových buňkách a mohou být analyzovány zjednodušenými automatizovanými skenovacími zařízeními. Automatizovaná digitální ultrarychlá mikroskopie a užití laserového skenování otevřely v této oblasti nové příležitosti pro imunocytochemické přístupy (Gerges, Rak, & Jabado, 2010).

Vzhledem k výše uvedeným metodám, které jsou vysoce pracovně a časově náročné, byl vyvinut poloautomatický imunomagnetický separační systém (CellSearch<sup>®</sup>), který kombinuje detekci a obohacení nádorových buněk. Tato technika využívá magnetické částice kovalentně spojené s protilátkami EpCAM, po nichž následuje cytokeratinové barvení a separace. CellSearch<sup>®</sup> byl již zaveden do klinických studií s cílem sledovat CTC u pacientů léčených novými typy cílené terapie a byl schválen FDA v USA (de Bono, a další, 2008). Tato metoda byla účinně použita k

vyhodnocení prognostického vlivu na progresi u různých typů lidských malignit (Cristofanili, 2007; Naoe, 2008; Wind, 2009). Avšak obohacení na bázi EpCAM je omezeno širokou škálou hladin exprese proteinu u různých typů nádorů (Gerges, Rak, & Jabado, 2010). Stručný přehled CTC-izolačních metod, přehled CTC-detekčních metod je uveden v Tab. 4.

**Tab. 4 Schematický seznam a popis metodik obohacování CTC**  
(Informace byly převzaty a upraveny dle Bankó, 2019 a Chen, 2017)

Metoda	Výhody	Limitace	
Biofyzikální vlastnosti	Velikost/deformabilit a jako základ separace	Snadná a rychlá metoda Vysoká testovací kapacita objemu Zachycuje klastry CTC a CTC Molekulární analýza obohacených buněk bez problémů CTC bez značení protilátkami Nemodifikované a životaschopné buňky Krátká doba procesu obohacení Nižší náklady díky nepřítomnosti protilátek	Ztráta CTC s velikostí rovnou a menší než velikost pórů filtru Poškození CTC v důsledku hemodynamického stresu Průtokový tlak Možná interference s jinými buňkami (leukocyty) Problémy s ověřením (rozdíl ve velikosti mezi modely CTC a nádorovými liniemi)
	Centrifugace na hustotním gradientu	Jednoduché použití Zpracování velkých objemů krve	Ztráta CTC s vysokou hustotou Nízká čistota
	Dielektroforéza a elektrické vlastnosti buněk	Vysoká CTC viabilita	Ztráta CTC s elektrickým nábojem podobným leukocytům Nízká čistota
Biologické vlastnosti	Pozitivní selekce (založena na protilátkách)	Vysoká čistota Snadné zvětšení testovaného objemu Automatizované systémy Následná down- stream analýza	Ztráta CTC subpopulací včetně EMT CTC, klastrů a CTC maskovaných krevními buňkami (nebyl identifikován žádný univerzální CTC antigen) Mohou být vyžadovány testy specifické pro nádor, protože fenotyp CTC se liší podle typu nádoru a v průběhu progresu a průběhu léčby CTC vázané na povrch separačního zařízení mohou způsobit potíže při regeneraci buněk
	Negativní selekce (deplece krevních buněk)	Potenciál pro obohacení všech subpopulací CTC Snadno použitelné oddělování podskupin CTC bez značení CTC bez navázání kuliček	Nízká čistota

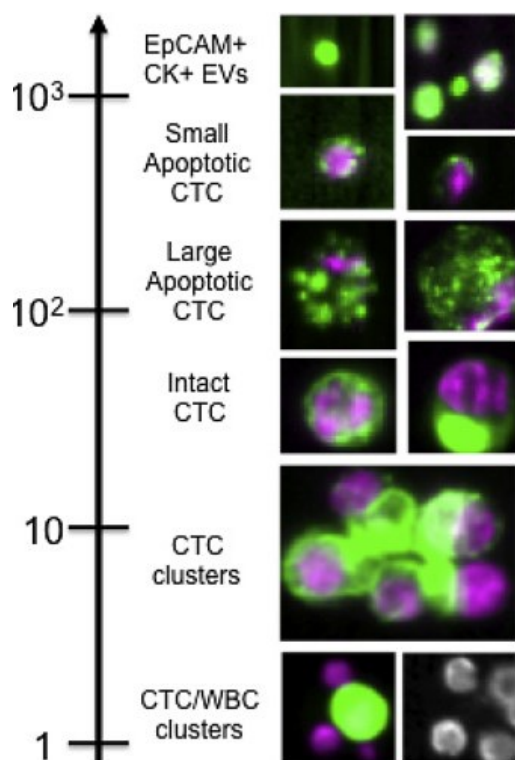
### Obr. 5 Systém CELLSEARCH<sup>®</sup>

První a jediný klinicky schválený systém (FDA) pro identifikaci, izolaci a počet cirkulujících nádorových buněk (CTC) z jednoduchého krevního odběru. Test detekuje a stanoví počet CTC epiteliálního původu (CD45-, EpCAM +, cytokeratiny 8, 18+ a / nebo 19+) ze 7,5 ml vzorku krve s vysokou úrovní citlivosti a specifity. Poskytuje rychlou a reprodukovatelnou analýzu CTC pomocí jednoduchého procesu ve třech krocích: odběr vzorků, příprava vzorků a analýza vzorků pomocí unikátní imunomagnetické a fluorescenční zobrazovací technologie (Cellsearch, 2020) .



### Obr. 6 Různé tvary CTC separované a zobrazené pomocí CELLSEARCH<sup>®</sup>.

(Shora dolů: EpCAM +, CK + extracelulární vezikuly; malé apoptické CTC; velké apoptické CTC; CTC klastre a klastre CTC s lymfocyty připojenými k CTC. Relativní frekvence výskytu v 7.5 mL periferní krve jsou uvedeny na ose y ( $1 - 10^3$ ). Převzato z K. Andree: Challenges in circulating tumor cell detection by the CellSearch system† (Andree, van Dalum, & Terstappen, 2016)



Reverzní transkriptázová polymerázová řetězová reakce (RT-PCR) je jednou z nejčastěji používaných technik pro detekci nukleových kyselin CTC a byla úspěšně aplikována u mnoha typů malignit. Tato metoda může detekovat molekulární markery spojené s nádorem s vyšší citlivostí než testy založené na proteinové analýze (Seiden, 1994; Ghossein, 1995). CTC detekce pomocí PCR závisí na genově specifických oligonukleotidových primerech a již byla použita k detekci buněk rakoviny prostaty v periferní krvi (Bossolasco, a další, 2002). Nicméně PCR má nízkou specifitu kvůli nedostatku molekulárních cílů specifických pro rakovinu u většiny urogenitálních malignit. Kromě toho jsou i v normálních buňkách nukleové kyseliny kódující exprimované proteiny asociované s nádorem, jako je například prostatický specifický antigen (PSA). PCR je proto extrémně náchylná k chybám v kvantifikaci a vyžaduje vysokou metodickou standardizaci, která omezuje její široké klinické využití.

Nová detekční metoda zvaná CTC-chip může separovat nádorové buňky z plné krve pomocí EpCAM protilátkou pokrytých mikroskopických bodů. Po tomto prvním kroku jsou CTC barveny protilátkami proti cytokeratinu nebo tkáňově specifickému markeru, jako PSA u karcinomu prostaty, a jsou vizualizovány automatickým skenováním. CTC chip prokázal vysokou senzitivitu a specifitu při dvojnásobné detekci ve srovnání se v současnosti dostupnými technologiemi, jako je CellSearch (Nagrath, a další, 2007).

U pacientů s metastazujícím karcinomem prostaty identifikoval CTC-chip 16 až 292 CTC na mililitr. CTC -chip umožňuje separaci buněk bez poškození buněčné integrity nádorových buněk a umožňuje následnou molekulární analýzu. Další novou technikou založenou na protilátkách je epiteliální imunospot (EPISPOT), který je adaptací testu imunospotu spojeného s enzymy. Tento test je vysoce citlivý a detekuje pouze životaschopné buňky s exkrecí proteinů. U karcinomu prostaty test EPISPOT detekoval cirkulující nádorové buňky u 65% lokalizovaných a metastazovaných pacientů. Pacienti se systémovým onemocněním vykazovali signifikantně zvýšený počet CTC (Alix-Panabières, 2007).

**Tab. 5 Prezentace laboratorních metod používaných v molekulárně genetických testech CTC.**

(Informace byly převzaty a upraveny dle Soekoj, 2018; Khodakov, 2016; Furrer, 2015)

Metoda	Popis	Výhody	Nevýhody
<p>PCR RT-PCR qPCR -Polymerázová řetězová reakce v modifikacích</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Metoda založená na exponenciální amplifikaci cílové DNA;</li> <li>-relativní kvantifikace cílových sekvencí DNA prostřednictvím monitorování amplifikačního procesu v reálném čase</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rychlá a kvantitativní analýza amplifikace genu;</li> <li>- jsou vyžadována malá množství fragmentů DNA;</li> <li>- flexibilní, nákladově a časově efektivní technika;</li> <li>- dynamický rozsah a přesná kvantifikace;</li> <li>- vysoká molekulární citlivost</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Nelze získat informace o morfologii;</li> <li>- přesné číslo CTC nelze odhadnout;</li> <li>- Fragmentace RNA; nelze provádět vysoce multiplexované testy</li> </ul>
<p>NGS- next generation sequencing (sekvencování nové generace)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Vysoce výkonné sekvenování s následným mapováním a počítáním sledované sekvence k určení absolutního nebo relativního počtu kopií</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Identifikace velkých i malých genových změn (bodové mutace, translokace, inzerce / delece);</li> <li>- vhodné pro analýzu a diagnostiku nukleových kyselin vyžadující multiplexovanou analýzu mnoha genů a jejich variant</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Vysoká vnitřní míra chyb způsobená nejednoznačností signálu, nepřesností enzymů, nedokonalou detekcí;</li> <li>- chyby sekvenování komplikují detekci variant, zejména těch s nízkou frekvencí</li> </ul>
<p>(F)ISH - fluorescenční in situ hybridizace</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hybridizace značené nukleotidové sekvence na komplementární cílové sekvenci RNA nebo DNA</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lze použít na DNA a RNA; studium amplifikace, delece, variací počtu kopií (CNV) a / nebo přeskupení genů;</li> <li>- schopnost vizualizovat genomické změny;</li> <li>- stejný vzorek by mohl být použit pro opakované zobrazování pro různé chování genů;</li> <li>- vysoká citlivost;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Časově náročné;</li> <li>- drahé vybavení pro detekci a rozpoznávání signálu;</li> <li>- obtížné integrovat do rutinní diagnostické laboratoře;</li> <li>- požadavek na dobře vyškolený personál;</li> <li>- heterogenitu inratumorovou nelze detekovat;</li> </ul>
<p>CGH - komparativní genomová hybridizace</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hybridizace značené nukleotidové sekvence na komplementární cílovou sekvenci RNA nebo DNA;</li> <li>- Porovnání testovaného vzorku a referenčních vzorků;</li> <li>- schopnost poskytovat informace o genomech o změnách počtu kopií; podíl každého chromozomu</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- detekce velkých aberací;</li> <li>- schopnost posoudit změny počtu kopií v celém genomu;</li> <li>- analýza celého genomu;</li> <li>- vysoké rozlišení</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Drahé;</li> <li>- požadavek na vzdělaný personál;</li> <li>- nikoli standardní metodika</li> </ul>



## 2 Cíl práce

Cílem práce je zhodnotit možnosti medicínsky efektivního skríníngu záchytu tumorů ledvin porovnáním jednotlivých vyšetřovacích metod při primárním zjištění nádoru ledviny jako jsou ultrazvuk, počítačová tomografie a magnetická rezonance. Hodnocen byl soubor pacientů, kteří byli operováni na Urologické klinice FN Královské Vinohrady v období květen 2011 až květen 2016, u kterého byl hodnocen důvod pro primární vyšetření, které následně vedlo k zjištění nádoru ledviny a proporcionální zastoupení jednotlivých stádií onemocnění podle typu záchytu (náhodný nález vs. při symptomech nádoru ledviny). Současně bylo cílem identifikovat skupiny pacientů, které by maximálně profitovaly ze zavedeného skríníngu.

Dalším cílem práce bylo zhodnotit soubor operovaných pacientů, u kterých jsme provedli odběr periferní žilní krve na přítomnost cirkulujících nádorových buněk (CTC). Odběr periferní krve na přítomnost CTC by měl být prováděn ve 4 časových bodech: 1. před operací, 2. 4.-10. den po operaci, 3. cca 6 týdnů po operaci a 4. 6-12 měsíců po operaci. Po odběru krve bude populace sporadických CTC obohacena pomocí metody založené na velikosti buněk. CTC budou kultivovány in vitro. Po kultivaci (3-5 dnů) budou CTC hodnoceny pomocí cytomorfoloické a molekulární analýzy:

### 1. Cytomorfoloická analýza CTC (vitální fluorescenční mikroskopie)

- Vyhodnocení počtu CTC, přičemž CTC buňky jsou charakterizovány velikostí jádra, nepravidelností jaderné membrány, přítomností viditelné cytoplasmy, přítomností prominentních jadérek a jejich počtem a vysokým jaderným cytoplasmatickým poměrem
- Bude hodnocena CTC metabolická aktivita pomocí zhodnocení přítomnosti aktivních mitochondrií a mitochondriální sítě

### 2. Analýza genové exprese obohacených CTC

- Testovány jsou vybrané tumor – asociované geny jak v populaci obohacených CTC , tak ve frakci bílých krvinek pro jednotlivé pacienty.

Cílem je určit přítomnost CTC buněk v krvi pacientů s nádory ledvin, zhodnotit počty CTC dle velikosti nádoru a jednotlivých histoloických typů a zhodnotit, zda může průkaz CTC napomoci k cílenému nastavení léčby v případě pokročilých stádií nádorů ledvin a zároveň jestli má vyšetření potenciál stát se vyšetřením používaným při určení stádia onemocnění renálním karcinomem a při sledování pacientů po operacích v rámci restagingu.

## 3 Pacienti a metody

### 3.1 Epidemiologická studie

Renální karcinom je třetí nejčastější urologická malignita. V době stanovení diagnózy má zhruba 30 % pacientů metastatický proces. Vzhledem k rezistenci na ozáření a chemorezistenci je prognóza těchto pacientů špatná (Negrier, a další, 1998). Asi u 25 % pacientů po operaci pozorujeme relaps onemocnění (Mitchell, a další, 2018). U pacientů s lokálně pokročilým nebo metastatickým RCC pětileté relativní přežití 72.4 % respektive 13.9 % (Jung, a další, 2015). Jediná léčebná možnost i lokalizovaného RCC- je kompletní odstranění nádoru, naproti tomu u lokálně pokročilého nálezu je nefrektomie pouze paliativním řešením.

U všech typů renálních karcinomů se prognóza zhoršuje se zvyšujícím histopatologickým gradem. Pětileté přežívání (OS) je pro všechny RCC 49%, přičemž došlo k zvýšení nejspíše díky zvýšení náhodně zjištěných RCC (Wahlgren, a další, 2013) a zřejmě též po zavedení léčby tyrosin kinázami (TK) (Li, a další, 2016).

#### **3.1.1 Soubory vyšetřovaných pacientů v epidemiologické studii Vlastní soubor diagnostický a vlastní soubor operovaných pacientů v období 2011 – 2016.**

V období od května 2011 do května 2016 bylo pro patologický nálezu ledviny na Urologické klinice Fakultní nemocnice Královské Vinohrady (FNKV) operováno celkem 569 pacientů. Do studie bylo zařazeno 471 pacientů. Z výzkumu byli vyřazeni pacienti s benigními afekcemi (Mitchell, a další, 2018) , benigními nádory (Tahbaz, Schmid, & Merseburger, 2018), metachronně zjištěnými nádory ledvin (Patard, Rodriguez, Rioux-Leclercq, Guillé, & Lobel, 2002) a s uroteliálními karcinomy (Jayson & Sanders, 1998) vzhledem k výrazně odlišné symptomatologii. Sběr dat probíhal retrospektivně na Urologické klinice FNKV a klinická data byla získána ze zdravotní dokumentace a z databáze UNIS (Univerzální nemocniční informační systém) nemocničního systému FNKV. Hodnotili jsme důvod vyšetření dle klinických obtíží a typ prvotního vyšetření (ultrazvuk, počítačová tomografie, magnetická rezonance).

Výzkum byl schválen Etickou komisí Fakultní nemocnice Královské Vinohrady v Praze dne 4. 9. 2019, jednací číslo EK-VP/55/0/2019.

Mezi vyšetřovanými bylo 304 (64,5 %) mužů. Průměrný věk v této skupině byl 64 let (95 % CI: 63-65) let. Průměrná hodnota BMI byla 28.5 (95% CI: 28-29).

Hodnoceno bylo celkem 471 (100 %) pacientů s patologickým nálezem ledviny, z toho bylo 347 (73,7 %) případů incidentálních a 77 (16,3 %) symptomatických, u 47 (9,9 %) pacientů nebylo možno odlišit symptomatický od asymptomatického průběhu.

**Tab. 6 Základní demografické údaje**

Parametry		Stádium		Celkem (N=471)
		I+II (N=285)	III+IV (N=152)	
Pacienti	% (95% CI)	60,5 (55,9-65)	32,3 (28,1-36,7)	
Muži	% (95% CI)	63,5 (57,8-68,9)	30,3 (25,1-35,8)	64,5 (60-68,9)*
Ženy	% (95% CI)	55,1 (47,2-62,8)	35,9 (28,7-43,7)	35,5 (31,1-40)*
Věk (roky)	Průměr (95% CI)	63,3 (62,0-64,6)	65,3 (63,6-66,9)	64,0 (63,0-65,0)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	Průměr (95% CI)	28,4 (27,8-29,0)	28,7 (27,8-29,6)	28,5 (28,0-29,0)
antihypertenzíva	% (95% CI)	67 (61,2-72,5)	70,7 (62,7-77,8)	68,7 (64,2-72,9)*
BMI (≥25 kg/m <sup>2</sup> )	% (95% CI)	70,3 (63,9-76,1)	74,2 (65,6-81,6)	75,8 (71,2-80)*

\* p – 0,0001

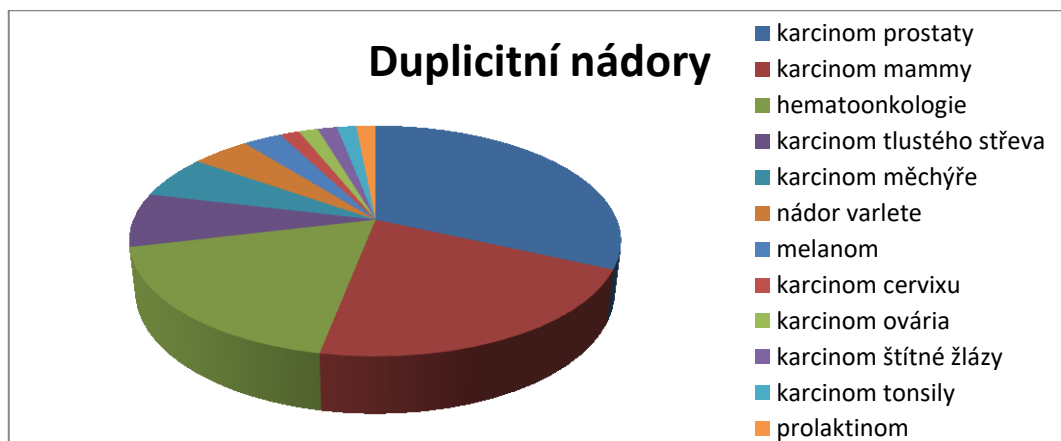
### **3.1.2 Hodnocení diagnostických metod v iniciální diagnostice nádorů ledvin u pacientů operovaných v období 2011-2016.**

Duplicitní nádor byl zjištěn u 55 pacientů v celém souboru. Nejčastějším duplicitním nádorem v našem souboru byl karcinom prostaty u 21 pacientů, karcinom mammy u 14 pacientek, hematoonkologické onemocnění u 12 pacientů, karcinom tlustého střeva u 5 pacientů, karcinom močového měchýře u 4 pacientů, nádor varlete u 3 pacientů, maligní melanom u 2 pacientů. Po jednom pacientovi byl zaznamenán karcinom děložního čípku, karcinom ovaria, karcinom štítné žlázy, karcinom tonsily a prolaktinom. Důležitým faktem je, že nádor ledviny byl zjištěn u 47 pacientů na základě stagingových vyšetření v rámci sledování pro jiné maligní onemocnění. U čtyř pacientů byla zaznamenána triplicita.

V našem souboru jsme se zabývali i důvodem vyšetření u incidentálních nálezů nádorů ledvin, kterých bylo 347. V rámci odborností, které stály za objevením asymptomatického nádoru ledviny dominovali urologové, kteří objevili nádor ledvin u 100 případů. Další odbornost, která se významnou měrou podílela na odhalení nádoru ledvin byli onkologové s 60 záchyty nádorů ledvin, kteří diagnostikovali onemocnění v rámci pravidelného vyšetřování při sledování pro jiné onkologické onemocnění. Internisti a kardiologové odhalili 44 nádorů. Gastroenterologové a chirurgové odhalili dalších 22 nádorů ledvin. Obrázek číslo 8 vyjadřuje grafické vyjádření odborností

podílejících se na odhalení incidentálních nádorů ledvin. Tabulka 6 zaznamenává symptomy, pro které byli pacienti vyšetřeni a toto vyšetření vedlo poté k incidentálnímu zjištění nádorů ledvin.

**Obr. 7** Proporcionální zastoupení duplicitních nádorů.



**Obr. 8** Důvody vyšetření incidentálních nádorů ledvin v sledovaném souboru pacientů podle odborností.



**Tab. 7 Symptomy zaznamenané v průběhu iničiálního vyšetření pacientů, které vedlo k incidentálnímu zjištění nádorů ledvin.**

Typ symptomů u incidentálních pacientů (N= 347)	N	% pacientů
Vyšetření či sledování benigní hyperplazie prostaty	74	21,33
Vertebrogenní algický syndrom	10	2,88
Hypertenze	9	2,59
Bolesti břicha a podbřišku	9	2,59
Ledvinová kolika	7	2,01
Vyšetření či sledování cystické léze ledviny	6	1,72
Infekce močových cest	5	1,44
Biliární obtíže, cholecystitida	4	1,12
Trauma, autonehoda či úraz	4	1,12
Diabetes mellitus	4	1,12
Kašel a dušnost	4	1,12
Obstipace	2	0,57
Disekce aorty	2	0,57
Bolesti hlavy	2	0,57
Varikokéla	1	0,29
Stresová inkontinence	1	0,29
Hiatová hernie	1	0,29
Vředová choroba	1	0,29
Virtuální kolonoskopie	1	0,29
Ileus	1	0,29
Vyšetření před plastikou kýly	1	0,29
Hydronefróza	1	0,29
Erysipel	1	0,29
Flebotrombóza	1	0,29

### 3.1.3 Statistické zpracování

Studie byla provedena jako případové křížení. Karcinomy zjištěné ultrazvukovou metodou byly považovány za časné případy, zatímco karcinomy odhalené jinou metodou byly pozdními případy. Poměr pravděpodobnosti získaný z podmíněné binární logistické regrese byl použit k podpoře nebo odmítnutí nulové hypotézy rovnosti časných a pozdních případů.

Kontinuální a kategorické cílové parametry byly popsány s aritmetickým průměrem, respektive proporci, včetně dvoustranného intervalu spolehlivosti. Proporce byly statisticky vyhodnoceny s chi-kvadratickým testem pro vícenásobné srovnání nebo s Fisherovým přesným testem pro srovnání dvou skupin. Diference mezi podskupinami z hlediska věku a BMI byly, vzhledem k ověření normality, analyzované t-testem.

Velikost souboru sledovaných subjektů (N=471) byla dostatečná pro podmíněnou binární logistickou regresi s 98% výkonem testu. Všechny testy byly oboustranné a hladina významnosti byla stanovena na 0,05. Statistické analýzy byly provedeny pomocí programu Prism 8 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, California, USA) and STATA version 15.1 software (StatCorp, Lakeway Drive, Texas, USA).

## 3.2 Materiál a metody ve studii CTC

V této části práce podrobněji popisují data, která byla zpracována a publikována v článku *Klezl P a kol. Detection of Circulating Tumor Cells in Renal Cell Carcinoma: Disease Stage Correlation and Molecular Characterization, který je v plném znění uveden v práci jako příloha* (Klezl, a další, 2020).

### 3.2.1 Pacienti

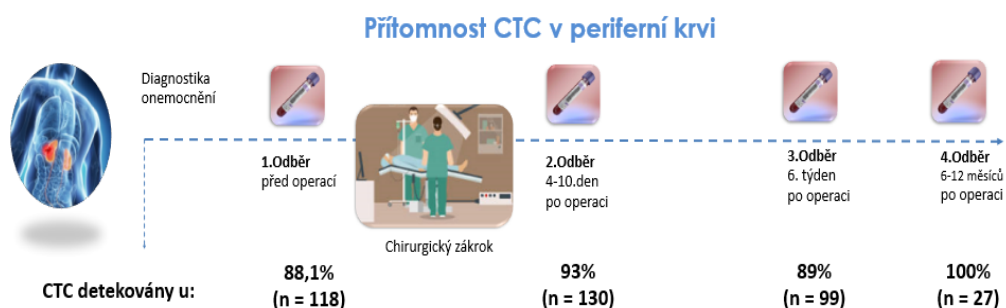
Do studie bylo v letech 2016–2018 zařazeno celkem 186 pacientů ( $n = 186$ ), kteří podstoupili chirurgickou renální resekci z důvodu přítomnosti nádorové tkáně, resp. suspektní nádorové hmoty. Periferní krev (2x8 ml, EDTA) byla pacientům odebrána v několika časových bodech: 1. před operací, 2. do 24 hodin po operaci, 3. ve 2 týdnech sledování po operaci, 4. při sledování každých 6 měsíců (Obr. 9). Hodnocení pacienti měli odběr nejméně 2 krevních vzorků. Celkem bylo provedeno 495 CTC testů. Test CTC byl založen na vyhodnocení biologických replikátů 2 odběrové zkumavky krve = 2 CTC testy).

Do studie bylo zařazeno 186 pacientů s diagnózou RCC a v souladu s Helsinskou deklarací bylo studii uděleno schválení etické komise. Všichni pacienti byli kandidáty na chirurgickou léčbu. Před odběrem krve a shromážděním klinických údajů byl od každého pacienta získán informovaný souhlas. Charakteristiky pacientů jsou uvedeny v tabulce 7. U každého pacienta bylo odebráno přibližně 2 x 8 ml žilní krve z kubitálních žil a umístěno do zkumavek s EDTA (Vacurette, Německo) obsahujících 1,6 mg EDTA / ml krev jako antikoagulantu. Vzorky byly zpracovány při pokojové teplotě pomocí izolačního postupu v průběhu 24 hodin po odběru krve.

### 3.2.2 Izolace CTC

K obohacení CTC byl aplikován separační protokol založený na velikosti buněk (z angl. Size-Based separation) a separační kolona MetaCell<sup>®</sup> (Kološtová, 2015; Kolostova, 2016; Čegan, 2014, Kološtová; 2016). Přítomnost CTC je hodnocena na základě cytomorfologických parametrů jednotlivých buněk zobrazených vitální fluorescenční mikroskopií, po které může následovat molekulární testování (např. qPCR analýza, sekvenování) nebo standardní imunohistochemie.

Obr. 9 Schéma odběrů krve.



Obohacování a kultivace CTC: Pro životaschopné obohacení CTC z periferní krve byla použita separační metoda založená na velikosti MetaCell<sup>®</sup>. (Kološtová, 2015; Kolostova, 2016; Čegan, 2014). Komplex separačního membránového filtru, který je držen v plastovém kruhu, může být přenesen přímo s obohacenými buňkami do šestijamkové kultivační destičky, k filtru jsou přidány 4 ml RPMI média a obohacené buňky jsou kultivovány na membráně *in vitro* za standardních podmínek buněčné kultury (37°C, 5 % atmosféra CO<sub>2</sub>) a pozorovány pomocí inverzního světelného mikroskopu. CTC jsou kultivovány v RPMI médiu obohaceném o FBS (10 %) po dobu minimálně 3-5 dnů. Pod separační membránu lze umístit mikroskopické sklíčko a CTC mohou přirozeně invazivně růst a na mikroskopickém sklíčku mohou být vytvořeny nové buněčné kolonie. Pokud je plánována imunohistochemická/imunofluorescenční analýza, jsou mikroskopická sklíčka výhodou.

**Tab. 8 Charakteristika souboru pacientů ve vztahu k CTC vyšetření**

CTC u jednotlivých typů nádoru	CTC Pozitivní		CTC Negativní		Celkem vyšetření (N)	Pacientů (N)
	Vyšetření (N)	%	Vyšetření (N)	%		
Světlobuněčný RCC	270	85,99	33	14	314	119
Papilární RCC	56	84,85	7	15,15	66	22
Světlobuněčný a papilární RCC	11	84,62	2	15,38	13	4
Chromofóbní RCC	19	76,00	4	24	25	8

**Tab. 9 Průměr primárního tumoru ve vztahu k pozitivnímu CTC-vyšetření**

	Průměr primárního tumoru (mm)	Počet hodnocených tumorů (N)
Průměr	49,3	168
CTC pozitivní	50,08	137
CTC negativní	34,9	20
CTC-nehodnoceno	65,81	11

**Tab. 10 CTC – pozitivita jednotlivých typů odběru včetně dělení dle histologie.**

CTC	Typ nádoru	CTC pozitivní		CTC negativní		Nehodnoceno	Celkem (N)
		Pacienti (N)	%	Pacienti (N)	%		
1. odběr	Světlobuněčný RCC	21	75,00	5	17,86	2	28
	Papilární RCC	13	68,42	4	21,5	2	19
2. odběr	Světlobuněčný RCC	27	96,43	1	3,57		28
	Papilární RCC	18	94,74	1	5,26		19
3. odběr	Světlobuněčný RCC	24	85,71	4	14,29		28
	Papilární RCC	18	94,74			1	19
4. odběr	Světlobuněčný RCC	28	100				28
	Papilární RCC	18	94,74	1	5,26		19

**A. Izolace CTC:**Přístrojové vybavení, pomůcky a chemikálie:

- MetaCell® (MetaCell, Ostrava, Česká republika)
- RPMI-1640 (R medium) (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika)
- R + medium (příprava SOP č. 5) složené z:
  - Amphotercin (250 µg/ml) (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika)
  - Fetální bovinní sérum (FBS) (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika)
  - Penicillin-Streptomycin (Penicillin 10 Units – Streptomycin 10 mg/ml) (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika)
- RPMI 1640 (R medium) (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika)

Místo výkonu práce: laminární box



### 3.2.3 Cytomorfologická analýza CTC

Životaschopné buňky obarvené vitálními fluorescenčními barvami (Celltracker™, NucBlue™, Mitotracker™, Thermofisher, U.S.) byly analyzovány pomocí fluorescenční mikroskopie ve třech krocích: (1) skríníng při zvětšení x20 k lokalizaci buněk, (2) pozorování při zvětšení x60 pro podrobnou cytomorfologickou analýzu. Izolované buňky a / nebo klastry požadovaných buněk byly vybrány, digitalizovány a vyšetřeny zkušeným odborníkem-cytologem a/nebo patologem. (3) pro vyhodnocení počtu CTC byly CTC definovány jako buňky vykazující tyto vlastnosti: a) jaderná velikost rovnající se nebo větší než 15  $\mu\text{m}$ ); b) nepravidelnost jaderné membrány c) přítomnost viditelné cytoplazmy a velikost buňky; d) přítomnost prominentních jadérek a jejich počet; e) vysoký jaderný cytoplazmatický poměr. Poměr jádra/cytoplazmy (N/C) se vyhodnocuje s ohledem na rozdílnou morfologii rostoucích buněk ve srovnání s poměrem N/C ve vzorcích tkání.

Cytopatologická analýza zahrnuje proces:

**A. Vizualizace CTC** – hodnocení probíhá pomocí vitální fluorescenční mikroskopie

Přístrojové vybavení, pomůcky a chemikálie:

- Fluorescenční mikroskop, Olympus IX51.
- CellTracker™ Green CMFDA (Life Technologies, Eugene (OR), USA) (uchovávat v mrazícím boxu při -5 až -30 °C)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Penta, Praha, Česká republika)
- NucBlue® Live ReadyProbes® Reagent (Life Technologies, Eugene (OR), USA) (uchovávat v temnu při laboratorní teplotě) R37605
- RPMI-1640 (R medium) (Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika)
- Zkumavka eppendorf (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)

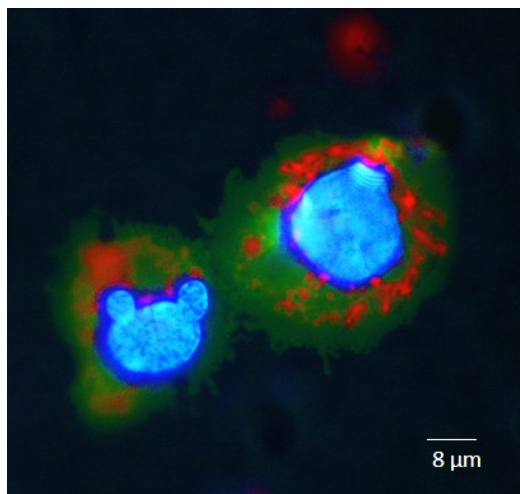
**Obr. 10 CTC zachycené na separační membráně s póry o velikosti 8  $\mu\text{m}$ .**

*(CTC jsou pozorovány v procházejícím světle a obarvené vitálními fluorescenčními barvami; Celltracker™ -zelená, NucBlue™ - modrá).*



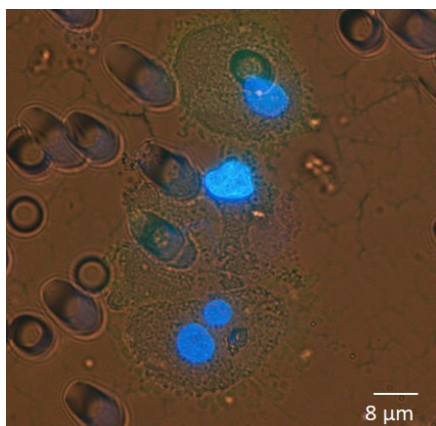
**Obr. 11 Živé CTC zachycené na separační membráně**

(CTC obarvené vitálními fluorescenčními barvami; Celltracker™ -zelená, NucBlue™ - modrá, Mitotracker™ - červená) byly analyzovány pomocí fluorescenční mikroskopie.)



**Obr. 12 Živé CTC zachycené na separační membráně s póry o velikosti 8 μm**

(CTC obarvené vitálními fluorescenčními barvami (Celltracker™ -zelená, NucBlue™ -modrá) byly analyzovány pomocí fluorescenční mikroskopie, foceno v průchozím světle. V buňkách lze pozorovat nepravidelný tvar jaderné membrány (buňka ve středu) a taky dělicí se jádro (buňka dole).)



Na základě standardních imunohistochemických protokolů byla v buňkách zachycených na membránách testována přítomnost cytokeratinu a vimentinu. Membrány byly fixovány vzduchem nejdříve alespoň na 24 hodin. Jako další krok byl použit imunohistochemický protokol následujícím způsobem. Byly použity dva klony protilátek pancytokeratin (SigmaAldrich) a vimentin (Sigma Aldrich)

### 3.2.4 Analýza genové exprese CTC

Pro stanovení molekulárního profilu CTC bude použit panel genů asociovaných s tumory (tzv. tumor asociované geny) a genů asociovaných s chemorezistencí. Geny jsou do panelu vybrány na základě standardních postupů diferenciální diagnostiky v cytopatologii při určování typů tumorů s neznámým původem. Genová exprese cytokerinů KRT5, KRT7, KRT18, KRT19 je analyzována v kombinaci s expresí EPCAM, MUC1, CD24, CD44, CD45, CD68, CD274, WT1, VIM, VEGF, VEGFR a HER2 a podobně). Pro skupiny genů asociovaných s chemorezistencí jsou vybrány geny superrodiny ABC transportérů: MRP (MRP 1,2,4,5,7), MDR1, dále testování přítomnosti DNA excizního reparačního proteinu ERCC1a ribonukleotid reduktáz: RRM1 a RRM2.

Molekulární profil informuje o aktuálním stavu receptorů na CTC, což umožňuje směřovat onkologickou léčbu, včetně chemoterapeutické, téměř cíleně. Onkolog získává informace o CTC z období před zahájením léčby, takže může pracovat s informací o tzv. panenských, neboli „virgin“ CTC, spolu s údaji o molekulárních změnách na úrovni CTC.

Proces testování genové exprese zahrnuje:

#### **A. IZOLACE RNA - RNeasy Mini Kit (Qiagen)**

##### **Přístrojové vybavení, pomůcky a chemikálie:**

- Centrifuga Eppendorf Minispin plus (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- 96 % Ethanol p.a. (Penta, Praha, Česká republika)
- $\beta$ -merkaptoethanol (VWR Prolabo, Radnor (PA), USA)
- NanoDrop (ThermoScientific, Wilmington (NC), USA)
- Pipety, špičky
- RNeasy® Mini Kit (250) (Qiagen, Valencia (CA), USA)

**Místo výkonu práce:** laboratoř

#### **B. MĚŘENÍ KONCENTRACE RNA, přečištění RNA**

##### **Přístrojové vybavení, pomůcky a chemikálie:**

- NanoDrop (ThermoScientific, Wilmington (NC), USA)
- Pipeta, špičky, laboratorní ubrousky

**Místo výkonu práce:** laboratoř pre- PCR

### **C. REVERZNÍ TRANSKRIPCE (příprava cDNA)**

#### **Přístrojové vybavení, pomůcky a chemikálie:**

- BiometraT Advanced Thermal Cycler
- My Fuge Mini<sup>TM</sup> centrifuge
- Pipety, špičky, 200 µl zkumavky
- High Capacity RNA-to-cDNA<sup>TM</sup> Kit (AppliedBiosystems<sup>TM</sup>)
- RNA
- RNase free voda

**Místo výkonu práce:** laboratoř pre- PCR

### **D. KVANTITATIVNÍ PCR v REÁLNÉM ČASE (Real-time PCR)**

#### **Přístrojové vybavení, pomůcky a chemikálie:**

- Pipety, špičky, 200µl zkumavky, 1,5ml zkumavky, laboratorní ubrousky
- 96 jamková PCR destička
- Centrifuga Benchmark My fuge Mini (BenchmarkScientific (NJ), USA)
- TaqMan<sup>®</sup> Fast Advanced Master Mix (ThermoFisherScientific, USA)
- Free RNA voda
- Analyzátor Cobas z 480 (RocheDiagnostics, USA)
- Real-time PCR sondy
- Folie LightCycler<sup>®</sup> 480

**Místo výkonu práce:** laboratoř PCR

### **E. STATISTICKÁ ANALÝZA**

Statistická analýza získaných dat (analýza genové exprese, apod.) je provedena pomocí statistického softwaru GenEx vs. 5 (MultiD, Švédsko), který obsahuje speciální analytickou platformu pro hodnocení qPCR výsledků přímo z qPCR - analyzátorů. Pro srovnávání dopadu přítomnosti CTC v jednotlivých skupinách pacientů bude hodnocen DFS, (definován jako doba po léčbě, kterou pacient přežije bez příznaků onemocnění), TTP (definován jako doba mezi plánovanou terapií a progresí, definovanou podle RECIST kritérií). V korelaci s CTC-přítomnosti a předpověděnou chemosenzitivitou může být použita Kaplan-Meierova produkt limitující metoda, rozdílné prognostické skupiny budou porovnávány použitím Log -rank testu. Statisticky signifikantní hodnotou je  $p < 0.05$

## 4 Výsledky

### 4.1 Epidemiologická studie

Z analýzy demografických dat je patrné, že rozložení jednotlivých stádií detekovaných nádorů je u mužů i žen velmi shodné. Výskyt časných a pozdních stádií nebyl závislý na pohlaví, BMI ani užívání antihypertenzivní medikace. Častěji však pozorujeme záchyt nižších stádií onemocnění.

Z Tab. 11 vyplývá, že nejčastěji byl proveden záchyt karcinomu pomocí UZ a CT. Signifikantním nálezem pak bylo, že náhodný záchyt dominoval v časném stádiu a naopak symptomatický v pozdním stádiu. Výskyt jednotlivých karcinomů nebyl na časném a pozdním stádiu závislý; dominoval světlobuněčný z 80 % a z 10 % papilární, ostatních 10 % byly nádory chromofóbní, onkocyty, sarkomy a jiné.

**Tab. 11** Typ vyšetřovací metody a význam detekce časného a pozdního stádia onemocnění, typ histopatologického nálezu karcinomu a jeho závislost na pokročilosti stádia onemocnění.

Stádium		I+II (N=285)	III+IV (N=152)	Celkem (N=471)
Charakteristiky		% (95% CI)	% (95% CI)	% (95% CI)
Metoda	UZ	52,6 (46,7-58,5)	48 (39,9-56,3)	50,7 (46,1-55,3)
	CT	40 (34,3-45,9)	43,4 (35,4-51,7)	41,8 (37,3-46,4)
	MRI	0,7 (0,1-2,5)	0,7 (0,0-3,6)	0,6 (0,1-1,9)
	Neznámo	6,7 (4,1-10,2)	7,9 (4,1-13,4)	6,6 (4,5-9,2)
Důvod	Náhodný nález	83,5 (78,7-87,6)*	52,6 (44,4-60,8)*	73,7 (69,4-77,6)
	Symptomatické	7,4 (4,6-11)*	35,5 (27,9-43,7)*	16,3 (13,1-20)
	Neznámo	9,1 (6,0-13,1)	11,8 (7,2-18,1)	10 (7,4-13)
Karcinom	Světlobuněčný RCC	81,4 (76,4-85,7)	88,2 (81,9-92,8)	78,3 (74,3-82)
	Papilární RCC	11,9 (8,4-16,3)	6,6 (3,2-11,8)	9,6 (7,1-12,6)
	Onkocytom	0 (0,0-1,3)	0 (0,0-2,4)	5,9 (4,0-8,5)
	Chromofóbní RCC	3,9 (1,9-6,8)	4,6 (1,9-9,3)	3,8 (2,3-6)
	Sarkom	0,4 (0,0-1,9)	0 (0,0-2,4)	0,4 (0,1-1,5)
	Ostatní	2,5 (1,0-5)	0,7 (0,0-3,6)	1,9 (0,9-3,6)

\*)  $P < 0,0001$  (statistická významnost mezi stádii)

Z výsledků statistické analýzy a dat v tabulce č. 12 vyplývá, že incidentální karcinomy zachycené vyšetřením pomocí UZ, tj. zachycené incidentálně, jsou četnější

ve stádiu I (OR=1,57 (1,20-2,05), p = 0,001) a dále v podskupině pacientů ve stádiu I+II (OR=1,56 (1,20-2,02) p = 0,001). Diference ve stádiu III+IV nebyla statisticky významná.

Při celkovém hodnocení všech pacientů bez ohledu na stádium onemocnění je též patrné, že incidentální karcinomy zachycené pomocí UZ bývají čtenější než ostatní (OR=1,44 (1,17-1,79), p = 0,001).

**Tab. 12 Zobrazení záchytu nádorů ledvin na podkladě ultrazvuku, incidentální a symptomatické charakteristice onemocnění.**

Stadium	Nález	Ultrazvuk		OR (95% CI)	p
		n/N	% (95%CI)		
Celkem	Celkem	239/471	50,7 (46,1-55,3)	1,03 (0,86-1,23)	NS
	Incidentální	205/347	59,1 (53,7-64,3)	1,44 (1,17-1,79)	0,001
	Symptomatický	32/77	41,6 (30,4-53,4)	0,71 (0,45-1,12)	NS
I+II	Celkem	150/285	52,6 (46,7-58,5)	1,11 (0,88-1,40)	NS
	Incidentální	145/238	60,9 (54,4-67,2)	1,56 (1,20-2,02)	0,001
	Symptomatický	4/21	19,0 (5,4-41,9)	0,24 (0,08-0,70)	0,009
III+IV	Celkem	73/152	48,0 (39,9-56,3)	0,92 (0,67-1,27)	NS
	Incidentální	45/80	56,3 (44,7-67,3)	1,29 (0,83-2,00)	NS
	Symptomatický	27/54	50,0 (36,1-63,9)	1,00 (0,59-1,70)	NS

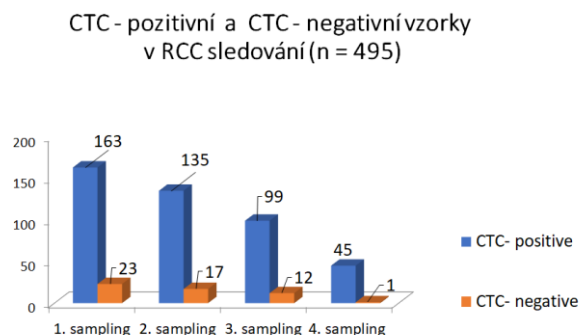
## 4.2 Výsledky CTC

### 4.2.1 Prevalence CTC buněk

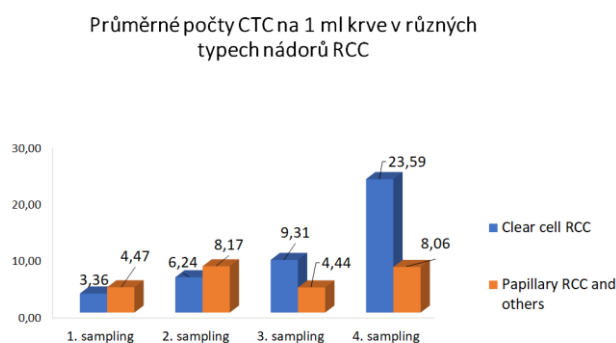
CTC byly detekovány nezávisle na pořadí odběru až u 86,7 % testovaných vzorků krve (N=495) u pacientů podstupujících chirurgický zákrok (Obr. 13). CTC byly detekovány u pacientů s nádory ledvin různých histologických typů. Průměrný počet CTC je mírně vyšší u světlobuněčného renálního karcinomu (ccRCC) několik měsíců po operaci, ve srovnání s papilárními RCC (Obr. 14).

Celkem 270 vzorků bylo testováno jako pozitivních u ccRCC, 36 vzorků bylo testováno jako pozitivních u papilárních RCC a 30 vzorků u jiných typů RCC.

**Obr. 13 CTC detekované u pacientů s RCC po dobu jednoho roku ve 4 krevních vzorcích.**  
(Celkem bylo vyhodnoceno 495 vzorků (v duplikátech), s průměrnou mírou pozitivitu CTC 86,6%.)



**Obr. 14 Počet CTC buněk (průměr na 1 ml krve) detekovaný u pacientů s RCC po dobu jednoho roku ve 4 krevních vzorcích, které ukazují rozdíly v zastoupení CTC mezi světlobuněčným RCC a ostatními typy RCC.**



#### 4.2.2 Cytomorfologické parametry CTC

Cytomorfologická analýza CTC se skládala ze dvou mikroskopických hodnocení ve dvou různých časových bodech (den 3 a 5 po obohacení a kultivaci in vitro), které poskytl 2 nezávislí hodnotitelé.

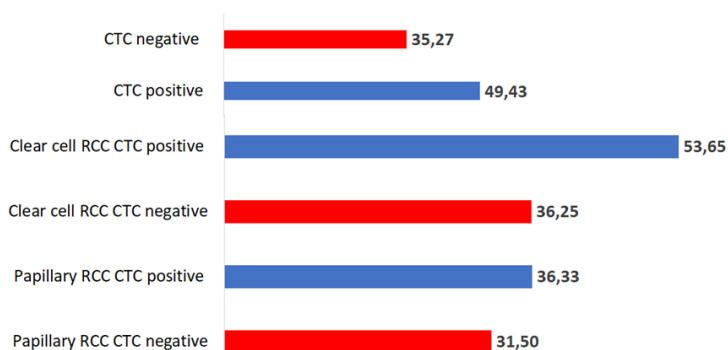
Průměrná velikost CTC pro skupiny světlobuněčných RK je  $24 \pm 6,3$ , průměrná velikost CTC pro skupinu rakoviny papilárního RK je  $22 \pm 3,4$  a pro ostatní typy je  $27 \pm 3,7$  mm.

Průměrné číslo CTC se zdvojnásobilo mezi 3. a 5. dnem, což odpovídá očekávání rychlosti růstu buněk (1. mikroskopické vyhodnocení = 4,18 buněk, 2. mikroskopické hodnocení = 7,93 buněk). Je vyšší pravděpodobnost detekce CTC s rostoucí velikostí nádoru (Obr. 15.), zejména v případech světlobuněčného RK.

Velikost nádoru odpovídá přítomnosti metastáz a pozitivitě lymfatických uzlin a CTC - aktivitě.

**Obr. 15 Vztah mezi velikostí nádoru a pozitivitou vyšetření CTC buněk.**  
(Největší průměr nádorů a nejvyšší hodnoty CTC byly zjištěny u světlóbuňčného RCC)

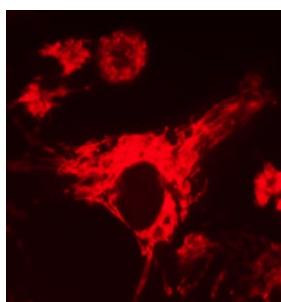
Průměrná velikost primárního nádoru (mm) a přítomnost CTC  
v různých podtypech nádoru



#### 4.2.3 Metabolická aktivita CTC

Metabolismus CTC byl hodnocen barvením mitochondrií, které umožnilo detekovat aktivní mitochondrie (Mitotracker Red H<sub>2</sub> ROS<sup>TM</sup>) včetně zajímavé mitochondriální sítě. Mitochondriální síť byla významně odlišná od mitochondriální sítě pozorované v buňkách s krevním původem (např. bazofily, monocyty, neutrofily). Krevní buňky a nádorové buňky mohou být snadno rozlišeny na základě přítomnosti velmi sofistikované mitochondriální sítě – hnízda (Obr. 16) Pro hodnocení mitochondriální sítě byl použitý automatizovaný postup vyhodnocování pomocí software Image J (National Institute of Health). Paralelní exprese cytokeratinu a vimentinu byla odhalena imunohistochemií, což naznačuje pokračující přechod epitelu k mesenchmálnímu fenotypu.

**Obr. 16 Výrazně aktivní mitochondriální síť v buňkách primárního tumoru RCC**  
(Kultivováno in vitro, barveno pomocí Mitotracker Red H<sub>2</sub>-ROS<sup>TM</sup>)



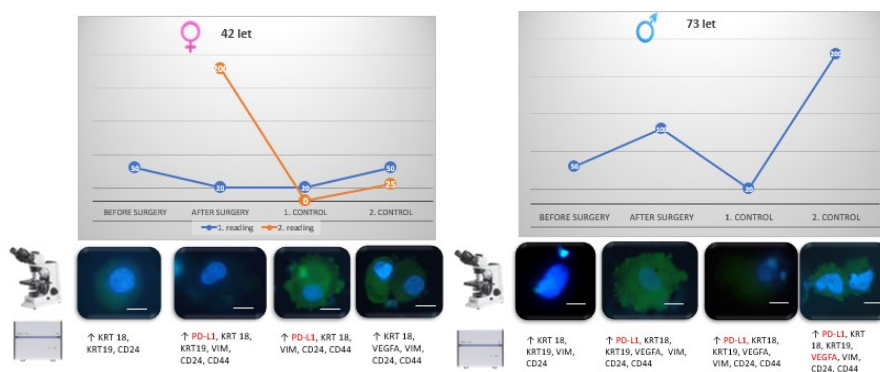


#### 4.2.4 Analýza genové exprese CTC

Analýza genové exprese odhalila zvýšenou expresi genů v obohacených CTC pro geny KRT18 (keratin 18), VIM (vimentin) ve srovnání s frakcí bílých krvinek (Obr. 15). Dále se ukázalo, že charakter CTC se během sledovacího období mění (Obr. 15). Z terapeutického hlediska byly nejzajímavější změny pozorovány u pacientů exprimujících zvýšený VEGF (vaskulární endoteliální růstový faktor) a / nebo PD-L1 (Programmed death ligand 1, CD274) na CTC. VEGF a PD-L1 jsou znázorněny na následných obrázcích (obr. 17 -19).

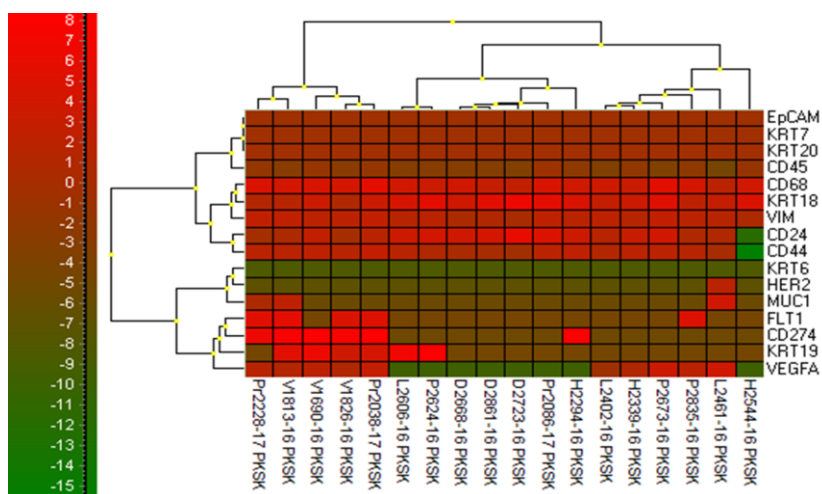
#### Obr. 17 CTC – sledování v průběhu jednoho roku u 2 pacientů (žena 43 let, muž 72 let).

(Prokazujeme změny během 4 odběrů nejen v počtu CTC (grafové linie) a cytomorfologii (foto, měřítko = 8 μm), ale také v genové expresi (viz zvýšené geny v CTC uvedeny pod grafem). Některé z genů se zvýšenou expresí by mohly být použity jako markery pro označení specifických terapeutických cílů (např. VEGF, PD-L1). Expres PD-L1 a VEGF je zobrazena červeně.)

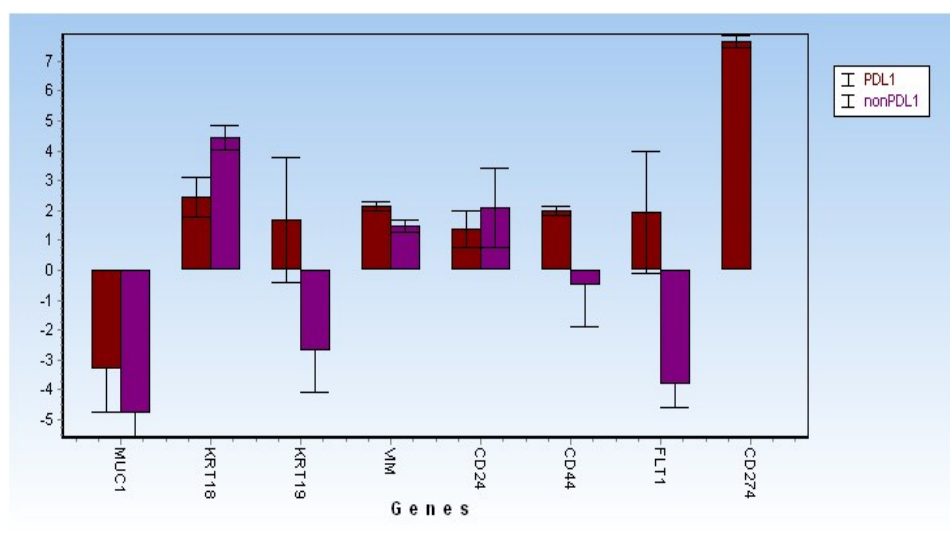


#### Obr. 18 Relativní množství RNA zobrazené v klastrech po analýze genové exprese pomocí softwaru GenEx vs. 6 (MultiD, Švédsko).

(Je zobrazen jasný rozdíl mezi CTC exprimujícími PD-L1; viz shluk šipek vlevo)



**Obr. 19 Analýza genové exprese CTC ukazující rozdíly mezi CTC PDL1 + (hnědá) a CTC PDL1- (fialová).**  
*(Šipky označují geny exprimované odlišně mezi testovanými skupinami.)*



## 5 Diskuze

V sledovaném souboru incidentálních pacientů jsme nejčastěji pozorovali záchyt nádorů ledvin u pacientů příchozích s mikčními potížemi s prostatou nebo indikovaných k preventivnímu vyšetření prostaty (až 22 % náhodných pacientů). Signifikantním nálezem bylo, že náhodný záchyt dominoval v časném stádiu karcinomu ledviny. Výskyt časných a pozdních stádií nebyl závislý na pohlaví, BMI ani na užívání antihypertenzní medikace. Náhodně zjištěné nádory ledvin v I. stádiu jsou zpravidla zjištěny pomocí ultrazvuku.

Dle našich výsledků a také ve shodě se zahraničními studii (Palsdottir, a další, 2012), bylo prokázáno, že bez ohledu na stádium onemocnění je zřejmé, že incidentální karcinomy ledviny zachycené pomocí UZ bývají četnější než ostatní typy solidních tumorů a proto by se tato metoda mohla osvědčit jako vhodná diagnostická metoda pro skrínig renálních karcinomů. CT je pak spíše uplatňována jako metoda detekce u symptomatických případů (cca.30 %) pro zpřesnění stadiu onemocnění.

Na téma včasné diagnostiky a skrínigu RCC bylo v posledních desetiletích publikováno relativně málo studií. I přesto, že RCC splňuje mnoho Wilsonových a Jungnerových kritérií pro vhodnost skrínigu, stále zde existuje řada otázek, které vyžadují další výzkum.

V korelaci s našimi daty německá metaanalýza založená na 25 studiích prokázala, že náhodně zjištěné RCC korelují s nižšími T-stadii a též, že jsou tyto nádory prokázány v nižším věku. V našem výzkumu se věk dle jednotlivých stádií významně nelišil, ale je patrný rozdíl průměrného věku ve stádiu I 63,4 (62,0-64,7) a ve stádiu III 65,3 (63,6-67,1). Z tohoto výsledku odhadujeme, že progresse karcinomu ledviny do pokročilejšího a klinicky manifestovaného onemocnění trvá minimálně 1,5- 2 roky.

Podobná retrospektivní studie provedena na Islandu od roku 1971 do roku 2005 zahrnovala pacienty s diagnostikovaným karcinomem ledvin, kde incidentálně diagnostikované karcinomy ledvin byly porovnány se symptomatickými nádory (Palsdottir, 2012).

Dle současných epidemiologických dat a ve shodě s našimi výsledky se při zvýšené incidenci a nezměněné mortalitě přežití pacientů zlepšilo. Přežití příznivě ovlivňuje náhodná detekce tumorů tím, že identifikuje častěji iniciální stadia. Navíc tato stadia u incidentálních nádorů mají lepší prognózu, než tatáž stadia u pacientů symptomatických (Palsdottir, a další, 2012).

V roce 1998 bylo ve Spojených státech amerických diagnostikováno 29 900 nových onemocnění karcinomem ledviny, 17 600 u mužů a 12 300 u žen, což prezentovalo asi 3 % všech nádorů. Úmrtí na metastatické onemocnění RCC bylo udáno u více než 11 000 pacientů a tento nepříznivý výsledek odráží významně horší prognózu než u ostatních urologických malignit. Ačkoliv současná data udávají pětileté nádor specifické přežívání kolem 60 %, což představuje významné zlepšení od 70. let, karcinom ledviny zůstává velmi smrtelným onemocněním a detekce nádoru ve vyšších stádiích onemocnění je velmi riziková stran prognózy (Chow, 1999).

Starke a kol., (2016) tuto teorii podpořili a vytvořili potencionální asymptomatickou rizikovou skupinu jedinců vhodných pro skrínig -  $\geq 50$  let, expozice tabáku (více jak 10 cigaret denně) a expozice karcinogenům z povolání ( $\geq 15$  let). Po 6,5letém sledování byl u 10 pacientů diagnostikován RCC, přičemž prevalence byla 1,1 %, což je téměř desetkrát vyšší než u neselektovaných skupin v obecné populaci

Problémem se zavedením plošného skrínigu u nádorů ledvin je relativně nízká incidence onemocnění v populaci, která dle výzkumu Mezinárodní agentury pro výzkum nádorových onemocnění (IARC) z roku 2018 činila zhruba 2,5 % z celkového počtu nově vzniklých nádorových onemocnění po celém světě (International Agency for Research on Cancer, 2020). Skrínigové vyšetření by mělo mít 100% specifitu, aby se zabránilo vysoké falešné pozitivitě a tím zbytečnému, drahému vyšetřování s možným

poškozením pacientů způsobeného vyšetřovacími nebo léčebnými výkony, které zachytí malé množství nádorů.

I když plošný skríníng je dosti finančně nákladný, prognóza nádoru závisí na čase primozáchytu. Ultrazvuk se jeví jako potencionálně nejlepší možná metoda skríníngu pro RCC. Jedná se totiž o plošně užívanou, levnou, neinvazivní techniku identifikace renálních lézí bez expozice ionizačního záření. UZ má menší sensitivitu a specificku ve srovnání s CT v rámci diagnostiky RCC, ale zůstává metodou první volby zejména z důvodu dostupnosti i na pracovištích nižšího typu. Záchyt nádoru ledvin je závislý na jeho velikosti. UZ má rozlišovací schopnost zjistit nádor vel. >3cm v 85-100 %, zatímco u velikosti ložiska 2-3 cm je toto číslo 67-82 % (Schmidt, a další, 2003). Obecným doporučením je u pacientů indikovaných k vyšetření UZ břicha doplnit toto vyšetření o UZ ledvin, zejména pokud se jedná o pacienty starší > 45 let (Reu & Rettenmaier, 1994). Ve Velké Británii a Švédsku jsou již programy skríníngu pomocí UZ zavedeny pro detekci aneurysmatu břišní aorty u mužů starších 65 let. Díky obdobné symptomatologii a v souvislosti se stejnými rizikovými faktory pro obě onemocnění by mohl být případně vytvořen i společný skríníng těchto dvou chorob (Wanhainen, a další, 2016).

Tsui a kol. (2000) hodnotili prognostický význam náhodně objevených nádorů u populace s vyšším věkem (průměr 62,6 let, převážně u mužů). I zde při náhodném zjištění byly nádory nižších stádií spojeny s lepšími léčebnými výsledky. Data Rodrigueze-Rubia a kol. (1996) potvrzují jasné spojení mezi náhodným zjištěním, lokalizovaného onemocnění a lepším přežíváním. K podobnému zjištění došli i Mihara a kol. (1999), kteří provedli skríníng u 219640 asymptomatických Japonců z populace ve věku 29-70 let v průběhu období 13 let. RCC byl detekován u 192 pacientů: 37,8 % nádorů bylo velikosti <25mm a jen 19,2 % velikosti >5 cm. RK u těchto pacientů se vyznačovaly výbornými výsledky stran přežití. Kumulativní pětileté přežití bylo 97,4% a desetileté 94,6%. Thompson a Peek (1988) referují, že 87 % incidentálně objevených nádorů ledvin bylo lokalizovaných ve srovnání se 42 % symptomatickými. Ve shodě s výše zmíněnou studií Konnacka a Grossmanna (1985) zjistili, že 86 % incidentálně zjištěných nádorů byly detekovány v I a II stadiu na rozdíl od 46 % symptomatických nádorů. V obou sestavách bylo pětileté přežívání statisticky signifikantně lepší u pacientů s incidentálně zjištěnými nádory. Výsledky metaanalýzy z poslední doby, shrnující data z 11 studií zaměřených na prevalenci RCC zjištěného skríníngovým UZ,

naznačují, že vyšetření celkové populace pomocí UZ zjistí 1-2 případy RCC na 1000 asymptomatických pacientů (Rossi, a další, 2017).

Každoroční vyšetření UZ břicha je indikované u pacientů s Von-Hippel Lindau chorobou, jelikož RCC se u těchto pacientů projeví cca v 70 % (Ljungberg, a další, 2019).

Další ohroženou skupinou pacientů jsou jedinci s ESRD (end stage renal disease), u kterých se riziko RCC oproti zdravé populaci zvyšuje 5-35x (Wong, Howard, Webster, Chapman, & Craig, 2011). Onemocnění vzniká v důsledku polycystózy ledvin a riziko se odvíjí v závislosti na délce hemodialýzy. Nejsou zatím důkazy podporující skrínig u této skupiny pacientů vzhledem k obecně krátké životní vyhlídce těchto pacientů (Singanamala & Brewster, 2011). Kidney Health Australia guideline doporučuje UZ-skrínig pouze u těch pacientů po transplantaci ledviny, u kterých je zvýšené riziko vzniku RCC; RCC v anamnéze nebo v rodině, analgetická nefropatie (Chadban, 2012).

V poslední době jsme svědky hlubšího porozumění onkogeneze nádorů ledvin na molekulární úrovni a pokroku ve výzkumu nových molekul na léčbu pokročilých stádií karcinomu ledviny, ale efekt léčby zatím nevede k vyléčení těchto pacientů. Z toho vyplývá, že karcinom ledvin je léčitelný pouze v případě lokalizovaného nálezu, který umožňuje jeho kompletní odstranění. Tento fakt je hlavním argumentem pro zavedení skrínigu nádorů ledvin, který by byl schopen diagnostikovat časná stádia onemocnění.

Do hodnocení pacientů s nádory ledvin se nedostala skupina nádorů ledvin, která byla referována na naše pracoviště pro generalizaci a bylo provedeno proto jen bioptické vyšetření ledviny s nádorem k ověření histologického typu nádoru a k určení další onkologické léčby (n = 11), pacienti s malým nádorem ledviny, kteří nebyli vzhledem k polymorbiditě indikováni k operačnímu řešení a nebylo proto provedena ani histologická verifikace popsaného nádoru (n = 3) a poslední skupinou byli pacienti, kteří podstoupili radiofrekvenční ablaci (RFA) po předchozím histologickém ověření pomocí ultrazvukem navigované biopsie (n = 2).

Jistou limitací studie může být fakt, že všichni pacienti byli léčeni v jednom uroonkologickém centru. Diagnostika pak byla provedena přímo v FNKV nebo byli pacienti odesláni spolupracujícími urology v regionu. Abychom však mohli mít celkový obraz o pacientech vyšetřených v rámci ČR, bylo by vhodné do dalších výzkumů zapojit i jiná centra a také nové diagnostické biomarkery, které tak postrádáme.

Jednou ze slibně se vyvíjejících skupin biomarkerů je tekutá biopsie, která zahrnuje vyšetření tělních tekutin, zejména periferní krve. V rámci periferní krve se vyšetřují jak cirkulující buněčné elementy nehematologického původu, tak cirkulující DNA s důrazem na nádorovou DNA.

Pouze málo studií publikovalo analýzu CTC u pacientů s RCC (Broncy & Paterlini-Bréchet, *Circulating Tumor Cells for the Management of Renal Cell Carcinoma*, 2018b). Detekce CTC obecně vyžaduje specifické techniky schopné překonat problémy spojené s identifikací a izolací nádorových buněk z krve. Ve skutečnosti neexistuje žádný specifický marker, který umožňuje jedinečně odlišit CTC od jiných krevních buněk, protože nádory s různými histologickými a molekulárními znaky exprimují různé vzorce markerů, a dokonce i jediný histologický typ nádoru může představovat heterogenní markery. Navíc, vzhledem k značně malému počtu CTC, které mohou být přítomny v periferní krvi ve srovnání s jinými krevními cirkulujícími buňkami, jsou pro zvýšení citlivosti na přijatelnou úroveň nezbytné techniky obohacování. Věříme, že pozorování buněk obohacených o velikost v životaschopném stádiu může pomoci rozlišit rakovinový charakter zachycených buněk ve srovnání se standardními cytomorfológickými parametry a navíc mitochondriální sítí tumorigenních vs. benigních buněk.

Intra-tumorální heterogenita je výrazným rysem RCC, jak dokládá několik skupin využívajících multiregionální sekvenování RCC nádorových a metastatických tkání ve srovnání se sekvenováním sousedící nenádorové ledvinové tkáně (Gerstung, 2012; Gerlinger, 2012). Rakovinové buňky pacientů s RCC jsou náchylné k mezenchymálnímu epiteliálnímu přechodu (EMT) (De Bono, 2008; Mandriota, 2002; Harten, 2009) a často postrádají epitelové antigeny, které mohou narušit jejich zachycení z krve a analýzy, pokud se použijí metody odběru / detekce závislé na epiteliálních markerech.

Například systém CellSearch, platforma schválená FDA, vykazoval velmi nízkou míru detekce u pacientů s lokalizovaným a metastatickým RCC (Mandriota, a další, 2002). Exprese EMT rakovinnými buňkami RCC vedoucí k nedostatku adhezivních molekul epitelu by mohla částečně vysvětlit selhání této metody.

Ve studii Farace et al. (2001) byly u pacientů s rakovinou plic zjištěny významné nesrovnalosti mezi počtem CTC stanoveným pomocí CellSearch® a další filtrační metodou (systémy ISET). Podle CellSearch bylo negativních 30 % pacientů, zatímco pomocí ISET bylo negativních pouze 5 %. Shodné výsledky se týkají pouze 47

% pacientů. Podobné výsledky byly popsány u studovaných pacientů s RCC: CTC byly u 13 z 36 pacientů (36,1 %) užívajících ISET a pouze u 7 z 36 pacientů (19,4 %) využívajících platformu CellSearch<sup>®</sup> (Bai, a další, 2018). Obecně byla v řadě studií dokumentována lepší detekce CTC u pacientů pomocí filtračních metod než u CellSearch (Bankó, a další, 2019). Filtrační systémy mohou být mnohem účinnější při identifikaci CTC, jelikož CellSearch<sup>®</sup> nemůže detekovat ztrátu epiteliálních markerů, která je spojena s nádorovými buňkami podstupujícími EMT proces.

Naše data z imunohistochemické analýzy ukázala, že CTC pacientů s RCC mohou exprimovat cytokeratiny i vimentin. Dualita strukturálních vláken potvrzuje dynamiku změn zjištěných v nádorových hmotách.

Úspěšná aplikace zachycení CTC na základě EpCAM pozitivitu byla dosud v metastatickém RCC velmi omezená. Vysoká plasticita a heterogenita CTC morfologických výzev jsou v současné době k dispozici obohacovací a detekční techniky s EpCAM jako obvyklým povrchovým markerem, který je v metastatickém RCC nedostatečně zastoupen. Metoda separace založená na velikosti, kterou jsme představili v kombinaci s vitálním barvením mitochondrií, umožňuje charakterizovat ne-hematopoetické buňky v periferním krevním řečišti s proměnlivými charakteristikami a definovat podskupiny CTC, které by mohly být zřetelně spojeny s metastatickým potenciálem.

Obecně platí, že časná stadia RCC nejsou spojena s klinickými projevy, a proto včasné zjištění nemoci zůstává významnou výzvou.

Vzhledem k tomu, že RCC je později považováno za onemocnění odolné vůči chemickým látkám, je třeba vzít v úvahu, že v posledních několika letech bylo vyvinuto několik inovativních léčebných režimů pro zvládnání metastatického RCC. Na poli RCC vedlo zvýšené porozumění genetice a molekulární biologii k úspěšnému použití látek zaměřených na dráhy VEGF a mTOR (Motzer, 2015b). Ale i když jsou k dispozici různé léčebné strategie, do klinické praxe nebyly zahrnuty žádné prediktivní ukazatele odezvy, takže volba mezi těmito různými léky se obvykle provádí na základě klinického výsledku, preferencí pacienta a profilu toxicity každého činidla. Výsledná množina dostupných léčebných možností je významně omezena dostupnými parametry pro personalizovanou implementaci těchto agens. Věříme proto, že testování profilů CTC analýzou genové exprese cílených agentů může změnit a zlepšit výsledky terapie RCC.

Imunoterapie pomocí inhibice kontrolního bodu zaměřující se na programovanou dráhu 1 receptoru buněčné smrti (PD-1) se stala běžnou léčbou u

různých typů nádorů. Nivolumab byl první terapií typu PD-1 ve své třídě a byl schválen pro léčbu RCC na základě výsledků studie fáze III srovnávající nivolumab s everolimusem (Motzer, a další, 2015b). Nadměrná exprese PD-L1 byla identifikována jako cesta, kterou metastatické nádorové buňky používají k vyhýbání se detekci imunitního systému. PD-L1 se váže na PD-1 na T-buňkách a potlačuje jejich aktivitu. Imunoterapie založená na inhibici PD-1 nebo PD-L1 představuje průlom v léčbě pokročilých rakovin. Dnes jsou pacienti se solidním nádorem vyšetřováni na expresi PD-L1 na svých nádorových buňkách ve tkáňové biopsii. Hladiny exprese PD-L1 byly prokázány jako validní biomarker pro stratifikaci pacientů, kteří budou lépe reagovat na imunoterapii.

Využití punkčních biopsií pro tuto stratifikaci pacienta má svá omezení. Konkrétně, nádorové biopsie jsou mnohdy riskantní, drahé a tak nemohou být provedeny sériově, aby bylo možné sledovat stav nádoru v průběhu léčby. Tekutá biopsie může možná ilustrovat kontrolu onemocnění, protože je minimálně invazivní a lze ji snadno opakovat. Nízká specifita je bohužel největší nevýhodou prezentované separační metody založené na velikosti. Výhodou je vysoká citlivost a izolace životaschopných buněk s následnou kultivací. Izolace celých buněk poskytuje další možnost molekulární charakterizace a specifikaci buněk.

Měření exprese PD-L1 na CTC jednoduchým odběrem krve představuje nízkorizikový přístup k počáteční stratifikaci pacienta s minimálními náklady a dává nám příležitost sledovat expresi PD-L1 nádorových buněk pacienta v průběhu onemocnění.



## 6 Závěr

Vzhledem k četnosti záchytu nádorů ledvin při ultrazvukovém vyšetření z různých důvodů při jejich asymptomatickém průběhu se domníváme, že zařazení ultrazvuku ledvin, resp. ultrazvuku břicha do skriningových programů má možnost snížit výskyt karcinomu ledvin pozdních stádií, snížit úmrtnost a zároveň zvýšit průměrné přežívání.

Významné je zejména urologické vyšetření, které by v rámci preventivních kontrol a skriningu karcinomu prostaty mělo obsahovat též ultrazvukové vyšetření ledvin a to především ve skupinách pacientů s vyšším BMI, s antihypertenzní terapií, abúzem cigaret a pacientů v dialyzačním programu. Význam vyšetření roste zvláště tam, kde se kombinuje vícero zmíněných nepříznivých faktorů.

Výzkum na poli CTC se aktuálně přesunul z pouhého počítání izolovaných CTC buněk k jejich molekulární charakterizaci, co by mělo umožnit monitoraci vývoje fenotypu nemoci v čase a poskytnout potenciální prediktivní markery odpovědi nebo rezistence na léčbu.

Doposud u RCC nebyly dokončeny žádné studie biologických markerů detekovaných na CTC. Přesto existuje silný racionální důvod studovat expresi specifických, s léčbou spojených markerů např. tyrosin-kinázových receptorů zapojených do angiogeneze a invazivity nádoru, jako je například VEGF, VEGFR, HIF1A.

Alternativně velký význam může mít testování CTC za účelem studia exprese PD-1 a jeho ligandu PD-L1, jakož i mnoha dalších markerů ovlivňujících reakci imunitního systému po podání nových imunoterapeutik v kombinaci s anti-angiogenní léčbou, zejména před paliací.

Kombinace časného záchytu nádorů ledvin ve stádiu vyléčitelného onemocnění a využití možností vyšetření genových expresí a potenciálních biomarkerů RCC může vést k cílenému působení na pokročilá stadia RCC a tím způsobem k efektivnímu vynaložení prostředků veřejného zdravotnictví.

## 7 Souhrn

Renální karcinom (RCC) je třetí nejčastější urologická malignita, u které je zhruba u 30% v době diagnózy zjištěn metastatický proces. Vzhledem k rezistenci na ozáření a chemorezistenci je prognóza těchto pacientů špatná. Optimální léčbou je proto kompletní odstranění nádoru lokalizovaného onemocnění.

Ke zlepšení prognózy pacientů v posledních dekadách došlo díky zvýšení počtu náhodně zjištěných nádorů ledvin a též zavedením nových typů léčby. Vzhledem k obecnému trendu nárůstu náhodně zjištěných nádorů ledvin, jsme byli inspirováni k zhodnocení pacientů operovaných pro nádor ledvin s ohledem na typ záchytu onemocnění a metodu primárního vyšetření.

K vyšetřování cirkulujících nádorových buněk (CTC- z angl. Circulating tumor cells) nás vedl fakt, že pro sledování pacientů po operacích nádorů ledvin nemáme žádný biomarker odpovídající léčbě, případně rekurenci onemocnění. Vyšetření CTC patří do skupiny testů tekuté biopsie a jednou z jeho hlavních výhod je relativně minimální invazivita (odběr krve), která skutečně umožňuje sledování nádorové dynamiky. Primární otázkou bylo, zda CTC buňky mohou hrát nějakou roli při sledování pacientů po operační léčbě a event. při nastavení imunoterapeutické a antiangiogenní léčby díky molekulární CTC- analýze na úrovni genové exprese.

Do epidemiologické studie z období května 2011 do května 2016 bylo zařazeno 471 pacientů, kteří byli operováni pro RCC. Sběr dat probíhal retrospektivně. Hodnocen byl důvod vyšetření dle klinických obtíží a typ prvotního vyšetření (UZ, CT, MRI). Mezi vyšetřovanými bylo 304 (64,5 %) mužů. Průměrný věk pacientů byl 64 let (95% CI: 63-65) let. Průměrná hodnota BMI byla 28.5 (95% CI: 28-29).

V sledovaném souboru jsme pozorovali 347 (73,7 %) případů incidentálních, 77 (16,3 %) symptomatických. U 47 pacientů (9,9 %) nebylo možno rozlišit typ záchytu.

Rozložení jednotlivých stádií detekovaných nádorů je u mužů a žen stejné. Výskyt časných a pozdních stádií nebyl závislý na pohlaví, BMI ani na antihypertenzní terapii. Nižší stádium onemocnění bylo signifikantně více diagnostikováno pomocí UZ.

Histologicky dominoval světlobuněčný RCC (80 %) následován papilárním renálním RCC (10 %). Výskyt jednotlivých karcinomů nebyl závislý na časném a pozdním stádiu.

V rámci testování CTC byla všem pacientům odebrána periferní krev (2x8 ml EDTA) v několika časových bodech (1. Před operací, 2. 4-10 dnů hod. po operaci, 3. cca 6 týdnů po operaci a 4. Za 6-12 měsíců po operaci). Celkem bylo odebráno 495 CTC testů.). Pro obohacení CTC byl použit separační protokol založený na velikosti buněk (MetaCell®). Po jednoduché filtraci krve přes porézní membránu jsou zachycené buňky (větší než 8 µm) inkubovány *in vitro* po krátkou dobu (3-5 dnů). Po inkubaci jsou buňky barveny vitálními fluorescenčními barvivy (NucBlue™, Celltracker™). Přítomnost CTC se vyhodnocuje ve dvou krocích: nejprve buněčnou cytomorfológií, za druhé molekulárním testováním (analýza qPCR). Analýza genové exprese následujících genů (ACTB, MUC1, KRT18, KRT19, VIM, CD24, CD44, CD68, CD45, PD-L1 (CD274), VEGF, VEGFR (FLT1), HIF1A, WT) byla provedena ve frakci zachycených buněk a bylo provedeno srovnání s frakcí bílých krvinek pro každého pacienta v různých časech odběru vzorků.

V naší studii jsme prokázali přítomnost CTC až u 86,7 % testovaných vzorků krve pacientů operovaných pro nádor ledviny. Pravděpodobnost detekce CTC se zvyšovala rostoucí velikostí nádoru zejména u světlobuněčného RCC. Analýza genové exprese odhalila zvýšenou expresi genů v obohacených CTC pro geny KRT18 a vimentin ve srovnání s frakcí bílých krvinek. Také se ukázalo, že charakter CTC se během sledovaného období mění. Z terapeutického hlediska byly nejvýznamnějšími zjištěnými změnami u pacientů, zvýšená VEGF (vaskulární endotelový růstový faktor a/nebo PD-L1 (Programmed death ligand 1, CD274) exprese na CTC.

## 8 Summary

Renal cell carcinoma (RCC) is the third most common urological malignancy, in which about 30% are diagnosed with a metastatic disease at the time of diagnosis. Due to radiation resistance and chemoresistance, the prognosis of these patients is poor. Therefore, the optimal treatment is complete removal of the tumor from at the stage of localized disease.

The prognosis of patients has improved in recent decades due to an increase in the number of incidentally detected kidney tumors and also the introduction of new types of treatments. Given the general trend of increasing randomly diagnosed kidney tumors, we were inspired to evaluate patients operated for kidney cancer with respect to the type of disease detection and the method of primary examination.

The fact that we do not have a biomarker corresponding to the treatment or recurrence of the disease for monitoring patients after kidney cancer surgery led us to the CTC investigation. CTC examination belongs to the group of liquid biopsy tests and one of its main advantages is the relatively minimal invasiveness (blood collection), which really allows monitoring of tumor dynamics. The primary question was whether CTC cells could play a role in monitoring patients after surgery and event. In the setting of immunotherapeutic and antiangiogenic treatment thanks to molecular CTC analysis at the level of gene expression.

The epidemiological study from May 2011 to May 2016 included 471 patients who underwent surgery for RCC. Data collection took place retrospectively. The reason for the examination according to clinical difficulties and the type of initial examination (US, CT, MRI) were evaluated. Among those examined were 304 (64.5%) men. The mean age of the patients was 64 years (95% CI: 63-65) years. The mean BMI was 28.5 (95% CI: 28-29).

In the monitored group, we observed 347 (73.7%) cases of incidental, 77 (16.3%) symptomatic. In 47 patients (9.9%) it was not possible to distinguish the type of capture.

The distribution of individual stages of detected tumors is the same in men and women. The incidence of early and advanced stages was not dependent on gender, BMI or antihypertensive therapy. The lower stage of the disease was significantly more diagnosed with ultrasound. Histologically, clear cell RCC (80%) dominated, followed by papillary renal RCC (10%). The incidence of individual cancers was not dependent on early and late stage

As part of CTC testing, peripheral blood (2x8 ml EDTA) was collected from all patients at several time points (1. before surgery, 2. 4-10 days after surgery, 3. approx. 6 weeks after surgery and 4. at 6-12 months after surgery. operations). A total of 495 CTC tests were collected.). A cell size separation protocol (MetaCell®) was used to enrich CTC. After simple filtration of the blood through a porous membrane, the captured cells (greater than 8 µm) are incubated in vitro for a short time (3-5 days). After incubation, cells are stained with vital fluorescent dyes (NucBlue®, Celltracker®). The presence of CTC is evaluated in two steps: first by cellular cytomorphology, second by molecular testing (qPCR analysis). Gene expression analysis of the following genes (ACTB, MUC1, KRT18, KRT19, VIM, CD24, CD44, CD68, CD45, PD-L1 (CD274), VEGF, VEGFR (FLT1), HIF1A, WT) was performed in the fraction of captured cells and was comparison was made with the white blood cell fraction for each patient at different sampling times.

In our study, we demonstrated the presence of CTC in up to 86.7% of tested blood samples from patients operated for kidney cancer. The likelihood of detecting CTC increased with increasing tumor size, especially in clear cell RCC. Gene expression analysis revealed increased gene expression in enriched CTCs for the KRT18 and vimentin genes compared to the white blood cell fraction. It also turned out that the nature of CTC changes during the period under review. From a therapeutic point of view, the most significant changes observed in patients were increased VEGF (vascular endothelial growth factor and / or PD-L1 (Programmed death ligand 1, CD274) expression on CTC.

## 9 Seznam tabulek a obrázků

Tab. 1 <i>TNM klasifikační systém renálního karcinomu</i> .....	9
Tab. 2 Genomické varianty renálních karcinomů a s tím spojené syndromové manifestace ..	25
Tab. 3 <i>Syndromy renálního karcinomu se zárodečnou mutací</i> .....	26
Tab. 4 Schematický seznam a popis metodik obohacování CTC. ....	29
Tab. 5 Prezentace laboratorních metod používaných v molekulárně genetických testech CTC. ....	32
Tab. 6 Základní demografické údaje.....	35
Tab. 7 Symptomy zaznamenané v průběhu iniciálního vyšetření pacientů, .....	37
Tab. 8 Charakteristika souboru pacientů ve vztahu k CTC- vyšetření.....	40
Tab. 9 Průměr primárního tumoru ve vztahu k pozitivnímu CTC-vyšetření .....	40
Tab. 10 CTC – pozitivita jednotlivých typů odběru včetně dělení dle histologie.....	40
Tab. 11 Typ vyšetřovací metody a význam detekce časného a pozdního stádia onemocnění, ..	45
Tab. 12 Zobrazení záchytu nádorů ledvin na podkladě ultrazvuku, incidentální .....	46
Obr. 1 Srovnání incidence renálního karcinomu s ostatními zeměmi Evropy (zdroj uroweb.cz). ....	8
Obr. 2 Srovnání mortality na renální karcinom s ostatními zeměmi Evropy.....	8
Obr. 3 Vývoj incidence renálního karcinomu podle stadií onemocnění v ČR (Mužík, 2020).....	11
Obr. 4 Vývoj incidence a úmrtnosti na renální karcinom v ČR (Mužík, 2020).....	12
Obr. 5 Systém CELLSEARCH® .....	30
Obr. 6 Různé tvary CTC separované a zobrazené pomocí CELLSEARCH® .....	30
Obr. 7 Proporcionální zastoupení duplicitních nádorů.....	36
Obr. 8 Důvody vyšetření incidentálních nádorů ledvin v sledovaném souboru pacientů podle .....	36
Obr. 9 Schéma odběrů krve.....	39
Obr. 10 CTC zachycené na separační membráně s póry o velikosti 8 µm. ....	41
Obr. 11 Živé CTC zachycené na separační membráně .....	42
Obr. 12 Živé CTC zachycené na separační membráně s póry o velikosti 8 µm .....	42
Obr. 13 CTC detekované u pacientů s RCC po dobu jednoho roku ve 4 krevních vzorcích.....	47
Obr. 14 Počet CTC buněk (průměr na 1 ml krve) detekovaný u pacientů s RCC po dobu .....	47
Obr. 15 Vztah mezi velikostí nádoru a pozitivitou vyšetření CTC buněk. ....	48
Obr. 16 Výrazně aktivní mitochondriální síť v buňkách primárního tumoru RCC .....	48
Obr. 17 CTC – sledování v průběhu jednoho roku u 2 pacientů (žena 43 let, muž 72 let).....	49
Obr. 18 Relativní množství RNA zobrazené v klastrech po analýze genové exprese pomocí .....	49
Obr. 19 Analýza genové exprese CTC ukazující rozdíly mezi CTC PDL1 + (hnědá) a CTC.....	50

## 10 Seznam použité literatury

- AGUIRRE-GHISO, Julio A., 2007. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. *Nature Reviews Cancer* [online]. 7(11), 834-846 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1038/nrc2256. ISSN 1474-175X. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nrc2256>
- ALIX-PANABIÈRES, Catherine, Jean-Pierre VENDRELL, Olivier PELLÉ, Xavier REBILLARD, Sabine RIETHDORF, Volkmar MÜLLER, Michel FABBRO a Klaus PANTEL, 2007. Detection and Characterization of Putative Metastatic Precursor Cells in Cancer Patients. *Clinical Chemistry* [online]. 53(3), 537-539 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1373/clinchem.2006.079509. ISSN 0009-9147. Dostupné z: <https://academic.oup.com/clinchem/article/53/3/537/5627251>

- Andree, Kiki C., Guus VAN DALUM a Leon W.M.M. TERSTAPPEN, 2016. Challenges in circulating tumor cell detection by the CellSearch system. *Molecular Oncology* [online]. 10(3), 395-407 [cit. 2020-07-30]. DOI: 10.1016/j.molonc.2015.12.002. ISSN 15747891. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1016/j.molonc.2015.12.002>
- APARICIO, Samuel a Carlos CALDAS, 2013. The Implications of Clonal Genome Evolution for Cancer Medicine. *New England Journal of Medicine* [online]. 368(9), 842-851 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1056/NEJMra1204892. ISSN 0028-4793. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1204892>
- ASHWORTH, TR, 1869. A case of cancer in which cells similar to those in tumors were seen in the blood after death. *Aust Med J.* 14(1), 146-149.
- BAI, Menglin, Benkui ZOU, Zhendan WANG et al., 2018. Comparison of two detection systems for circulating tumor cells among patients with renal cell carcinoma. *International Urology and Nephrology* [online]. 50(10), 1801-1809 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1007/s11255-018-1954-2. ISSN 0301-1623. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11255-018-1954-2>
- BANKÓ, Petra, Sun Young LEE, Viola NAGYGYÖRGY, Miklós ZRÍNYI, Chang Hoon CHAE, Dong Hyu CHO a András TELEKES, 2019. Technologies for circulating tumor cell separation from whole blood. *Journal of Hematology & Oncology* [online]. 12(1) [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1186/s13045-019-0735-4. ISSN 1756-8722. Dostupné z: <https://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13045-019-0735-4>
- BERGSTRÖM, A, C-C HSIEH, P LINDBLAD, C-M LU, N R COOK a A WOLK, 2001. Obesity and renal cell cancer – a quantitative review. *British Journal of Cancer* [online]. 85(7), 984-990 [cit. 2020-07-27]. DOI: 10.1054/bjoc.2001.2040. ISSN 0007-0920. Dostupné z: <http://www.nature.com/doi/10.1054/bjoc.2001.2040>
- BIELČIKOVÁ, Zuzana, Anna JAKABOVÁ, Michael PINKAS, Milada ZEMANOVÁ, Katarína KOLOŠTOVÁ a Vladimír BOBEK, 2017. Circulating tumor cells: what we know, what do we want to know about them and are they ready to be used in clinics?. *Am J Transl Res.* 9(6), 2807-2823.
- BILKENROTH, Udo, Helge TAUBERT, Dagmar RIEMANN, Udo REBMANN, Hans HEYNEMANN a Axel MEYE, 2001. Detection and enrichment of disseminated renal carcinoma cells from peripheral blood by immunomagnetic cell separation. *International Journal of Cancer* [online]. 92(4), 577-582 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1002/ijc.1217. ISSN 0020-7136. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.1217>
- BOSSOLASCO, Patrizia, Clara RICCI, Gabriella FARINA, Davide SOLIGO, Donata PEDRETTI, Alberto SCANNI a Giorgio Lambertenghi DELILIERI, 2002. Detection of micrometastatic cells in breast cancer by RT-PCR for the mammaglobin gene. *Cancer Detection and Prevention* [online]. 26(1), 60-63 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1016/S0361-090X(02)00009-0. ISSN 0361090X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0361090X02000090>
- BRANNON, A. R., A. REDDY, M. SEILER et al., 2010. Molecular Stratification of Clear Cell Renal Cell Carcinoma by Consensus Clustering Reveals Distinct Subtypes and Survival Patterns. *Genes & Cancer* [online]. 1(2), 152-163 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1177/1947601909359929. ISSN 1947-6019. Dostupné z: <http://gan.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/1947601909359929>
- BRONCY, Lucile, Basma Ben NJIMA, Arnaud MÉJEAN et al., 2018a. Single-cell genetic analysis validates cytopathological identification of circulating cancer cells in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Oncotarget* [online]. 9(28), 20058-20074 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.18632/oncotarget.25102. ISSN 1949-2553. Dostupné z: <https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.25102>
- BRONCY, Lucile a Patrizia PATERLINI-BRÉCHOT, 2018b. Circulating Tumor Cells for the Management of Renal Cell Carcinoma. *Diagnostics* [online]. 8(3) [cit. 2020-07-28]. DOI:

- 10.3390/diagnostics8030063. ISSN 2075-4418. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2075-4418/8/3/63>
- CALLEA, M., L. ALBIGES, M. GUPTA et al., 2015. Differential Expression of PD-L1 between Primary and Metastatic Sites in Clear-Cell Renal Cell Carcinoma. *Cancer Immunology Research* [online]. 3(10), 1158-1164 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0043. ISSN 2326-6066. Dostupné z: <http://cancerimmunolres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/2326-6066.CIR-15-0043>
- Cellsearch [online], 2020. Italy: Menarini Silicon Biosystems, Inc 2020 [cit. 2020-07-30]. Dostupné z: [www.cellsearchctc.com](http://www.cellsearchctc.com)
- CRISTOFANILLI, Massimo, Kristine R. BROGLIO, Valentina GUARNERI et al., 2007. Circulating Tumor Cells in Metastatic Breast Cancer: Biologic Staging Beyond Tumor Burden. *Clinical Breast Cancer* [online]. 7(6), 34-42 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.3816/CBC.2007.n.004. ISSN 15268209. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1526820911707352>
- CULP, Stephen H., Nizar M. TANNIR, E. Jason ABEL, Vitaly MARGULIS, Pheroze TAMBOLI, Surena F. MATIN a Christopher G. WOOD, 2010. Can we better select patients with metastatic renal cell carcinoma for cytoreductive nephrectomy?. *Cancer* [online]. 116(14), 3378-3388 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1002/cncr.25046. ISSN 0008543X. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/cncr.25046>
- ČEGAN, Martin, Katarína KOLOŠTOVÁ, Rafal MATKOWSKI, Marek BROUL, Jan ŠRAML, Marek FIUTOWSKI a Vladimír BOBEK, 2014. In vitro culturing of viable circulating tumor cells of urinary bladder cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 7(10), 7164-7171.
- DANIEL, Carrie R, Amanda J CROSS, Barry I GRAUBARD et al., 2012. Large prospective investigation of meat intake, related mutagens, and risk of renal cell carcinoma. *The American Journal of Clinical Nutrition* [online]. 95(1), 155-162 [cit. 2020-07-27]. DOI: 10.3945/ajcn.111.019364. ISSN 0002-9165. Dostupné z: <https://academic.oup.com/ajcn/article/95/1/155/4576527>
- D'ARCY, Padraig, Xin WANG a Stig LINDER, 2015. Deubiquitinase inhibition as a cancer therapeutic strategy. *Pharmacology & Therapeutics* [online]. 147, 32-54 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2014.11.002. ISSN 01637258. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163725814002022>
- DE BONO, J. S., H. I. SCHER, R. B. MONTGOMERY et al., 2008. Circulating Tumor Cells Predict Survival Benefit from Treatment in Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research* [online]. 14(19), 6302-6309 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0872. ISSN 1078-0432. Dostupné z: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-08-0872>
- DE MARTINO, Michela, Tobias KLATTE, Christoph SEEMANN, Matthias WALDERT, Andrea HAITEL, Georg SCHATZL, Mesut REMZI a Peter WEIBL, 2013. Validation of serum C-reactive protein (CRP) as an independent prognostic factor for disease-free survival in patients with localised renal cell carcinoma (RCC). *BJU International* [online]. 111(8), 348-353 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1111/bju.12067. ISSN 14644096. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/bju.12067>
- DEKERNION, JB a A BELLDEGRUN, 1992. Renal tumors. *Campbell's Urology*. 6th. Philadelphia: WB Saunders, s. 1053-1093. ISBN xxx.
- DI CARLO, ANGELINA, 2012. Matrix metalloproteinase-2 and -9 in the sera and in the urine of human oncocyoma and renal cell carcinoma. *Oncology Reports* [online]. 28(3), 1051-1056 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.3892/or.2012.1864. ISSN 1021-335X. Dostupné z: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2012.1864>
- DI CARLO, ANGELINA, 2013. Evaluation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and their complex MMP-9/NGAL in sera and urine of patients with kidney tumors. *Oncology Letters* [online]. 5(5), 1677-1681 [cit. 2020-



- 07-28]. DOI: 10.3892/ol.2013.1252. ISSN 1792-1074. Dostupné z: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2013.1252>
- DIZMAN, Nazli, Paulo BERGEROT, Cristiane BERGEROT, Richard B. LANMAN, Victoria M. RAYMOND, Kimberly C. BANKS, Jeremy JONES a Sumanta K. PAL, 2018. Exceptional Response to Nivolumab Rechallenge in Metastatic Renal Cell Carcinoma with Parallel Changes in Genomic Profile. *European Urology* [online]. 73(2), 308-310 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1016/j.eururo.2017.08.006. ISSN 03022838. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0302283817306929>
- ESMAEILSABZALI, Hadi, Timothy V. BEISCHLAG, Michael E. COX, Ash M. PARAMESWARAN a Edward J. PARK, 2013. Detection and isolation of circulating tumor cells: Principles and methods. *Biotechnology Advances* [online]. 31(7), 1063-1084 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2013.08.016. ISSN 07349750. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S073497501300150X>
- European Association of Urology Guidelines [online], 2020. Arnhem, The Netherlands: EAU Guidelines Office [cit. 2020-07-30]. Dostupné z: <http://uroweb.org/guidelines/compilations-of-all-guidelines/>
- European Network of Cancer Registries [online], 2016. Belgium: EU [cit. 2020-07-30]. Dostupné z: [www.enrcr.eu](http://www.enrcr.eu)
- FARACE, F, C MASSARD, N VIMOND et al., 2011. A direct comparison of CellSearch and ISET for circulating tumour-cell detection in patients with metastatic carcinomas. *British Journal of Cancer* [online]. 105(6), 847-853 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1038/bjc.2011.294. ISSN 0007-0920. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/bjc2011294>
- FERLAY, J., M. COLOMBET, I. SOERJOMATARAM et al., 2018. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *European Journal of Cancer* [online]. 103, 356-387 [cit. 2020-07-27]. DOI: 10.1016/j.ejca.2018.07.005. ISSN 09598049. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959804918309559>
- FISCHER, K, G TEIL, R HODA a P FORNARA, 2012. Serum amyloid A: a biomarker for renal cancer. *Anticancer Research*. 32(5), 1801-1804.
- FLANIGAN, Robert C., Sydney E. SALMON, Brent A. BLUMENSTEIN et al., 2001. Nephrectomy Followed by Interferon Alfa-2b Compared with Interferon Alfa-2b Alone for Metastatic Renal-Cell Cancer. *New England Journal of Medicine* [online]. 345(23), 1655-1659 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1056/NEJMoa003013. ISSN 0028-4793. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa003013>
- FLOWER, Darren R., 1996. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochemical Journal* [online]. 318(1), 1-14 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1042/bj3180001. ISSN 0264-6021. Dostupné z: <https://portlandpress.com/biochemj/article/318/1/1/33240/The-lipocalin-protein-family-structure-and>
- FREW, Ian J. a Holger MOCH, 2015. A Clearer View of the Molecular Complexity of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* [online]. 10(1), 263-289 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1146/annurev-pathol-012414-040306. ISSN 1553-4006. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-pathol-012414-040306>
- FRIEDLANDER, Terence W., Gayatri PREMASEKHARAN a Pamela L. PARIS, 2014. Looking back, to the future of circulating tumor cells. *Pharmacology & Therapeutics* [online]. 142(3), 271-280 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2013.12.011. ISSN 01637258. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163725813002532>
- FURRER, Daniela, François SANSCHAGRIN, Simon JACOB a Caroline DIORIO, 2015. Advantages and Disadvantages of Technologies for HER2 Testing in Breast Cancer Specimens: Table 1. *American Journal of Clinical Pathology* [online]. 144(5), 686-703 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1309/AJCPT41TCBUEVDQC. ISSN 0002-9173. Dostupné z: <https://academic.oup.com/ajcp/article-lookup/doi/10.1309/AJCPT41TCBUEVDQC>

- GERGES, N., J. RAK a N. JABADO, 2010. New technologies for the detection of circulating tumour cells. *British Medical Bulletin* [online]. 94(1), 49-64 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1093/bmb/ldq011. ISSN 0007-1420. Dostupné z: <https://academic.oup.com/bmb/article-lookup/doi/10.1093/bmb/ldq011>
- GERLINGER, Marco, Andrew J. ROWAN, Stuart HORSWELL et al., 2012. Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. *New England Journal of Medicine* [online]. 366(10), 883-892 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1056/NEJMoa1113205. ISSN 0028-4793. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1113205>
- GERSTUNG, Moritz, Christian BEISEL, Markus RECHSTEINER, Peter WILD, Peter SCHRAML, Holger MOCH a Niko BEERENWINKEL, 2012. Reliable detection of subclonal single-nucleotide variants in tumour cell populations. *Nature Communications* [online]. 3(1) [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1038/ncomms1814. ISSN 2041-1723. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/ncomms1814>
- GHOSSEIN, R A, H I SCHER, W L GERALD, W K KELLY, T CURLEY, A AMSTERDAM, Z F ZHANG a J ROSAI, 1995. Detection of circulating tumor cells in patients with localized and metastatic prostatic carcinoma: clinical implications. *Journal of Clinical Oncology* [online]. 13(5), 1195-1200 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1200/JCO.1995.13.5.1195. ISSN 0732-183X. Dostupné z: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.1995.13.5.1195>
- GONZALEZ, Humberto C., Lois LAMERATO, Craig G. ROGERS a Stuart C. GORDON, 2015. Chronic Hepatitis C Infection as a Risk Factor for Renal Cell Carcinoma. *Digestive Diseases and Sciences* [online]. 60(6), 1820-1824 [cit. 2020-07-27]. DOI: 10.1007/s10620-015-3521-3. ISSN 0163-2116. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10620-015-3521-3>
- HAHN, Andrew W., David M. GILL, Benjamin MAUGHAN et al., 2017. Correlation of genomic alterations assessed by next-generation sequencing (NGS) of tumor tissue DNA and circulating tumor DNA (ctDNA) in metastatic renal cell carcinoma (mRCC): potential clinical implications. *Oncotarget* [online]. 8(20), 33614-33620 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.18632/oncotarget.16833. ISSN 1949-2553. Dostupné z: <https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.16833>
- HARASS, A, 1996. *Cancer Rates and Risks*. 14th. Bethesda: National Institutes of Health Publication. ISBN xx. 96-691.
- HARTEN, Sarah K., Deepa SHUKLA, Ravi BAROD et al., 2009. Regulation of Renal Epithelial Tight Junctions by the von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Gene Involves Occludin and Claudin 1 and Is Independent of E-Cadherin. *Molecular Biology of the Cell* [online]. 20(3), 1089-1101 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1091/mbc.e08-06-0566. ISSN 1059-1524. Dostupné z: <https://www.molbiolcell.org/doi/10.1091/mbc.e08-06-0566>
- HENG, Daniel Y.C., J. Connor WELLS, Brian I. RINI et al., 2014. Cytoreductive Nephrectomy in Patients with Synchronous Metastases from Renal Cell Carcinoma: Results from the International Metastatic Renal Cell Carcinoma Database Consortium. *European Urology* [online]. 66(4), 704-710 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1016/j.eururo.2014.05.034. ISSN 03022838. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0302283814004941>
- HOFBAUER, S L, K I STANGL, M DE MARTINO, I LUCCA, A HAITEL, S F SHARIAT a T KLATTE, 2014. Pretherapeutic gamma-glutamyltransferase is an independent prognostic factor for patients with renal cell carcinoma. *British Journal of Cancer* [online]. 111(8), 1526-1531 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1038/bjc.2014.450. ISSN 0007-0920. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/bjc2014450>
- CHADBAN, STEVEN J, KATHERINE A BARRACLOUGH, SCOTT B CAMPBELL et al., 2012. KHA-CARI guideline: KHA-CARI adaptation of the KDIGO Clinical Practice Guideline for the Care of Kidney Transplant Recipients. *Nephrology* [online]. 17(3), 204-214 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1111/j.1440-1797.2011.01559.x. ISSN 13205358. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1440-1797.2011.01559.x>

- CHEN, Lichan, Ann M BODE a Zigang DONG, 2017. Circulating Tumor Cells: Moving Biological Insights into Detection. *Theranostics* [online]. 7(10), 2606-2619 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.7150/thno.18588. ISSN 1838-7640. Dostupné z: <http://www.thno.org/v07p2606.htm>
- CHEUNG PASITPORN, W., C. THONGPRAYOON, O.A. O'CORRAGAIN, P.J. EDMONDS, P. UNGPRASERT, W. KITTANAMONGKOLCHAI a S.B. ERICKSON, 2015. The risk of kidney cancer in patients with kidney stones: a systematic review and meta-analysis. *QJM* [online]. 108(3), 205-212 [cit. 2020-07-27]. DOI: 10.1093/qjmed/hcu195. ISSN 1460-2725. Dostupné z: <https://academic.oup.com/qjmed/article-lookup/doi/10.1093/qjmed/hcu195>
- CHOUERI, T. K., D. J. FIGUEROA, A. P. FAY et al., 2015. Correlation of PD-L1 Tumor Expression and Treatment Outcomes in Patients with Renal Cell Carcinoma Receiving Sunitinib or Pazopanib: Results from COMPARZ, a Randomized Controlled Trial. *Clinical Cancer Research* [online]. 21(5), 1071-1077 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1993. ISSN 1078-0432. Dostupné z: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-14-1993>
- CHOUERI, Toni K., Mayer N. FISHMAN, Bernard ESCUDIER et al., 2016. Immunomodulatory Activity of Nivolumab in Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Clinical Cancer Research* [online]. 22(22), 5461-5471 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2839. ISSN 1078-0432. Dostupné z: <http://clincancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1078-0432.CCR-15-2839>
- CHOUERI, Toni K., Youjin JE a Eunyoung CHO, 2014. Analgesic use and the risk of kidney cancer: A meta-analysis of epidemiologic studies. *International Journal of Cancer* [online]. 134(2), 384-396 [cit. 2020-07-27]. DOI: 10.1002/ijc.28093. ISSN 00207136. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.28093>
- CHOW, Wong-Ho, 1999. Rising Incidence of Renal Cell Cancer in the United States. *JAMA* [online]. 281(17) [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1001/jama.281.17.1628. ISSN 0098-7484. Dostupné z: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.281.17.1628>
- IACOVELLI, Roberto, Franco NOLè, Elena VERRI et al., 2016. Prognostic Role of PD-L1 Expression in Renal Cell Carcinoma. A Systematic Review and Meta-Analysis. *Targeted Oncology* [online]. 11(2), 143-148 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1007/s11523-015-0392-7. ISSN 1776-2596. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11523-015-0392-7>
- IKEDA, Sadakatsu, Maria SCHWAEDERLE, Mandakini MOHINDRA, Denis L. FONTES JARDIM a Razelle KURZROCK, 2018. MET alterations detected in blood-derived circulating tumor DNA correlate with bone metastases and poor prognosis. *Journal of Hematology & Oncology* [online]. 11(1) [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1186/s13045-018-0610-8. ISSN 1756-8722. Dostupné z: <https://jhoonline.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13045-018-0610-8>
- International Agency for Research on Cancer [online], 2020. France: WHO [cit. 2020-07-30]. Dostupné z: [www.iarc.fr](http://www.iarc.fr)
- JAYSON, Mary a Holt SANDERS, 1998. Increased incidence of serendipitously discovered renal cell carcinoma. *Urology* [online]. 51(2), 203-205 [cit. 2020-07-27]. DOI: 10.1016/S0090-4295(97)00506-2. ISSN 00904295. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0090429597005062>
- JUNG, Kyu-Won, Young-Joo WON, Hyun-Joo KONG, Chang-Mo OH, Hyunsoon CHO, Duk Hyoung LEE a Kang Hyun LEE, 2015. Cancer Statistics in Korea: Incidence, Mortality, Survival, and Prevalence in 2012. *Cancer Research and Treatment* [online]. 47(2), 127-141 [cit. 2020-07-27]. DOI: 10.4143/crt.2015.060. ISSN 1598-2998. Dostupné z: <http://e-crt.org/journal/view.php?doi=10.4143/crt.2015.060>
- KAYA, K., S. AYAN, G. GOKCE, H. KILICARSLAN, E. YILDIZ a E. Y. GULTEKIN, 2009. Urinary nuclear matrix protein 22 for diagnosis of renal cell carcinoma. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology* [online]. 39(1), 25-29 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1080/00365590410002500. ISSN 0036-5599. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00365590410002500>

- KESSLER, Oded, Eliahu MUKAMEL, Gabriel GILLON, Ciro SERVADIO, Herzlia HADAR a Miriam KONECZEZKY, 1994. Effect of improved diagnosis of renal cell carcinoma on the course of the disease. *Journal of Surgical Oncology* [online]. 57(3), 201-204 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1002/jso.2930570313. ISSN 00224790. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jso.2930570313>
- KHODAKOV, Dmitriy, Chunyan WANG a David Yu ZHANG, 2016. Diagnostics based on nucleic acid sequence variant profiling: PCR, hybridization, and NGS approaches. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 105, 3-19 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1016/j.addr.2016.04.005. ISSN 0169409X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X16301041>
- KING, Sallyann Coleman, Lori A. POLLACK, Jun LI, Jessica B. KING a Viraj A. MASTER, 2014. Continued Increase in Incidence of Renal Cell Carcinoma, Especially in Young Patients and High Grade Disease: United States 2001 to 2010. *Journal of Urology* [online]. 191(6), 1665-1670 [cit. 2020-07-27]. DOI: 10.1016/j.juro.2013.12.046. ISSN 0022-5347. Dostupné z: <http://www.jurology.com/doi/10.1016/j.juro.2013.12.046>
- KLEZL, Petr, Eliska POSPISILOVA, Katarina KOLOSTOVA, Jindrich SONSKY, Ondrej MALY, Robert GRILL, Ireneusz PAWLAK a Vladimir BOBEK, 2020. Detection of Circulating Tumor Cells in Renal Cell Carcinoma: Disease Stage Correlation and Molecular Characterization. *Journal of Clinical Medicine* [online]. 9(5) [cit. 2020-07-30]. DOI: 10.3390/jcm9051372. ISSN 2077-0383. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2077-0383/9/5/1372>
- KOLOSTOVA, Katarina, Rafal MATKOWSKI, Robert GÜRLICH, Krzysztof GRABOWSKI, Katarzyna SOTER, Robert LISCHKE, Jan SCHÜTZNER a Vladimir BOBEK, 2016. Detection and cultivation of circulating tumor cells in gastric cancer. *Cytotechnology* [online]. 68(4), 1095-1102 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1007/s10616-015-9866-9. ISSN 0920-9069. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10616-015-9866-9>
- KOLOŠTOVÁ, Katarína, Rafal MATKOWSKI, Marcin JEDRYKA, Katarzyna SOTER, Martin ČEGAN, Jiří PAVLÁSEK, Jan ŠPIČKA a Vladimír BOBEK, 2015. The added value of circulating tumor cells examination in ovarian cancer staging of ovarian cancer. *Am J of Cancer Res.* 155(11), 6333-75.
- KONNAK, John W. a H. Barton GROSSMAN, 1985. Renal Cell Carcinoma as an Incidental Finding. *Journal of Urology* [online]. 134(6), 1094-1096 [cit. 2020-07-27]. DOI: 10.1016/S0022-5347(17)47639-7. ISSN 0022-5347. Dostupné z: <http://www.jurology.com/doi/10.1016/S0022-5347%2817%2947639-7>
- KONNAK, John W. a H. Barton GROSSMAN, 1985. Renal Cell Carcinoma as an Incidental Finding. *Journal of Urology* [online]. 134(6), 1094-1096 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1016/S0022-5347(17)47639-7. ISSN 0022-5347. Dostupné z: <http://www.jurology.com/doi/10.1016/S0022-5347%2817%2947639-7>
- KOTECHA, Ritesh R., Robert J. MOTZER a Martin H. VOSS, 2019. Towards individualized therapy for metastatic renal cell carcinoma. *Nature Reviews Clinical Oncology* [online]. 16(10), 621-633 [cit. 2020-07-30]. DOI: 10.1038/s41571-019-0209-1. ISSN 1759-4774. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/s41571-019-0209-1>
- LEVI, Fabio, Jacques FERLAY, Carlotta GALEONE, Franca LUCCHINI, Eva NEGRI, Peter BOYLE a Carlo LA VECCHIA, 2008. The changing pattern of kidney cancer incidence and mortality in Europe. *BJU International* [online]. 101(8), 949-958 [cit. 2020-07-27]. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2008.07451.x. ISSN 14644096. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1464-410X.2008.07451.x>
- LICHT, Mark R., Andrew C. NOVICK a Marlene GOORMASTIC, 1994. Nephron Sparing Surgery in Incidental Versus Suspected Renal Cell Carcinoma. *Journal of Urology* [online]. 152(1), 39-42 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1016/S0022-5347(17)32810-0. ISSN 0022-5347. Dostupné z: <http://www.jurology.com/doi/10.1016/S0022-5347%2817%2932810-0>

- LINDBLAD, P., 2016. Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. *Scandinavian Journal of Surgery*. 93(2), 88-96. ISSN 1457-4969. Dostupné také z: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/145749690409300202>
- LI, Pengxiang, Yu-Ning WONG, Katrina ARMSTRONG, Naomi HAAS, Prasun SUBEDI, Margaret DAVIS-CERONE a Jalpa A. DOSHI, 2016. Survival among patients with advanced renal cell carcinoma in the pretargeted versus targeted therapy eras. *Cancer Medicine* [online]. 5(2), 169-181 [cit. 2020-07-27]. DOI: 10.1002/cam4.574. ISSN 20457634. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/cam4.574>
- LIU, Ben, Qiqi MAO, Xiao WANG et al., 2013. Cruciferous Vegetables Consumption and Risk of Renal Cell Carcinoma: A Meta-Analysis. *Nutrition and Cancer* [online]. 65(5), 668-676 [cit. 2020-07-27]. DOI: 10.1080/01635581.2013.795980. ISSN 0163-5581. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01635581.2013.795980>
- LJUNGBERG, Börje, Laurance ALBIGES, Yasmin ABU-GHANEM et al., 2019. European Association of Urology Guidelines on Renal Cell Carcinoma: The 2019 Update. *European Urology* [online]. 75(5), 799-810 [cit. 2020-07-30]. DOI: 10.1016/j.eururo.2019.02.011. ISSN 03022838. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0302283819301526>
- LJUNGBERG, Borje, Karim BENSALAH, Steven CANFIELD et al., 2015. EAU Guidelines on Renal Cell Carcinoma: 2014 Update. *European Urology* [online]. 67(5), 913-924 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1016/j.eururo.2015.01.005. ISSN 03022838. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0302283815000196>
- LUGO, Tracy G., Stephan BRAUN, Richard J. COTE, Klaus PANTEL a Valerie RUSCH, 2003. Detection and Measurement of Occult Disease for the Prognosis of Solid Tumors. *Journal of Clinical Oncology* [online]. 21(13), 2609-2615 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1200/JCO.2003.01.153. ISSN 0732-183X. Dostupné z: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2003.01.153>
- MACLEOD, Liam C., James M. HOTALING, Jonathan L. WRIGHT, Michael T. DAVENPORT, John L. GORE, Jonathan HARPER a Emily WHITE, 2013. Risk Factors for Renal Cell Carcinoma in the VITAL Study. *Journal of Urology* [online]. 190(5), 1657-1661 [cit. 2020-07-27]. DOI: 10.1016/j.juro.2013.04.130. ISSN 0022-5347. Dostupné z: <http://www.jurology.com/doi/10.1016/j.juro.2013.04.130>
- MAIA, Manuel Caitano, Paulo Gustavo BERGEROT, Nazli DIZMAN, JoAnn HSU, Jeremy JONES, Richard B. LANMAN, Kimberly C. BANKS a Sumanta K. PAL, 2017. Association of Circulating Tumor DNA (ctDNA) Detection in Metastatic Renal Cell Carcinoma (mRCC) with Tumor Burden. *Kidney Cancer* [online]. 1(1), 65-70 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.3233/KCA-170007. ISSN 24684562. Dostupné z: <https://www.medra.org/servlet/aliasResolver?alias=iospress&doi=10.3233/KCA-170007>
- MALAEB, Bahaa S., David J. MARTIN, Fred N. LITTOOY, Yair LOTAN, William B. WATERS, Robert C. FLANIGAN a Kenneth S. KOENEMAN, 2005. The utility of screening renal ultrasonography: identifying renal cell carcinoma in an elderly asymptomatic population. *BJU International* [online]. 95(7), 977-981 [cit. 2020-07-27]. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2005.05451.x. ISSN 1464-4096. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1464-410X.2005.05451.x>
- MANDRIOTA, Stefano J, Kevin J TURNER, David R DAVIES et al., 2002. HIF activation identifies early lesions in VHL kidneys. *Cancer Cell* [online]. 1(5), 459-468 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1016/S1535-6108(02)00071-5. ISSN 15356108. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610802000715>
- MASUDA, Taka-Aki, Akemi KATAOKA, Shinji OHNO et al., 2005. Detection of occult cancer cells in peripheral blood and bone marrow by quantitative RT-PCR assay for cytokeratin-7 in breast cancer patients. *International Journal of Oncology* [online]. [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.3892/ijo.26.3.721. ISSN 1019-6439. Dostupné z: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.26.3.721>

- MÉJEAN, Arnaud, Alain RAVAUD, Simon THEZENAS et al., 2018. Sunitinib Alone or after Nephrectomy in Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine* [online]. 379(5), 417-427 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1056/NEJMoa1803675. ISSN 0028-4793. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1803675>
- MICKISCH, GHJ, A GARIN, H VAN POPPEL, L DE PRIJCK a R SYLVESTER, 2001. Radical nephrectomy plus interferon-alfa-based immunotherapy compared with interferon alfa alone in metastatic renal-cell carcinoma: a randomised trial. *The Lancet* [online]. 358(9286), 966-970 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1016/S0140-6736(01)06103-7. ISSN 01406736. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673601061037>
- MIHARA, Shuichi, Keiichiro KURODA, Ritsuko YOSHIOKA a Wasaku KOYAMA, 1999. Early detection of renal cell carcinoma by ultrasonographic screening—based on the results of 13 years screening in Japan. *Ultrasound in Medicine & Biology* [online]. 25(7), 1033-1039 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1016/S0301-5629(99)00070-8. ISSN 03015629. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301562999000708>
- MITCHELL, Thomas J., Samra TURAJLIC, Andrew ROWAN et al., 2018. Timing the Landmark Events in the Evolution of Clear Cell Renal Cell Cancer: TRACERx Renal. *Cell* [online]. 173(3), 611-623 [cit. 2020-07-27]. DOI: 10.1016/j.cell.2018.02.020. ISSN 00928674. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867418301648>
- MOCH, Holger, Antonio L. CUBILLA, Peter A. HUMPHREY, Victor E. REUTER a Thomas M. ULBRIGHT, 2016. The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part A: Renal, Penile, and Testicular Tumours. *European Urology* [online]. 70(1), 93-105 [cit. 2020-07-27]. DOI: 10.1016/j.eururo.2016.02.029. ISSN 03022838. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0302283816002062>
- MORRISSEY, Jeremiah J., Amy N. LONDON, Matthew C. LAMBERT a Evan D. KHARASCH, 2011. Sensitivity and Specificity of Urinary Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin and Kidney Injury Molecule-1 for the Diagnosis of Renal Cell Carcinoma. *American Journal of Nephrology* [online]. 34(5), 391-398 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1159/000330851. ISSN 0250-8095. Dostupné z: <https://www.karger.com/Article/FullText/330851>
- MORRISSEY, Jeremiah J., Amy N. LONDON, Jingqin LUO a Evan D. KHARASCH, 2010. Urinary Biomarkers for the Early Diagnosis of Kidney Cancer. *Mayo Clinic Proceedings* [online]. 85(5), 413-421 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.4065/mcp.2009.0709. ISSN 00256196. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0025619611603261>
- MOTZER, Robert J., Bernard ESCUDIER, David F. MCDERMOTT et al., 2015b. Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine* [online]. 373(19), 1803-1813 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1056/NEJMoa1510665. ISSN 0028-4793. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1510665>
- MOTZER, Robert J., Brian I. RINI, David F. MCDERMOTT et al., 2015a. Nivolumab for Metastatic Renal Cell Carcinoma: Results of a Randomized Phase II Trial. *Journal of Clinical Oncology* [online]. 33(13), 1430-1437 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1200/JCO.2014.59.0703. ISSN 0732-183X. Dostupné z: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2014.59.0703>
- MOTZER, Robert J., Nizar M. TANNIR, David F. MCDERMOTT et al., 2018. Nivolumab plus Ipilimumab versus Sunitinib in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine* [online]. 378(14), 1277-1290 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1056/NEJMoa1712126. ISSN 0028-4793. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1712126>
- MUŽÍK, J, L DUŠEK, M BABJUK, M KUBÁSEK, J FÍNEK a L PETRUŽELKA, 2020. Uroweb – webový portál pro analýzu a vizualizaci epidemiologie, diagnostiky a léčby urologických malignit. *UROWEB*: ISSN 1804-6371 [online]. Brno: Masarykova univerzita [cit. 2020-07-30]. Dostupné z: <http://www.uroweb.cz>
- NAGRATH, Sunitha, Lecia V. SEQUIST, Shyamala MAHESWARAN et al., 2007. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature* [online].

- 450(7173), 1235-1239 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1038/nature06385. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nature06385>
- NAOE, Michio, Yoshio OGAWA, Kumiko TAKESHITA, Sanju IWAMOTO a Akira MIYAZAKI, 2008. Use of the CellSearch™ Circulating Tumor Cell Test for Monitoring Urothelial Cancer: Two Case Reports of Metastatic Urothelial Cancer. *Southern Medical Journal* [online]. 101(4), 439-441 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1097/SMJ.0b013e3181684fe1. ISSN 0038-4348. Dostupné z: <http://sma.org/southern-medical-journal/article/use-of-the-cellsearch-circulating-tumor-cell-test-for-monitoring-urothelial-cancer-two-case-reports-of-metastatic-urothelial-cancer>
- NEGRIER, Sylvie, Bernard ESCUDIER, Christine LASSET et al., 1998. Recombinant Human Interleukin-2, Recombinant Human Interferon Alfa-2a, or Both in Metastatic Renal-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine* [online]. 338(18), 1272-1278 [cit. 2020-07-27]. DOI: 10.1056/NEJM199804303381805. ISSN 0028-4793. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJM199804303381805>
- NISMAN, Benjamin, Vladimir YUTKIN, Hovav NECHUSHTAN, Ofer N. GOFRIT, Tamar PERETZ, Simon GRONOWITZ a Dov PODE, 2010. Circulating Tumor M2 Pyruvate Kinase and Thymidine Kinase 1 Are Potential Predictors for Disease Recurrence in Renal Cell Carcinoma After Nephrectomy. *Urology* [online]. 76(2), 5131-5136 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1016/j.urology.2010.04.034. ISSN 00904295. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0090429510005959>
- OCK, Chan-Young, Bhumsuk KEAM, Sehui KIM et al., 2016. Pan-Cancer Immunogenomic Perspective on the Tumor Microenvironment Based on PD-L1 and CD8 T-Cell Infiltration. *Clinical Cancer Research* [online]. 22(9), 2261-2270 [cit. 2020-07-30]. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2834. ISSN 1078-0432. Dostupné z: <http://clincancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1078-0432.CCR-15-2834>
- PALSDOTTIR, Helga Bjork, Sverrir HARDARSON, Vigdis PETURSDOTTIR, Armann JONSSON, Eirikur JONSSON, Martin Ingi SIGURDSSON, Gudmundur Vikar EINARSSON a Tomas GUDBJARTSSON, 2012. Incidental Detection of Renal Cell Carcinoma is an Independent Prognostic Marker: Results of a Long-Term, Whole Population Study. *Journal of Urology* [online]. 187(1), 48-53 [cit. 2020-07-30]. DOI: 10.1016/j.juro.2011.09.025. ISSN 0022-5347. Dostupné z: <http://www.jurology.com/doi/10.1016/j.juro.2011.09.025>
- PAL, Sumanta K., Guru SONPAVDE, Neeraj AGARWAL et al., 2017. Evolution of Circulating Tumor DNA Profile from First-line to Subsequent Therapy in Metastatic Renal Cell Carcinoma. *European Urology* [online]. 72(4), 557-564 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1016/j.eururo.2017.03.046. ISSN 03022838. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0302283817302774>
- PANTEL, Klaus a Catherine ALIX-PANABIÈRES, 2007. The clinical significance of circulating tumor cells. *Nature Clinical Practice Oncology* [online]. 4(2), 62-63 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1038/nponc0737. ISSN 1743-4254. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nponc0737>
- PANTEL, Klaus, Ruud H. BRAKENHOFF a Burkhard BRANDT, 2008. Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nature Reviews Cancer* [online]. 8(5), 329-340 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1038/nrc2375. ISSN 1474-175X. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nrc2375>
- PAPWORTH, Karin, Anders BERGH, Kjell GRANKVIST, Börje LJUNGBERG, Johanna SANDLUND a Torgny RASMUSON, 2012. Osteopontin but not parathyroid hormone-related protein predicts prognosis in human renal cell carcinoma. *Acta Oncologica* [online]. 52(1), 159-165 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.3109/0284186X.2012.693623. ISSN 0284-186X. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/0284186X.2012.693623>
- PATARD, J.-J., A. RODRIGUEZ, N. RIOUX-LECLERCQ, F. GUILLÉ a B. LOBEL, 2002. Prognostic significance of the mode of detection in renal tumours. *BJU International* [online].

- 90(4), 358-363 [cit. 2020-07-27]. DOI: 10.1046/j.1464-410X.2002.02910.x. ISSN 14644096. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1464-410X.2002.02910.x>
- PATERLINI-BRECHOT, Patrizia a Naoual Linda BENALI, 2007. Circulating tumor cells (CTC) detection: Clinical impact and future directions. *Cancer Letters* [online]. 253(2), 180-204 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1016/j.canlet.2006.12.014. ISSN 03043835. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383506006860>
- RAJANDRAM, R., N.Y. YAP, J. PAILOOR, A.H.A. RAZACK, K.L. NG, T.A. ONG, C. MORAIS a G.C. GOBE, 2014. Tumour necrosis factor receptor-associated factor-1 (TRAF-1) expression is increased in renal cell carcinoma patient serum but decreased in cancer tissue compared with normal: potential biomarker significance. *Pathology* [online]. 46(6), 518-522 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1097/PAT.000000000000145. ISSN 00313025. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031302516305360>
- REU, BJ a G RETTENMAIER, 1994. Der Nieren tumor als sonographischer zufallsbefund. *Ultraschall Med.* 15(15), 163-7.
- RINI, Brian I., Elizabeth R. PLIMACK, Viktor STUS et al., 2019. Pembrolizumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine* [online]. 380(12), 1116-1127 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1056/NEJMoa1816714. ISSN 0028-4793. Dostupné z: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1816714>
- RINI, Brian I, Thomas POWLES, Michael B ATKINS et al., 2019. Atezolizumab plus bevacizumab versus sunitinib in patients with previously untreated metastatic renal cell carcinoma (IMmotion151): a multicentre, open-label, phase 3, randomised controlled trial. *The Lancet* [online]. 393(10189), 2404-2415 [cit. 2020-07-30]. DOI: 10.1016/S0140-6736(19)30723-8. ISSN 01406736. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673619307238>
- RODRIGUEZ-RUBIO, F.I., F. DIEZ-CABALLERO, A. MARTIN-MARQUINA, J.I. ABAD a J.M. BERIAN, 1996. Incidentally detected renal cell carcinoma. *BJU International* [online]. 78(1), 29-32 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1046/j.1464-410X.1996.00536.x. ISSN 1464-4096. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1464-410X.1996.00536.x>
- ROSENBERG, R., R. GERTLER, J. FRIEDERICHS et al., 2002. Comparison of two density gradient centrifugation systems for the enrichment of disseminated tumor cells in blood. *Cytometry* [online]. 49(4), 150-158 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1002/cyto.10161. ISSN 0196-4763. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/cyto.10161>
- ROSSI, S. H., R. HSU, C. BLICK et al., 2017. Meta-analysis of the prevalence of renal cancer detected by abdominal ultrasonography. *British Journal of Surgery* [online]. 104(6), 648-659 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1002/bjs.10523. ISSN 00071323. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/bjs.10523>
- Screeningové programy MZČR [online], 2020. Česká Republika: MZČR [cit. 2020-07-30]. Dostupné z: <https://www.mzcr.cz/category/programy-a-strategie/screeningove-programy/>
- SEIDEN, M V, P W KANTOFF, K KRITHIVAS et al., 1994. Detection of circulating tumor cells in men with localized prostate cancer. *Journal of Clinical Oncology* [online]. 12(12), 2634-2639 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1200/JCO.1994.12.12.2634. ISSN 0732-183X. Dostupné z: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.1994.12.12.2634>
- ŞENBABA OĞLU, Yasin, Ron S. GEJMAN, Andrew G. WINER et al., 2016. Tumor immune microenvironment characterization in clear cell renal cell carcinoma identifies prognostic and immunotherapeutically relevant messenger RNA signatures. *Genome Biology* [online]. 17(1) [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1186/s13059-016-1092-z. ISSN 1474-760X. Dostupné z: <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13059-016-1092-z>
- SCHENA, F.P., F.P. SELVAGGI, L. GESUALDO, M. BATTAGLIA a Marco LOMBARDI, 2018. Malattie dei Reni e delle Vie Urinarie. *Giornale di Tecniche Nefrologiche e Dialitiche* [online]. 20(3-4), 37-37 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1177/039493620802003-410. ISSN 0394-9362. Dostupné z: <https://journals.aboutscience.eu/index.php/gcnd/article/view/1546>



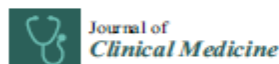
- SCHMIDT, Thorsten, Christian HOHL, Patrick HAAGE, Marcus BLAUM, Dagmar HONNEF, Claudia WEIß, Gundula STAATZ a R. W. GÜNTHER, 2003. Diagnostic Accuracy of Phase-Inversion Tissue Harmonic Imaging Versus Fundamental B-Mode Sonography in the Evaluation of Focal Lesions of the Kidney. *American Journal of Roentgenology* [online]. 180(6), 1639-1647 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.2214/ajr.180.6.1801639. ISSN 0361-803X. Dostupné z: <http://www.ajronline.org/doi/10.2214/ajr.180.6.1801639>
- SINGANAMALA, Swathi a Ursula C. BREWSTER, 2011. Should screening for acquired cystic disease and renal malignancy be undertaken in dialysis patients?. *Seminars in Dialysis* [online]. 24(4), 365-366 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1111/j.1525-139X.2011.00908.x. ISSN 08940959. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1525-139X.2011.00908.x>
- SOEKOJO, Cinnie, Sanjay DE MEL, Melissa OOI, Benedict YAN a Wee CHNG, 2018. Potential Clinical Application of Genomics in Multiple Myeloma. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 19(6) [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.3390/ijms19061721. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/19/6/1721>
- STARKE, Nathan, Nirmish SINGLA, Ahmed HADDAD a Yair LOTAN, 2016. Long-term outcomes in a high-risk bladder cancer screening cohort. *BJU International* [online]. 117(4), 611-617 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1111/bju.13154. ISSN 14644096. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/bju.13154>
- TAHBAZ, Rana, Marianne SCHMID a Axel S. MERSEBURGER, 2018. Prevention of kidney cancer incidence and recurrence. *Current Opinion in Urology* [online]. 28(1), 62-79 [cit. 2020-07-27]. DOI: 10.1097/MOU.0000000000000454. ISSN 0963-0643. Dostupné z: <https://journals.lww.com/00042307-201801000-00011>
- TAKACOVA, MARTINA, MARIA BARTOSOVA, LUCIA SKVARKOVA et al., 2013. Carbonic anhydrase IX is a clinically significant tissue and serum biomarker associated with renal cell carcinoma. *Oncology Letters* [online]. 5(1), 191-197 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.3892/ol.2012.1001. ISSN 1792-1074. Dostupné z: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2012.1001>
- TANAKA, Toshiaki, Hiroshi KITAMURA, Toshihiko TORIGOE, Yoshihiko HIROHASHI, Eiji SATO, Naoya MASUMORI, Noriyuki SATO a Taiji TSUKAMOTO, 2011. Autoantibody against hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase-3 is a potential serological marker for renal cell carcinoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* [online]. 137(5), 789-794 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1007/s00432-010-0940-6. ISSN 0171-5216. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00432-010-0940-6>
- THOMPSON, Ian M. a Michael PEEK, 1988. Improvement in Survival of Patients with Renal Cell Carcinoma—The Role of the Serendipitously Detected Tumor. *Journal of Urology* [online]. 140(3), 487-490 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1016/S0022-5347(17)41698-3. ISSN 0022-5347. Dostupné z: <http://www.jurology.com/doi/10.1016/S0022-5347%2817%2941698-3>
- THOMPSON, R. H., M. D. GILLET, J. C. CHEVILLE et al., 2004. Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: Indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 101(49), 17174-17179 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1073/pnas.0406351101. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0406351101>
- THOMPSON, R. Houston, Haidong DONG a Eugene D. KWON, 2007. Implications of B7-H1 Expression in Clear Cell Carcinoma of the Kidney for Prognostication and Therapy. *Clinical Cancer Research* [online]. 13(2), 709-715 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1868. ISSN 1078-0432. Dostupné z: <http://clincancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1078-0432.CCR-06-1868>
- TOIYAMA, DAISUKE, NATSUKI TAKAHA, MASAHIDE SHINNOH et al., 2013. Significance of serum tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand as a prognostic biomarker for renal cell carcinoma. *Molecular and Clinical Oncology* [online]. 1(1), 69-74

- [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.3892/mco.2012.35. ISSN 2049-9450. Dostupné z: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/mco.2012.35>
- TRZPIS, Monika, Pamela M.J. MCLAUGHLIN, Lou M.F.H. DE LEIJ a Martin C. HARMSSEN, 2007. Epithelial Cell Adhesion Molecule. *The American Journal of Pathology* [online]. 171(2), 386-395 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.2353/ajpath.2007.070152. ISSN 00029440. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944010619724>
- TSUI, KE-HUNG, OLEG SHVARTS, ROBERT B. SMITH, ROBERT FIGLIN, JEAN B. DE KERNION a ARIE BELLDEGRUN, 2000. RENAL CELL CARCINOMA: PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF INCIDENTALY DETECTED TUMORS. *Journal of Urology* [online]. 163(2), 426-430 [cit. 2020-07-27]. DOI: 10.1016/S0022-5347(05)67892-5. ISSN 0022-5347. Dostupné z: <http://www.jurology.com/doi/10.1016/S0022-5347%2805%2967892-5>
- TSUI, KE-HUNG, OLEG SHVARTS, ROBERT B. SMITH, ROBERT FIGLIN, JEAN B. DE KERNION a ARIE BELLDEGRUN, 2000. RENAL CELL CARCINOMA: PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF INCIDENTALY DETECTED TUMORS. *Journal of Urology* [online]. 163(2), 426-430 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1016/S0022-5347(05)67892-5. ISSN 0022-5347. Dostupné z: <http://www.jurology.com/doi/10.1016/S0022-5347%2805%2967892-5>
- TURAJLIC, Samra, Hang XU, Kevin LITCHFIELD et al., 2018a. Deterministic Evolutionary Trajectories Influence Primary Tumor Growth: TRACERx Renal. *Cell* [online]. 173(3), 595-61011 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1016/j.cell.2018.03.043. ISSN 00928674. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867418303751>
- TURAJLIC, Samra, Hang XU, Kevin LITCHFIELD et al., 2018b. Tracking Cancer Evolution Reveals Constrained Routes to Metastases: TRACERx Renal. *Cell* [online]. 173(3), 581-59412 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1016/j.cell.2018.03.057. ISSN 00928674. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867418303891>
- Ústav Zdravotnických Informací a Statistiky [online], 2020. Česká Republika: NZIS [cit. 2020-07-30]. Dostupné z: <http://www.uzis.cz>
- VALASTYAN, Scott a Robert A. WEINBERG, 2011. Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. *Cell* [online]. 147(2), 275-292 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1016/j.cell.2011.09.024. ISSN 00928674. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867411010853>
- WAHLGREN, T, U HARMENBERG, P SANDSTRÖM, S LUNDSTAM, J KOWALSKI, M JAKOBSSON, R SANDIN a B LJUNGBERG, 2013. Treatment and overall survival in renal cell carcinoma: a Swedish population-based study (2000–2008). *British Journal of Cancer* [online]. 108(7), 1541-1549 [cit. 2020-07-27]. DOI: 10.1038/bjc.2013.119. ISSN 0007-0920. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/bjc2013119>
- WANHAINEN, Anders, Rebecka HULTGREN, Anneli LINNÉ et al., 2016. Outcome of the Swedish Nationwide Abdominal Aortic Aneurysm Screening Program. *Circulation* [online]. 134(16), 1141-1148 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.022305. ISSN 0009-7322. Dostupné z: <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.022305>
- WEIKERT, S., H. BOEING, T. PISCHON et al., 2008. Blood Pressure and Risk of Renal Cell Carcinoma in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *American Journal of Epidemiology* [online]. 167(4), 438-446 [cit. 2020-07-27]. DOI: 10.1093/aje/kwm321. ISSN 0002-9262. Dostupné z: <https://academic.oup.com/aje/article-lookup/doi/10.1093/aje/kwm321>
- WHITE, Nicole M.A., Olena MASUI, Leroi V. DESOUZA et al., 2014. Quantitative proteomic analysis reveals potential diagnostic markers and pathways involved in pathogenesis of renal cell carcinoma. *Oncotarget* [online]. 5(2), 506-518 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.18632/oncotarget.1529. ISSN 1949-2553. Dostupné z: <https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.1529>
- WIEDSWANG, Gro, Elin BORGÉN, Cecilie SCHIRMER, Rolf KÅRESEN, Gunnar KVALHEIM, Jahn M. NESLAND a Bjørn NAUME, 2006. Comparison of the clinical

- significance of occult tumor cells in blood and bone marrow in breast cancer. *International Journal of Cancer* [online]. 118(8), 2013-2019 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1002/ijc.21576. ISSN 00207136. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.21576>
- WIND, J., J.B. TUYNMAN, A.G.J. TIBBE, J.F. SWENNENHUIS, D.J. RICHEL, M.I. VAN BERGE HENEGOUWEN a W.A. BEMELMAN, 2009. Circulating tumour cells during laparoscopic and open surgery for primary colonic cancer in portal and peripheral blood. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)* [online]. 35(9), 942-950 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1016/j.ejso.2008.12.003. ISSN 07487983. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0748798308018702>
- WONG, G., K. HOWARD, A. C. WEBSTER, J. R. CHAPMAN a J. C. CRAIG, 2011. Screening for renal cancer in recipients of kidney transplants. *Nephrology Dialysis Transplantation* [online]. 26(5), 1729-1739 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1093/ndt/gfq627. ISSN 0931-0509. Dostupné z: <https://academic.oup.com/ndt/article-lookup/doi/10.1093/ndt/gfq627>
- WU, C. H., S. R. LIN, J. S. HSIEH et al., 2006. Molecular Detection of Disseminated Tumor Cells in the Peripheral Blood of Patients with Gastric Cancer: Evaluation of Their Prognostic Significance. *Disease Markers* [online]. 22(3), 103-109 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1155/2006/281315. ISSN 0278-0240. Dostupné z: <http://www.hindawi.com/journals/dm/2006/281315/abs/>
- YAMAMOTO, Yoshiyuki, Motohide UEMURA, Kosuke NAKANO et al., 2018. Increased level and fragmentation of plasma circulating cell-free DNA are diagnostic and prognostic markers for renal cell carcinoma. *Oncotarget* [online]. 9(29), 20467-20475 [cit. 2020-07-30]. DOI: 10.18632/oncotarget.24943. ISSN 1949-2553. Dostupné z: <https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.24943>
- YATES, Lucy R. a Peter J. CAMPBELL, 2012. Evolution of the cancer genome. *Nature Reviews Genetics* [online]. 13(11), 795-806 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1038/nrg3317. ISSN 1471-0056. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/nrg3317>
- YILDIZ, Ibrahim, Fatma SEN, Leyla KILIC et al., 2013. Serum M65 as a Biomarker for Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Clinical Genitourinary Cancer* [online]. 11(3), 290-296 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1016/j.clgc.2013.01.001. ISSN 15587673. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1558767313000025>
- ZHU, Jason, Andrew J. ARMSTRONG, Terence W. FRIEDLANDER, Won KIM, Sumanta K. PAL, Daniel J. GEORGE a Tian ZHANG, 2018. Biomarkers of immunotherapy in urothelial and renal cell carcinoma: PD-L1, tumor mutational burden, and beyond. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* [online]. 6(1) [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1186/s40425-018-0314-1. ISSN 2051-1426. Dostupné z: <http://jitc.bmj.com/lookup/doi/10.1186/s40425-018-0314-1>
- ZIZZARI, Ilaria Grazia, Chiara NAPOLETANO, Andrea BOTTICELLI et al., 2018. TK Inhibitor Pazopanib Primes DCs by Downregulation of the  $\beta$ -Catenin Pathway. *Cancer Immunology Research* [online]. 6(6), 711-722 [cit. 2020-07-28]. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-17-0594. ISSN 2326-6066. Dostupné z: <http://cancerimmunolres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/2326-6066.CIR-17-0594>

## PŘÍLOHA č. 1

### Publikace Klézl P a kol.: Detection of Circulating tumor Cells in Renal Cell Carcinoma: Disease Stage Correlation and Molecular Characterization



Article

#### Detection of Circulating Tumor Cells in Renal Cell Carcinoma: Disease Stage Correlation and Molecular Characterization

Petr Klezl<sup>1</sup>, Eliska Pospisilova<sup>1,2</sup>, Katarina Kolostova<sup>2</sup>, Jindrich Sonsky<sup>1</sup>, Ondrej Maly<sup>2</sup>, Robert Grill<sup>1</sup>, Ireneusz Pawlak<sup>3</sup> and Vladimir Bobek<sup>2,3,4,5,6,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Urology, University Hospital Kralovske Vinohrady, 3rd Faculty of Medicine Charles University in Prague, Srobarova 50, 10034 Prague, Czech Republic; klezl@volny.cz (P.K.); eliska.pospisilova@outlook.cz (E.P.); jindrich.sonsky@fnkv.cz (J.S.); robert.grill@fnkv.cz (R.G.)

<sup>2</sup> Department of Laboratory Genetics, University Hospital Kralovske Vinohrady, Srobarova 50, 10034 Prague, Czech Republic; katarina.kolostova@gmail.com (K.K.); ondmaly@gmail.com (O.M.)

<sup>3</sup> Department of Thoracic Surgery, Lower Silesian Cancer Center, Wroclaw, Plac Ludwika Hirszfelda 12, 53-413 Wroclaw, Poland; ireneusz.pawlak@pco.com.pl

<sup>4</sup> 3rd Department of Surgery University Hospital Motol, 1st Faculty of Medicine Charles University, V Uvalu 84, 150 06 Prague, Czech Republic

<sup>5</sup> Department of Histology and Embryology, Wroclaw Medical University, Wybrzeze Ludwika Pasteura 1, 50-367 Wroclaw, Poland

<sup>6</sup> Department of Thoracic Surgery, Masaryk's Hospital, Krajska zdravotni a.s., Socialni pece 3316/12A, 40113 Usti nad Labem, Czech Republic

\* Correspondence: vbobek@centrum.cz; Tel: +420-26716-31-42

Received: 22 March 2020; Accepted: 28 April 2020; Published: 7 May 2020



**Abstract:** The presence of circulating tumor cells (CTCs) in patients with solid tumors is associated with poor prognosis. However, there are limited data concerning the detection of CTCs in renal cell cancer (RCC). The aim of this study is to evaluate the presence of CTCs in peripheral blood of patients with RCC undergoing surgery (n = 186). CTCs were tested before and after surgery as well as during the follow-up period afterwards. In total 495 CTC testing in duplicates were provided. To enrich CTCs, a size-based separation protocol and tube MetaCell<sup>®</sup> was used. CTCs presence was evaluated by single cell cytomorphology based on vital fluorescence microscopy. Additionally, to standardly applied fluorescence stains, CTCs viability was controlled by mitochondrial activity. CTCs were detected independently on the sampling order in up to 86.7% of the tested blood samples in patients undergoing RCC surgery. There is higher probability of CTC detection with growing tumor size, especially in clear cell renal cell cancer (ccRCC) cases. Similarly, the tumor size corresponds with metastasis presence and lymph node positivity and CTC detection. This paper describes for the first-time successful analysis of viable CTCs and their mitochondria as a part of the functional characterization of CTCs in RCC.

**Keywords:** CTCs; renal cancer; culturing; in vitro; MetaCell; gene expression; immunotherapy; PDL-1

#### 1. Introduction

Radical or partial nephrectomy remains the only curative treatment for RCC. More than 30% of localized renal cell carcinoma (RCC) recur or metastasize after surgery [1]. RCC is a paradigm of chemoresistant cancer. Even in combination with immunotherapy, chemotherapy is associated with low response rates [2,3]. RCC is a highly invasive cancer which could benefit from non-invasive biomarkers

for early diagnosis and disease monitoring. Liquid biopsy, in particular the circulating tumor cells (CTCs), offer a promising tool for assessment of the tumor burden and tumor invasion capability.

CTCs are an undeniable part of a connection between primary tumors and secondary metastatic sites. The CTC examination belongs to the group of liquid biopsy tests, which provide more detailed information on heterogeneity of tumor disease in patients, under minimally invasive procedures (e.g., blood withdrawal).

The CTCs represent a possible tool in monitoring this kind of tumor evolution in time. As defined in liquid dynamic medicine [4], where a patient is a control subject to himself during the treatment, we may evaluate the cancer cell changes enabling personalization of oncological therapy.

The main target of the presented study is to monitor CTC presence in patients with renal cell carcinoma undergoing surgery. Next, cytomorphology of CTCs was evaluated by means of vital fluorescence microscopy with a special focus on mitochondrial network evaluation.

Since complete removal of metastatic lesions has a significant potential to improve prognosis of RCC, we believe CTCs could be a helpful tool in reassessing metastasis infiltration in patients with advanced form of the disease.

We believe that future molecular analysis of CTCs may support progress in RCC treatment, covering multiple aspects of RCC biology as well in blood as in tissue. CTCs may become a part of clinical studies testing efficiency of new drug treatment (Figure 1).

### CTC – detection in peripheral blood

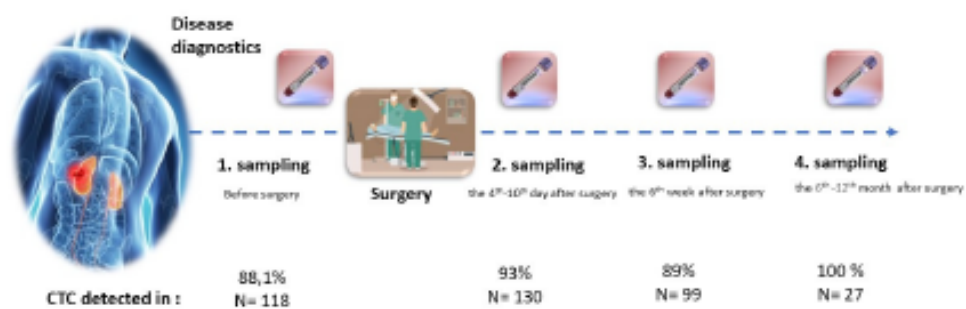


Figure 1. Schedule of blood collection.

## 2. Materials and Methods

Total number of 186 patients ( $n = 186$ ) who underwent surgical renal resection because of tumor mass presence were included into the study in 2016–2018. Peripheral blood ( $2 \times 8$  mL, EDTA) was taken in several time points: 1. before surgery, 2. within 24 hours after surgery, 3. at 2-week follow-up, 4. at follow-up every 6 months; between 2 and 4 blood withdrawals were done per patient. In total 495 CTCs tests were performed. The CTCs test is based on duplicates evaluation.

To enrich CTCs a size-based separation protocol and tube MetaCell® was used [5–8]. CTC presence is evaluated by single cell cytomorphology, which could be followed by molecular testing (e.g., qPCR analysis, sequencing) or standard immunohistochemistry. Total of 186 patients diagnosed with RCC have been enrolled in the study in accordance with the Declaration of Helsinki and ethical committee approval was granted. All patients were candidates for surgical treatment. Informed consent was obtained from each patient before any clinical data were collected. The patient characteristics are shown in Table 1. For each patient, approximately  $2 \times 8$  mL of venous blood was drawn from the cubital veins and placed into S-Monovette tubes (Sarstedt AG & Co., Numbrecht, Germany) containing 1.6 mg EDTA/mL blood as an anticoagulant. The samples were processed at room temperature using an isolation procedure completed within 24 hours after the blood draw.

**Table 1.** Patient characteristics.

All		Primary Tumor Diameter (mm)				Total	
All		49.3				168	
CTC positive		50.08				137	
CTC negative		34.9				20	
Not evaluable		63.81				11	

CTC	CTC Positive		CTC Negative		Not evaluable	Total Samples	Patients
	Patients	In %	Patients	In %			
Clear cell RCC	270	85.99	33	10.51	11	314	119
Papillary RCC	56	84.85	7	10.61	3	66	22
Clear cell RCC and Papillary RCC	11	84.62	2	15.38		13	4
Chromophobe RCC	19	76.00	4	16.00	2	25	8

CTC	Type	CTC Positive		CTC Negative		Not Evaluable	Total
		Patients	In %	Patients	In %		
1. sampling	Clear cell RCC	21	75.00	5	17.86	2	28
1. sampling	Papillary RCC and others	13	68.42	4	21.05	2	19
2. sampling	Clear cell RCC	27	96.43	1	3.57		28
2. sampling	Papillary RCC and others	18	94.74	1	5.26		19
3. sampling	Clear cell RCC	24	85.71	4	14.29		28
3. sampling	Papillary RCC and others	18	94.74			1	19
4. sampling	Clear cell RCC	28	100.00				28
4. sampling	Papillary RCC and others	18	94.74	1	5.26		19

### 2.1. CTCs Enrichment and Culture

A size-based separation method for viable CTC-enrichment from peripheral blood was used (MetaCell®, MetaCell s.r.o., Ostrava, Czech Republic) [3–5].

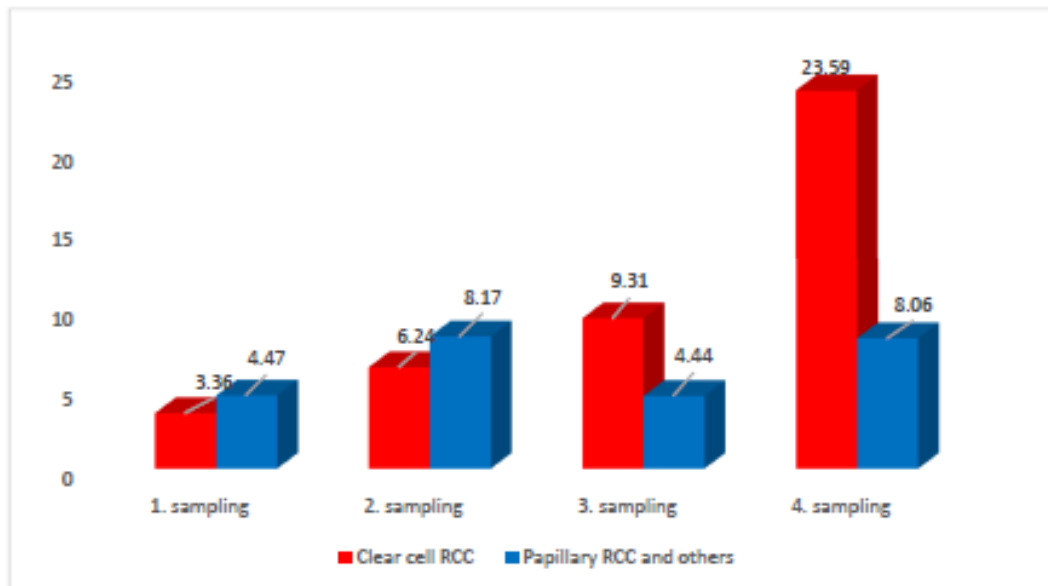
The complex of separation membrane filter, which is kept in a plastic ring, was transferred directly with enriched cells into a 6-well culture plate. Total of 4 mL RPMI media is added to the filter top and enriched cells are cultured on the membrane in vitro under standard cell culture conditions (37 °C, 5% CO<sub>2</sub> atmosphere) and observed using an inverted microscope. CTCs are grown in FBS-enriched RPMI medium (10%) for a period of minimum 3–5 days. A microscopic slide was placed under the separation membrane and CTCs may naturally grow invasively and set up new cell colonies on the microscopic slide. A microscopic slide culture is preferred if immunohistochemistry/immunofluorescence analysis is planned.

### 2.2. Cytomorphological Analysis

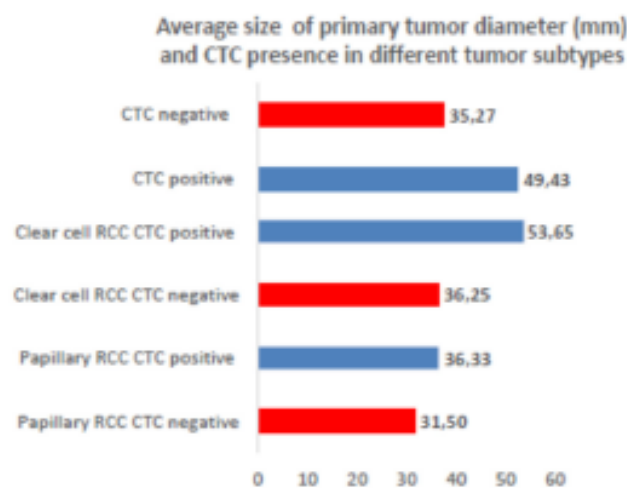
The viable cells stained by vital fluorescence stains (Celltracker, NucBleu, Mitotracker, Thermofisher Scientific, Waltham, MA, USA) were examined using fluorescence microscopy in three steps: (i) Screening at x20 magnification to locate the cells, (ii) observation at x40 magnification for detailed cytomorphological analysis. Isolated cells and/or clusters of cells of interest (immunostained or not) were selected, digitized, and examined by an experienced researcher and/or pathologist. (iii) Evaluate the CTCs—number CTCs were defined as cells presenting the following characteristics: (a) Nuclear size equal to or larger than 15 µm; (b) irregularity of the nuclear contour; (c) presence of a visible cytoplasm and the size of the cell; (d) presence of prominent nucleoli and their number; (e) high nuclear-cytoplasmic ratio. The nuclear-cytoplasmic (N/C) ratio is evaluated with respect to the different morphology of growing cells in comparison to the N/C ratio in tissue samples.

### 2.3. Immunohistochemistry Analysis

Based on the standard immunohistochemistry protocols, cytokeratin and vimentin presence was tested in cells captured on the membranes. The membranes were fixed by air first at least for 24 hours. As next step, the immuno-histochemistry protocol was used as follows. Two antibody clones were used, pancytokeratin (SigmaAldrich, St. Louis, MO, USA) and vimentin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)



**Figure 3.** CTC—number (average per 1 mL of blood) detected in RCC patients for one-year follow-up in four blood samplings showing differences in CTC load between ccRCC and other RC types.



**Figure 4.** Relationships between tumor size and CTC positivity. The largest tumor diameter and higher CTC number were detected in RCC.

The metabolism of CTCs has been evaluated by mitochondria staining, which discovered an interesting mitochondrial network. The network was significantly different from the mitochondrial network observed in cells with a blood origin (e.g., basophils, monocytes, neutrophils).

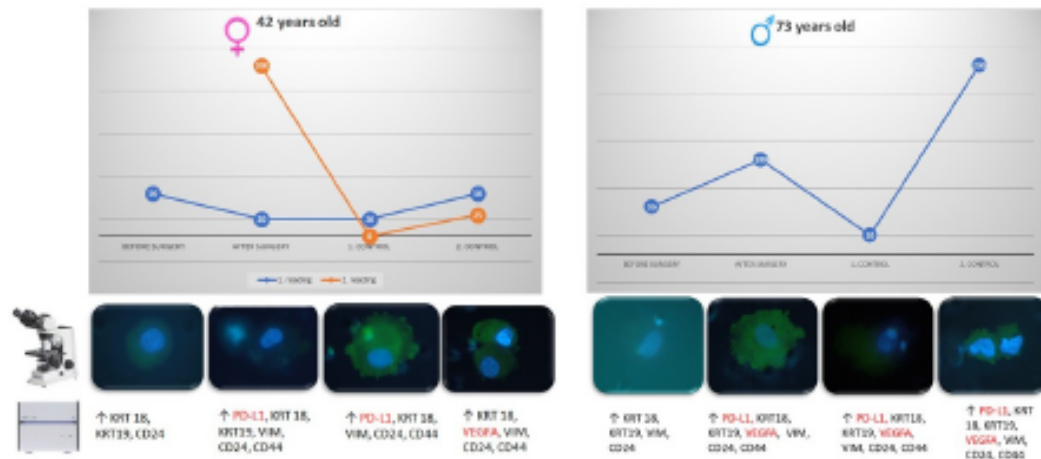
The blood cells and cancer cells may be easily distinguished by the very sophisticated mitochondrial network. To evaluate the mitochondrial network an automatized Image J evaluation procedure was used.

Parallel expression of cytokeratin and vimentin was revealed by immuno-histochemistry suggesting an ongoing epithelial mesenchymal transition.

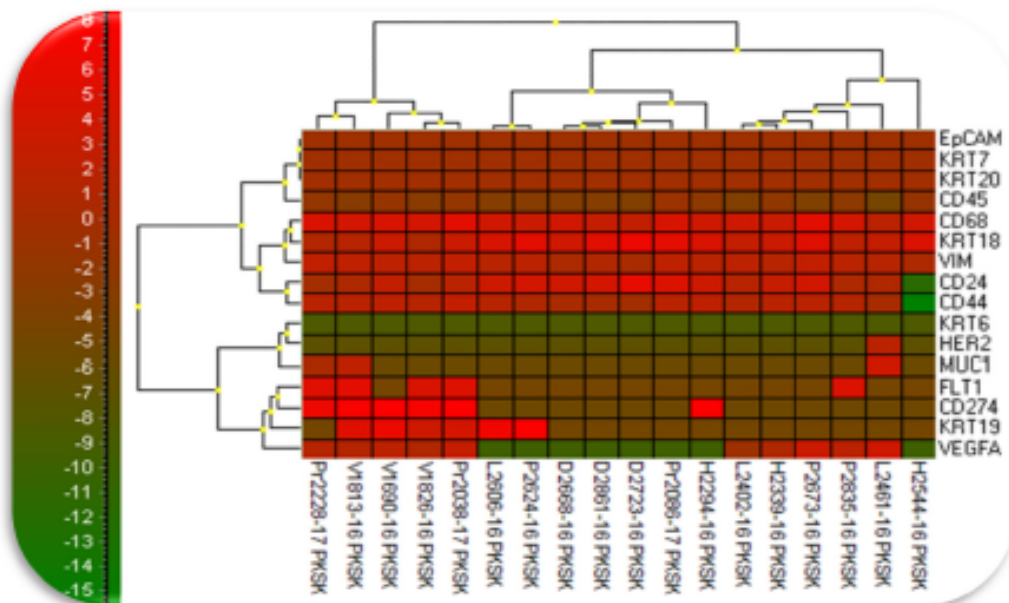
### 3.3. Gene Expression

Gene expression analysis revealed elevated gene expression in enriched CTCs for genes KRT18 (keratin 18), VIM (vimentin) when compared with the white blood cell fraction (Figure 5). Further, it showed that the character of CTCs undergoes changes during follow-up period (Figure 6). From the

therapeutic point of view the most interesting changes were seen in patients expressing elevated VEGF (vascular endothelial growth factor) and/or PD-L1 (programmed death ligand 1, CD274) on CTCs. VEGF and PD-L1 are shown on follow-up figures (Figure 5 below the graphs and Figure 7).

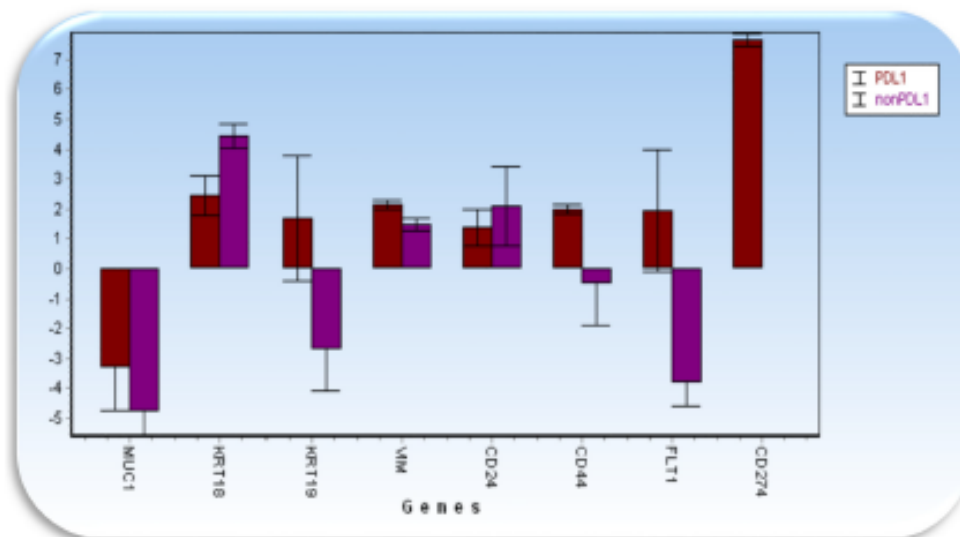


**Figure 5.** CTC follow-up during one-year period. We demonstrate changes during the four samplings not only in the CTC number (graph lines) and cytomorphology, but also in the gene expression (see elevated genes in CTCs below). Some of the genes with elevated expression could be used as markers to indicate specific therapy targets (e.g., VEGF, PD-L1). PD-L1 and VEGF expressions are shown in red.



**Figure 6.** Relative RNA amount displayed in clusters after gene expression analysis using GenEx vs.6-software. (MultiD Analyses AB, Goteborg, Sweden). Clear distinction between CTCs expressing PD-L1 is shown (see arrow-cluster on the left).





**Figure 7.** Gene expression analysis of CTC showing differences between the CTC PDL1+ (brown) and CTC PDL1- (violet). The arrows indicate genes expressed differentially between tested groups.

#### 4. Discussion

Only few studies have reported on CTC analysis in patients with RCC [9]. In general, detection of CTCs requires specific techniques able to overcome problems related to identification and isolation of tumors cells from blood. Indeed, there is not any specific marker that allows to uniquely distinguish a CTC from other blood cells, since tumors with different histological and molecular features express diverse patterns of markers, and even a single histological tumor type can present heterogeneous markers. Moreover, given the considerably small number of CTCs possibly present in peripheral blood when compared with the other blood circulating cells, enrichment techniques are necessary to increase the sensitivity to an acceptable level. We believe the observation of size-based enriched cells in a viable stage may help to distinguish the cancerous character of captured cells comparing the standard cytomorphological parameters and additionally mitochondrial network of tumorigenic vs. benign cells.

Intra-tumoral heterogeneity is a prominent feature of RCC, as evidenced by several groups using multiregional sequencing of RCC tumorous and metastatic tissues compared to sequencing of adjacent normal kidney tissue [10–12]. Cancer cells from RCC patients are prone to mesenchymal–epithelial transition (EMT) [13–15] and often lack epithelial antigens, which may impair their capture from blood and analysis when epithelial marker-dependent collection/detection methods are used.

For example, CellSearch system, platform only approved by FDA showed a very low detection rate in patients with localized and metastatic RCC [13]. The expression of EMT by RCC cancer cells resulting in a lack of epithelial adhesion molecules could partially explain the failure of this method.

Significant discrepancies between the number of CTC enumerated by the CellSearch and other filtration method (the ISET systems), were found in patients with lung cancer in a study by Farace et al. [16]. There were 30% of patients who were negative according to CellSearch while only 5% were negative using ISET. Concordant results only concern 47% patients. Similar results were described in study patients with RCC: CTCs were in 13 from 36 patients (36.1%) using ISET and only in 7 from 36 patients (19.4%) using the CellSearch platform [17]. In general, better detection of CTC in patients via filtration methods than CellSearch was documented in a number of studies [18]. The filtration systems may be much more efficient in identifying the circulating cells because CellSearch cannot detect the loss of epithelial markers which is associated with tumor cells undergoing the EMT process.

Our immune-histochemistry data have shown that CTCs from patients with RCC may express cytokeratines as well vimentin. The duality of the filaments confirms the dynamics of the changes found in the tumor masses.

A successful application of CTCs capture based on EpCAM positive has been very limited so far in metastatic RCC. High plasticity and heterogeneity of CTC morphology challenges currently available enrichment and detection techniques with EpCAM as the usual surface marker being underrepresented in metastatic RCC. The size-based separation method we presented in combination with a vital mitochondria stain enables to characterize non-hematopoietic cells in the peripheral blood stream with varying characteristics and define CTC subgroups that distinctly could be possibly associated with metastatic potential.

In general, early stages of RCC are not associated with clinical manifestation and so the early detection of the disease remains a significant challenge.

As the RCC is then later seen as a chemo-resistant disease it has to be considered that in the last few years several innovative treatment regimens have been developed for the management of metastatic RCC. In RCC increased understanding of genetics and molecular biology led to successful employment of agents targeting the VEGF and mTOR pathways [19]. But even if different treatment strategies are available, no response predictive markers have been included in clinical practice and so the choice between these different drugs is generally made by considering the clinical outcome, patient's preference, and toxicity profile of each agent. The resulting plurality of available treatment options is significantly limited by available parameters for a personalized implementation of these agents. We therefore believe testing CTCs profiles by gene expression analysis of the targetable genes, may change and improve RCC therapy outcomes.

Checkpoint inhibition targeting the programmed cell death 1 receptor (PD-1) pathway has become a common treatment across various tumor types. Nivolumab was the first-in-class PD-1 therapy and was approved for the treatment of RCC based on the results of a phase III trial comparing nivolumab with everolimus [20].

Over-expression of PD-L1 has been identified as a pathway that metastatic tumor cells use to evade immune detection. PD-L1 binds to PD-1 on T-cells and suppresses their activity. Immunotherapy based on inhibition of PD-1 or PD-L1 represents a breakthrough in the treatment of advanced cancers. Today, solid tumor patients are screened for PD-L1 expression on their tumor cells following a tissue biopsy. PD-L1 expression levels have been demonstrated to be a reasonable biomarker for stratifying patients that will respond better to immunotherapy.

Utilizing biopsies for this patient stratification does have its limitations. Specifically, tumor biopsies are risky, expensive, and cannot be performed serially to understand cancer status throughout the course of a treatment. Liquid biopsy may possibly illustrate disease control because it is minimally invasive and can easily be repeated. Unfortunately, low specificity is the biggest disadvantage of the presented size-based separation method. Second advantage is high sensitivity and isolation of viable cells with subsequent culturing. The isolation of whole cells provides further possibility of molecular characterization by specification of cells.

Measuring PD-L1 expression on CTCs through a simple blood draw represents a low risk approach to initial patient stratification with minimal cost and gives us an opportunity to monitor PD-L1 expression of patient tumor cells over the course of the disease.

**Author Contributions:** Conceptualization, J.S. and V.B.; data curation, P.K., E.P., I.P., J.S., O.M., and R.G.; formal analysis, P.K.; funding acquisition, I.P.; investigation, K.K.; methodology, K.K.; resources, I.P.; supervision, V.B.; writing—original draft, K.K.; writing—review and editing, V.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was supported by the Charles University, project GA UK No 1142119 and PROGRES Q-37 grant.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Motzer, R.J.; Bander, N.H.; Nanus, D.M. Renal-cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **1996**, *335*, 865–875. [CrossRef] [PubMed]
2. Gore, M.; Griffin, C.L.; Hancock, B.; Patel, P.M.; Pyle, L.; Aitchison, M.; James, N.; Oliver, R.T.D.; Mardiak, J.; Hussain, T.; et al. Interferon alfa-2a versus combination therapy with interferon alfa-2a, interleukin-2, and fluorouracil in patients with untreated metastatic renal cell carcinoma (MRC RE04/EORTC GU 30012): An open-label randomised trial. *Lancet* **2010**, *375*, 641–648. [CrossRef]
3. Motzer, R.J.; Russo, P. Systemic therapy for renal cell carcinoma. *J. Urol.* **2000**, *163*, 408–417. [CrossRef]
4. Silvestris, N.; Ciliberto, G.; De Paoli, P.; Apolone, G.; Lavitrano, M.L.; Pierotti, M.A.; Stanta, G. On the behalf of the “dynamic medicine OECl group”. Liquid dynamic medicine and N-of-1 clinical trials: A change of perspective in oncology research. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2017**, *36*, 128. [CrossRef] [PubMed]
5. Kolostova, K.; Matkowski, M.; Jędryka, M.; Soter, K.; Cegan, M.; Pinkas, M.; Pavlasek, J.; Spicka, J.; Bobek, V. The added value of circulating tumor cells examination in ovarian cancer staging of ovarian cancer. *Am. J. Cancer Res.* **2015**, *5*, 3363–3375. [PubMed]
6. Kolostova, K.; Matkowski, R.; Gürlich, R.; Grabowski, K.; Soter, K.; Lischke, R.; Schützner, J.; Bobek, V. Detection and cultivation of circulating tumor cells in gastric cancer. *Cytotechnology* **2016**, *68*, 1095–1102. [CrossRef]
7. Cegan, M.; Kolostova, K.; Matkowski, R.; Broul, M.; Schraml, J.; Futowski, M.; Bobek, V. In vitro culturing of viable circulating tumor cells of urinary bladder cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2014**, *7*, 7164–7171.
8. Kolostova, K.; Pinkas, M.; Jakabova, A.; Pospisilova, E.; Svobodova, P.; Spicka, J.; Cegan, M.; Matkowski, R.; Bobek, V. Molecular characterization of circulating tumor cells in ovarian cancer. *Am. J. Cancer Res.* **2016**, *6*, 973–980. [PubMed]
9. Broncy, L.; Paterlini-Bréchet, P. Circulating tumor cells for the management of renal cell carcinoma. *Diagnostics* **2018**, *8*, 63. [CrossRef] [PubMed]
10. Gerstung, M.; Beisel, C.; Rechsteiner, M.; Wild, P.; Schraml, P.; Moch, H.; Beerenwinkel, N. Reliable detection of subclonal single-nucleotide variants in tumour cell populations. *Nat. Commun.* **2012**, *3*, 811. [CrossRef] [PubMed]
11. Gerlinger, M.; Rowan, A.J.; Horswell, S.; Larkin, J.; Endesfelder, D.; Gronroos, E.; Martinez, P.; Matthews, N.; Stewart, A.; Tarpey, P.; et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N. Engl. J. Med.* **2012**, *366*, 883–892. [CrossRef] [PubMed]
12. Gerlinger, M.; Horswell, S.; Larkin, J.; Rowan, A.J.; Salm, M.P.; Varela, I.; Fisher, R.; McGranahan, N.; Matthews, N.; Santos, C.R.; et al. Genomic architecture and evolution of clear cell renal cell carcinomas defined by multiregion sequencing. *Nat. Genet.* **2014**, *46*, 225–233. [CrossRef] [PubMed]
13. Mandriota, S.J.; Turner, K.J.; Davies, D.R.; Murray, P.G.; Morgan, N.V.; Soutter, H.M.; Wykoff, C.C.; Maher, E.R.; Harris, A.L.; Ratcliffe, P.J.; et al. HIF activation identifies early lesions in VHL kidneys: Evidence for site-specific tumor suppressor function in the nephron. *Cancer Cell* **2002**, *1*, 459–468. [CrossRef]
14. Harten, S.K.; Shukla, D.; Barod, R.; Hergovich, A.; Balda, M.S.; Matter, K.; Esteban, M.A.; Maxwell, P.H. Regulation of renal epithelial tight junctions by the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene involves occludin and claudin 1 and is independent of E-cadherin. *Mol. Biol. Cell* **2009**, *20*, 1089–1101. [CrossRef] [PubMed]
15. De Bono, J.S.; Scher, H.I.; Montgomery, R.B.; Parker, C.; Miller, M.C.; Tissing, H.; Doyle, G.; Terstappen, L.W.; Pienta, K.J.; Raghavan, D. Circulating tumor cells predict survival benefit from treatment in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 6302–6309. [CrossRef] [PubMed]
16. Farace, F.; Massard, C.; Vimond, N.; Drusch, E.; Jacques, N.; Billiot, E.; Laplanche, A.; Chauchereau, A.; Lacroix, L.; Planchard, D.; et al. A direct comparison of CellSearch and ISET for circulating tumour-cell detection in patients with metastatic carcinomas. *Br. J. Cancer* **2011**, *105*, 847–853. [CrossRef] [PubMed]
17. Bai, M.; Zou, B.; Wang, Z.; Li, P.; Wang, H.; Ou, Y.; Cui, K.; Bian, J.; Li, S.; Xu, X. Comparison of two detection systems for circulating tumor cells among patients with renal cell carcinoma. *Int. Urol. Nephrol.* **2018**, *50*, 1801–1809. [CrossRef] [PubMed]
18. Bankó, P.; Lee, S.Y.; Nagygyörgy, V.; Zrínyi, M.; Chae, C.H.; Cho, D.H.; Telekes, A. Technologies for circulating tumor cell separation from whole blood. *J. Hematol. Oncol.* **2019**, *12*, 48. [CrossRef] [PubMed]

19. Hernandez-Yanez, M.; Heymach, J.V.; Zurita, A.J. Circulating biomarkers in advanced renal cell carcinoma: Clinical applications. *Curr. Oncol. Rep.* **2012**, *14*, 221–229. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Motzer, R.J.; Escudier, B.; McDermott, D.E.; George, S.; Hammers, H.J.; Srinivas, S.; Tykodi, S.S.; Sosman, J.A.; Procopio, G.; Plimack, E.R.; et al. Nivolumab versus everolimus in advanced renal cell carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373*, 1803–1813. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## PŘÍLOHA č. 2

### Publikace, které jsou podkladem dizertace

#### a) s IF

**Klezi P**, Kaspar M, Klecka J, Richterova R, Stanc O, Burgetova A, Fischerova D, Dusek L, Popken G, Zatura F. (2018). The role of contrast-enhanced pulse inversion harmonic imaging (CEUS) and contrast-enhanced computed tomography (CECT) in the preoperative diagnosis of renal lesions.

Urologe A. 57(2):181-190. doi: 10.1007/s00120-018-0572-z. IF 0.401

**Klezi P**, Pospisilova E, Kolostova K, Sonsky J, Maly O, Grill R, Pawlak I, Bobek V. (2020). Detection of Circulating Tumor Cells in Renal Cell Carcinoma: Disease Stage Correlation and Molecular Characterization. *J Clin Med.* 7;9(5):1372. doi: 10.3390/jcm9051372 IF 5.583

#### b) bez IF

**Klézi P.**, Šonský J., Pospíšilová E., Kološtová K., Bobek V., Grill R. (2020). Vyšetření cirkulujících nádorových buněk u karcinomu ledviny *Ces Urol* 24(2):100-104

**Klézi P.**, Licková K., Šonský J., Fiala A., Nencka P., Grill R. (2018). Kazuistika pacientky s renálním karcinomem a metachronním postižením bilaterálních nadledvin a kontralaterální ledviny průběhu 16 let. *Ces Urol* 22(4):285-290

### Publikace bez vztahu k tématu dizertace

#### a) s IF

Bakardjjeva-Mihaylova V, Skvarova Kramarzova K, Slamova M, Svaton M, Rejllova K, Zaliova M, Dobiasova A, Fiser K, Stuchly J, Grega M, Rosova B, Zachoval R, **Klezi P**, Eis V, Kindlova E, Buchler T, Trka J, Boublikova L. *Cancers (Basel)*. (2019). Molecular Basis of Cisplatin Resistance in Testicular Germ Cell Tumors. 11(9):1316. doi: 10.3390/cancers11091316 IF 6.102

Gregušová A, **Klézi P**, Mašková V, Smíšková D, Pícha D, Malíkova H. (2019). Acute Urinary Retention in Aseptic Meningitis: Meningitis-retention Syndrome. *Neuro Endocrinol Lett.* Nov;40(4):166-168. PMID: 32087091 IF 0.918

- Hrudka J, Eis V, Šach J, **Klézl P**, Schilling S, Bandke D.(2018). Two synchronous malignancies in a single nephrectomy specimen. *Pathologe*. 39(1):65-70. doi: 10.1007/s00292-017-0401-y IF 0.586
- Benešová M, Trejbalová K, Kučerová D, Vernerová Z, Hron T, Szabó A, Amouroux R, **Klézl P**, Hajkova P, Hejnar J. (2017). Overexpression of TET dioxygenases in seminomas associates with low levels of DNA methylation and hydroxymethylation. *Mol Carcinog.*;56(8):1837-1850. doi: 10.1002/mc.22638. Epub 2017 May 24 IF 3.825
- Boublikova L, Bakardjieva-Mihaylova V, Skvarova Kramarzova K, Kuzilkova D, Dobiasova A, Fiser K, Stuchly J, Kotrova M, Buchler T, Dusek P, Grega M, Rosova B, Vernerova Z, **Klezi P**, Pesl M, Zachoval R, Krolupper M, Kubecova M, Stahalova V, Abrahamova J, Babjuk M, Kodet R, Trka J. (2016). Wilms tumor gene 1 (WT1), TP53, RAS/BRAF and KIT aberrations in testicular germ cell tumors. *Cancer Lett.* 376(2):367-76. doi: 10.1016/j.canlet.2016.04.016. Epub 2016 Apr 13 IF 6.375
- Novák J, Bárta J, **Klézl P**. (2007). Karcinom Penisu. *Cas Lek Cesk* 146: 767-770 IF 0.26

b) bez IF

- Čapka D., Mašková V., Kolombo I., **Klézl P.**, Nencka P., Šach J., Grill R. (018). Nediferencovaný sarkom ledviny šířící se do retroperitonea *Urol. Praxi* 19(4):188-191
- Čapka D., Nencka P., **Klézl P.**, Kolombo I., Grill R. (2018). Laparoskopická pyeloplastika u 82leté pacientky s pelvis duplex *Urol. Praxi* 19(4):192-194
- Čapka D., Kolombo I., **Klézl P.**, Nencka P., Mašková V., Štanc O., Soška M., Šonský J., Gregušová A., Hruška M., Grill R. (2017). Radikální cystektomie v éře ERAS *Urol. Praxi* 18(3):98-104
- Hrušky M., **Klézl P.**, Nencka P., Klečka J., Kolombo I., Jirásek T., Kujal P., Grill (2015). R.Liposarkom a ganglioneurom jako primární nádory retroperitonea, *Ces Urol* 5, 19(2):149-156
- Kolombo I., **Klézl P.**, Klečka J., Bittner L., Mašková V., Hruška M., Nencka P., Gregušová A., Jílek J., Baitler T., Grill R. (2014). Karcinom ledviny z pohledu urologa, *Onkologie* 8 (5): 201-207
- Klečka J., **Klézl P.**, Nencka P., Mašková V., Grill R. (2014). Příklad monstrózní benigní hyperplazie prostaty. *Ces Urol* 18(2):144-149
- Endometrióza urogenitálního traktu Klečka J., **Klézl P.**, Mašková V., Grill R. *Urol List* 2013; 11(3): 40-42
- Klézl P.**, Richterová R., Štanc O., Klečka J., Zát'ura F.(2013).Objemný angiomyolipom pravé ledviny u mladé ženy. *Urol List* 11(4): 45-48
- Klézl P**, Stanc O, Richterová R, Gilbert Z, Zát'ura F. (2013). Benign fibroepithelial polyp of the ureter. *Cent European J Urol.* 66(2):168-71. doi: 10.5173/ceju.2013.02.art15. Epub 2013 Aug 13.
- Bárta J, Ryznarová Z, **Klézl P**, Zát'ura F, Adamová M, Kašpar M, Novák J. (2010). Postavení magnetické rezonance a magnetické rezonanční spektroskopie při detekci ca prostaty *Ces Urol* 14(3): 186 – 196
- Hoskovec D., Hladík E., Kašpar J., **Klézl P.**, Benková K., Varga J. 2005). Méně obvyklý sekundární tumor pankreatu *Ces.Slov.Gastroent.Hepatol* 59(4): 162-164
- Pavelková R, **Klézl P**. (2008). Epidermoidní cysta praepudia. *Ces Urol* 12(3): 05-208

## 12 Seznam zkratek

ACTB – aktín beta gen  
AQP-1 – Aquaporine 1  
BAP 1- ubikvitín carboxyl terminální transferáza gen  
BHP – benigní hyperplazie prostaty  
CA – karbon anhydráza  
CK – cytokeratiny  
CRP – C reaktivní protein  
CTC – circulating tumor cells, cirkulující nádorové buňky  
DNA – deoxynukleová kyselina  
EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová  
ELISA – enzyme linked immunosorbent assay  
EMT – epiteliálně-mesenchymový přechod  
EpCAM - Epithelial Cell Adhesion Molecule  
ESRD – end stage renal disease  
FDA – Food ad drug administration – Úřad pro kontrolu potravin a léčiv USA  
GGT – gamma glutamyl transferáza  
HIF – hypoxia induced factor  
HR – hazard ratio  
HSP 27 – Heat Shock Protein 27  
ICI – Immune checkpoint inhibitors  
IL – interleukin  
IARC - Mezinárodní agentura pro výzkum nádorových onemocnění  
LOH – lost of heterosigozity  
KDM5C – lyzín demethyláza 5C  
KIM – kidney injury molecule  
mAb – monoclonal antibody  
MET – protoonkogen – tyrozin kináza  
MMP – matrix metalloproteináza  
MUC1 – onkoprotein mucín 1  
NGAL – neurofilní s gelatinozou asociovaný Lipocalin  
NGS – sekvenování nové generace  
NMP – nuclear matrix protein  
MTOR – mammalian target of Rapamycin  
ORR – overall response rate  
OS – overall survival  
PBRM1 – gen polybromo 1  
PFS – progression free survival  
PHD3 – prolyl hydroxyláza 3  
PIK3CA - phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase katalytická podjednotka Alpha  
PLIN2 – Perilipin 2  
PSA – prostatický specifický antigen  
PTEN – gen fosfatáza a tenzín homolog  
RCC – renální karcinom – renal cell carcinoma  
RNA – ribonukleová kyselina  
SETD2 – gen histon lyzín N-metyl transferáza  
SMARCB1 - aktín  
stDNA – satellite DNA  
TAM – tumor associated macrophage  
TERT – reverzní transkriptáza telomer

TK – thymidin kináza  
TNF – tumor necrosis factor  
TNM – TNM systém  
TME – tumor microenvironment  
TRAIL – tumor necrosis factor-related apoptosis factor  
UZ - ultrazvuk  
VEGF – vascular endothelial growth factor  
VHL – Von-Hippel Lindau  
WT – Wilmsův tumor