

Univerzita Karlova

3. lékařská fakulta

Dizertační práce

Praha, 2024

MUDr. Klaudia Grafnetter

Univerzita Karlova

3. lékařská fakulta

Dizertační práce

Preventivní a prediktivní faktory u gynekologických malignit

Preventive and prognostic factors in gynecological malignancies

Školitel: doc. MUDr. Martina Kubecová, PhD.

Prohlášení:

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

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

V Praze, 11.6. 2024

Kludia Grafnetter

Identifikační záznam:

GRAFNETTER, Klaudia. Preventivní a prediktivní faktory u gynekologických malignit. [Preventive and prognostic factors in gynecological malignancies]. Praha, 2024. Počet stran 70. Dizertační práce. Univerzita Karlova, 3. lékařská fakulta, Ústav epidemiologie a biostatistiky 3. LF UK 2024. Školitel: doc. MUDr. Martina Kubecová, PhD.

Klíčová slova: *karcinom hrdla děložního, chemoterapie, radioterapie, cirkulující nádorové buňky*

Keywords: *cervical cancer, chemotherapy, radiotherapy, circulating tumor cells*

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce doc. Martině Kubecové za pomoc v publikační a vědecké činnosti, vytrvalou podporu nejenom v mém studiu, ale i v profesním životě, protože i díky ní mně má práce naplňuje a baví. Velké poděkování patří také Laboratoři personalizované medicíny a Mgr. Kateřině Kološtové a prof. Vladimírovi Bobkovi za odbornou pomoc, zázemí, rady a vědomosti, které mi pomohly pochopit taje tekuté biopsie. Současně poděkování patří prof. Renatě Soumarové za možnost uskutečnění výzkumu na naší klinice a také mým kolegům za podporu během studia. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat za velkou podporu a trpělivost mému manželovi a rodině.

Abstrakt

Onkologie poslední léta postupuje mílovými kroky v diagnostice i léčbě. Gynekologické nádory patří k častým malignitám, které jsou diagnostikovány taktéž u žen v mladém věku. Diskutovaným tématem posledních let se stává také tekutá biopsie a její přínos v klinické praxi. Tekutá biopsie se jeví být vhodným ukazatelem prognostickým i prediktivním. Její výhodou je minimální zátěž pro pacienta a lehká dostupnost – získává se z periferní krve. V naší práci jsme analyzovali cirkulující nádorové buňky (CTC).

V naší práci jsme se zaměřili na pacientky s karcinomem hrdla děložního, které podstoupily léčbu radikální radioterapií. Do souboru bylo zařazeno celkem 30 pacientek, všechny podstoupily radioterapii s potenciací chemoterapií a dále byly na naší klinice sledovány. V našem souboru bylo provedeno celkem 167 testů před léčbou, během léčby a dispenzarizace pacientek. Paralelně jsme sledovali také onkomarker SCC. Při sledování pacientek a pravidelných odběrech byly pozorovány změny dynamiky CTC – většina pacientek měla vstupně pozitivní CTC a SCC s poklesem po léčbě, což korelovalo s klinickým obrazem a pozorováním regrese onemocnění. Pacientky, které během sledování neměly progresi onemocnění, měly před zahájením terapie vyšší hladinu CTC. Z našeho souboru mělo progresi onemocnění 10 pacientek. V této skupině pacientek jsme pozorovali zvýšení počtu CTC přibližně 12 týdnů před relapsem onemocnění zachyceným na zobrazovacích metodách. Doplnili jsme také analýzu kvantitativní PCR u CTC před léčbou. Analýza potvrdila zvýšenou expresi SOX2 a POU5F1 ve skupině pacientek s relapsem onemocnění ($p < 0,02$).

CTC se jeví být vhodným pomocným ukazatelem agresivity onemocnění. Jejich monitorování během léčby a sledování pacientek může pomoci odhalit dřívější relaps onemocnění a tím ovlivnit prognózu pacientky. Dalším analyzováním se CTC můžou stát důležitým nástrojem k personalizaci onkologické léčby.

Abstract

In recent years, Oncology has progressed by giant leaps in diagnostics and treatment. Gynecological tumors belong to frequent malignancies, which are also diagnosed in young women. Liquid biopsy and its benefit in clinical practice have also become discussed topics in recent years. The liquid biopsy appears to be a suitable prognostic and predictive factor. Its advantage is a minimal ballast for the patient and easy availability – get from peripheral blood.

In our research, we focused on patients diagnosed with cervical cancer, who underwent radical radiotherapy. A total of 30 patients were included, all of whom underwent radiotherapy with potentiation of chemotherapy and were further monitored in our clinic. In our research, a total of 167 tests were performed before treatment, after treatment and during follow-up. In parallel, we also monitored oncomarker SCC. There were observed changes in CTC – most patients had initially positive CTC and SCC with decrease after treatment, which correlated with the clinical picture and disease regression. Patients who did not have disease progression during follow up, had a higher CTC level before treatment. There was diagnosed a disease progression in 10 patients during follow-up. In that group of patients, we observed an increase in number of CTC approximately 12 weeks before disease relapse diagnosed by imaging methods. We also completed a quantitative PCR analysis of pretreatment CTC. The analysis confirmed the increased expression of SOX2 and POU5F1 in the group of patients with disease progression ($p < 0,02$).

CTC appears to be a suitable auxiliary indicator of disease aggressiveness. Monitoring CTC during treatment and follow-up of patients can help detect earlier relapse and affect patient's prognosis. By further analyzing CTC, they may also become an important tool to personalize cancer treatment.

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Gynekologické nádory	2
3	Karcinom hrdla děložního	2
4	Karcinogeneze	9
5	Rizikové faktory	10
6	Přednádorové změny.....	14
7	Prognostické a prediktivní faktory karcinomu hrdla děložního	15
8	Prevence	18
9	Nádorové markery	22
10	Cirkulující nádorové buňky	24
11	Cíle studie	26
12	Postup práce	28
13	Výsledky studie	36
14	Diskuse k tématu	54
15	Závěr.....	59
16	Seznam použitých zkratk	60
17	Literatura.....	61

1 Úvod

Gynekologické nádory jsou z hlediska incidence častým onkologickým onemocněním hned po karcinomu prsu, kolorekta a plic. K nejčastějším gynekologickým malignitám patří karcinom endometria, ovaria a hrdla děložního. (1) V naší práci jsme se zaměřili na karcinom hrdla děložního. Karcinom hrdla děložního patří k onemocněním s vysokou incidencí i mortalitou. Často je onemocněním mladších žen. Z gynekologických nádorů se spolu s karcinomem prsu řadí ke skupině onemocnění, které jsou preventabilní. V České republice dokonce probíhají již několik let screeningové programy, které jsou zaměřeny na diagnostiku brzkého stadia onemocnění. I přesto je více než 40 % pacientek diagnostikováno v pokročilejším stadiu onemocnění, kdy není možné indikovat primární chirurgický výkon. Léčebnou volbou se stává kombinovaná chemoradioterapie.

Poslední léta je snahou v onkologii nejenom dosáhnout co nejlepších léčebných výsledků, ale také léčbu co nejvíce personalizovat. Po dosažení remise onemocnění onkologickou terapií zůstává riziko relapsu – lokálního nebo vzdáleného. Nabízí se proto otázka, jak co nejdříve odhalit relaps onemocnění, ještě předtím, než se ukáže na zobrazovacích vyšetřeních nebo se projeví klinicky.

Novou nadějí se zdá být tekutá biopsie (vyšetření periferní krve). V naší práci jsme se zaměřili na cirkulující nádorové buňky (CTC). CTC byly považovány za projev agresivity nádorů a schopnosti vzdáleně metastazovat. Ukazuje se, že jejich přítomnost může spíše svědčit jako projev pokročilého onemocnění, a ne jenom metastatického projevu. (2)

Dlouhá léta byl při výběru vhodné strategie léčby rozhodující klinický stav pacienta, jeho komorbidita a posouzení pokročilosti onemocnění pomocí klinického vyšetření a zobrazovacích metod. S pokrokem vědy a medicíny a zaváděním nových diagnostických a terapeutických postupů se prohlubuje také chápání biologických rysů karcinogeneze. Tyto znalosti nám můžou pomoci k přesnějšímu zacílení léčby – personalizaci, zlepšení sledování průběhu onemocnění a celkové prognózy pacienta.

Práci zabývající se radioterapií u karcinomu hrdla děložního a CTC není mnoho. Naším cílem bylo zjistit, jestli jsou CTC vhodným pomocným nástrojem v léčbě a sledování onemocnění karcinomu hrdla děložního léčeného chemoradioterapií.

2 Gynekologické nádory

Gynekologické nádory jsou velkou skupinou onkologických onemocnění. Z této skupiny je nejčastější karcinom prsu a většinou se vyčleňuje samostatně. Za ním následuje karcinom endometria, který má vysokou incidenci, ale nízkou mortalitu, protože se často diagnostikuje v počátečním stadiu onemocnění. Je to 4. nejčastější karcinom u žen vůbec po karcinomu prsu, kolorektálním karcinomu a karcinomu plic. Dalším v pořadí v incidenci gynekologických nádorů je karcinom ovaria. Karcinom ovaria je naopak nádorem s relativně vysokou mortalitou a může být významně geneticky podmíněn. Dále v incidenci následuje karcinom hrdla děložního. Bohužel je pořád často diagnostikován u mladších žen. I přesto, že je u nás zavedeno očkování proti HPV infekci a probíhá screeningový program, zůstává jeho incidence v ČR pořád vyšší než v západních zemích. I právě proto má prevence v onkologii nezastupitelné místo a je neméně důležitá jako léčba samotná. Další gynekologické nádory – karcinom vulvy, pochvy a placenty – jsou vzácné. (1)

3 Karcinom hrdla děložního

3.1 Epidemiologie

Karcinom hrdla děložního byl v roce 2021 v ČR 18. nejčastějším novotvarem kromě nemelanomových kožních novotvarů, tvořil 1,3 % všech nově diagnostikovaných novotvarů. V ČR bylo v roce 2021 diagnostikováno 739 nových onemocnění, tj. 13,87/100 000 žen. Medián věku v době diagnózy byl 54 let (50 % pacientek bylo ve věku 42 a 68 let). Nejvíce je nově diagnostikovaných pacientek ve věku 45-49 let. Mortalita v roce 2021 byla 301 žen, tj. 5,65/100 000 žen za rok. Medián věku v době úmrtí byl 66 let (50 % pacientek bylo ve věku 55 a 75 let). V roce 2021 byla prevalence onemocnění 331,7/100 000 žen. V mezinárodním srovnání incidence je v Evropě ČR na 23. místě. (1) (3)

Nejčastěji se vyskytuje onemocnění u žen ve věku mezi 35-45 lety a druhý peak je mezi 55-65 lety. Všeobecně incidence stoupá po 30. roku – postihuje ženy v reprodukčním věku plánujících mateřství a stává se vážným medicínským problémem. Více než polovina pacientek (přes 50 %) je diagnostikována v klinickém stadiu I a II. (1) (3)

V ČR je poslední léta vidět klesající trend v incidenci a mortalitě díky primární a sekundární prevenci, index mortality a incidence má vzestupný trend. V incidenci jsou také velké regionální rozdíly, kdy největší podíl onemocnění je tradičně v západních krajích. Prevalence onemocnění setrvale lehce narůstá. 5leté přežití léčených pacientek v období 2015-2019

dosahovalo 68,9 %. 5leté přežití v I. klinickém stadiu je vyšší než 90 %. V posledních letech celkově přibývá pacientek diagnostikovaných s karcinomy in situ a na druhé straně nádorů agresivnějšího charakteru s horší prognózou. (3)

3.2 Histologie

Histologicky jsou nejčastěji verifikovány spinocelulární karcinomy (75-80 %) nebo adenokarcinomy (20-25 %). (4) Spinocelulární karcinomy se většinou vyvíjí déle přes přednádorové změny patrné na hrdle děložním při gynekologickém vyšetření. Morfologicky rozlišujeme G1, G2, G3 a G4. (5)

Adenokarcinom může být svým chováním agresivnější a ve srovnání se spinocelulárním karcinomem je méně chemo i radiosenzitivní. (6) Na základě typu invazivního růstu a přítomnosti lymfovaskulární invaze jsou nově adenokarcinomy děleny dle Silvy na podtypy A, B a C. Silva typ A nemá metastázy do lymfatických uzlin, u Silva typu invaze B je postižení lymfatických uzlin vzácné a u typu C je postižení lymfatických uzlin časté, kolem 25 %. (7)

Dále se karcinomy dělí na HPV asociované a HPV non-asociované. Všechny non-HPV adenokarcinomy jsou Silva C, a proto se u nich tento systém nepoužívá.

Vzácně se vyskytují neuroendokrinní karcinomy, sarkomy nebo melanomy. (8)

3.3 Symptomatologie

Karcinom hrdla děložního může být v počátečních stádiích onemocnění zcela asymptomatický. Často bývá náhodným nálezem při preventivní prohlídce. Méně často může být prvním příznakem krvácení po styku, nepravidelné krvácení nebo pocit diskomfortu. Všechno jsou to příznaky, které ženy někdy podceňují a vyhledají lékaře až při jejich delším trvání.

Při pokročilejším lokálním nálezů se může objevit jako první příznak nepříjemný výtok, krvácení (i mimo menstruační cyklus), bolesti v pánvi, problémy s močením nebo defekací. Při útlaku ureterů může vzniknout hydronefróza s progresí až do stádia renálního selhání. Dalším prvním příznakem může být anémie, trombóza nebo plicní embolie. Z celkových příznaků se může objevit hubnutí, nevolnosti, zvracení, dýchací obtíže – často jsou to již příznaky pokročilého onemocnění.

3.4 Diagnostika

Základem diagnostiky je vždy gynekologické vyšetření včetně expertní kolposkopie a vyšetření per rektum. Ke stanovení diagnózy potřebujeme vědět, o jaký histologický typ

onemocnění se jedná a provádí se biopsie. K určení lokálního nálezu (velikost tumoru, objem a rozsah infiltrace stromatu čípku, postižení parametrií) a posouzení lymfadenopatie doplňujeme expertní vaginální ultrazvuk a také magnetickou rezonanci pánve. K vyloučení vzdálených ložisek používáme CT vyšetření hrudníku, břicha a pánve nebo PET/CT vyšetření (preferované, pokud je dostupné). K základním vstupním vyšetřením patří také laboratorní vyšetření – krevní obraz s diferencíálem, koagulace, základní biochemie (ionty, jaterní testy, renální parametry, CRP, celková bílkovina, albumin) a rozbor moče – chemicky a sediment. Doplnujeme také vyšetření onkomarkerů – u dlaždicobuněčného karcinomu SCC a u adenokarcinomu Ca19-9 a CEA. Nesmíme také opomíjet základní fyzikální vyšetření. U lokálně pokročilých nálezů můžeme doplnit cystoskopii nebo rektoskopii k vyloučení infiltrace stěny močového měchýře nebo rekta.

3.5 Staging onemocnění

Na základě vstupních vyšetření včetně zobrazovacích metod je stanoven staging onemocnění. Klinická stadia onemocnění lze dělit dle 8.vydání TNM klasifikace nebo dle FIGO klasifikace z roku 2018. Mezi oběma klasifikacemi je diskrepance – dle TNM klasifikace je postižení paraaortálních lymfatických uzlin stadium IV a dle FIGO IIIC2. Jednotlivá stadia FIGO klasifikace lépe vyjadřují prognózu onemocnění a indikují pacientku ke konkrétní léčebné strategii. Na základě nové FIGO klasifikace vydala Evropská společnost pro onkogynekologii (ESGO) ve spolupráci s Evropskou společností pro radiační onkologii (ESTRO) nové doporučení pro diagnostiku, léčbu a sledování pacientek.

3.6 Rozhodnutí o léčbě

Při stanovení diagnózy je pacientka prezentována s nálezy na multidisciplinárním gynekologicko-onkologickém týmu, který na základě všech vyšetření a celkového stavu pacientky, jejich komorbidit, určí léčebnou strategii. Multidisciplinární tým je tvořen klinickým a radiačním onkologem, onkogynekologem, radiodiagnostikem a patologem.

3.7 Možnosti léčby

Léčebná strategie karcinomu hrdla děložní je vždy individuální. Je řízená místními, národními a mezinárodními léčebnými postupy a doporučeními. Při jejich aplikaci je ale vždy potřebné posuzovat konkrétní pacientku individuálně a brát v úvahu i její celkový stav, komorbidity a její přání.

U pacientek s lokalizovaným onemocněním je v léčebné strategii často postačující pouze

chirurgická léčba. U vyšších stadií onemocnění se strategií léčby stává radioterapie a systémová onkologická terapie – chemoterapie. (9)

Při lokálním onemocnění – stadiu T1, kdy je nádor lokalizován jenom v oblasti hrdla děložního, je základem léčby operační řešení. U nádorů větších než 4 cm můžeme v individuálních případech přemýšlet o aplikaci neoadjuvantní chemoterapie a při regresi nálezu o následném operačním řešení. U mladých pacientek při příznivém nálezu může být zvažována také varianta fertilitu zachovávajícího výkonu.

Ve stadiu T2, kdy je nádor rozšířen do oblasti parametrií nebo stadiu T3, kdy je postižení dolní třetiny vagíny nebo postižení parametrií až ke stěně pánevní, někdy s rozvojem hydronefrózy, je léčebnou strategií kombinovaná radioterapie s potenciací konkomitantní chemoterapie.

U stadia T4, kdy nádor prorůstá do stěny močového měchýře nebo konečníku, je strategie léčby individuální.

Postižení pánevních uzlin i při lokálně malém nálezu posouvá vždy pacientku do FIGO stadia III – u postižení pánevních uzlin FIGO IIIC1 a paraaortálních uzlin FIGO IIIC2. Léčebnou strategií je kombinovaná radioterapie s potenciací chemoterapie.

Stadium IV je onemocnění se vzdálenými metastázami a je indikována systémová onkologická léčba.

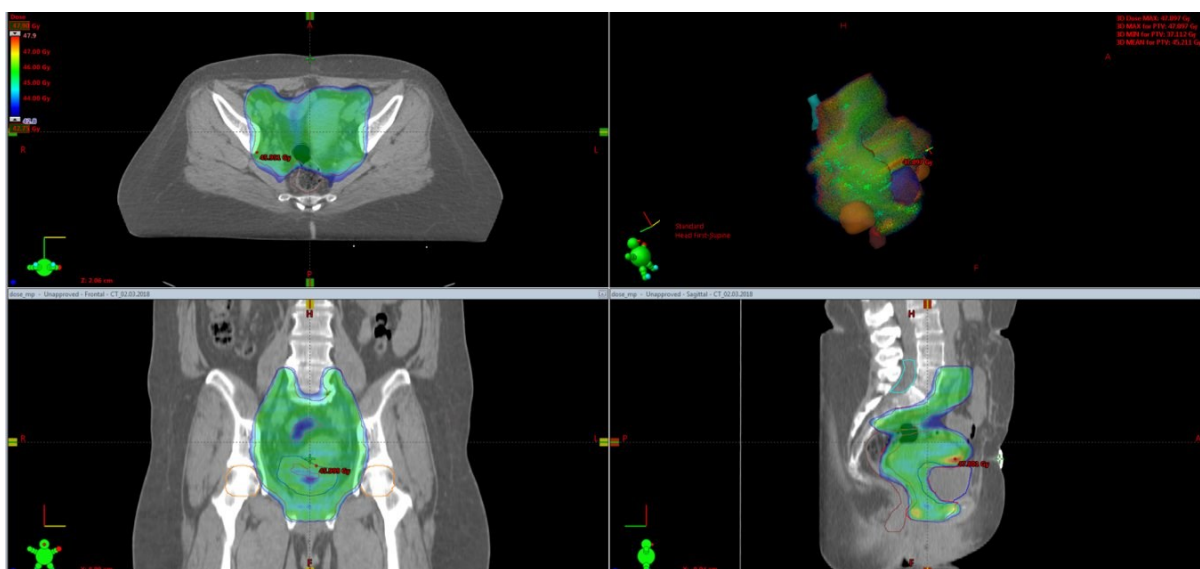
3.8 Chemoradioterapie

Radikální kombinovaná radioterapie v sobě zahrnuje zevní radioterapii a brachyterapii. Touto kombinací dosáhneme dávky více než 85 Gy v samotném tumoru.

Zevní radioterapie je aplikována pomocí lineárního urychlovače. Samotné plánování radioterapie je zahájeno na CT simulátoru. Poloha pacientky je supinační na zádech s fixací dolních končetin, ruce jsou většinou nad hlavou. Následně je připraven samotný ozařovací plán definováním cílových objemů: GTV (gross tumor volume) – oblast samotného nádoru, CTV (clinical target volume) – zahrnuje oblast GTV včetně jeho šíření do parametrií oblasti možného šíření včetně lymfatických uzlin a PTV (planning target volume) – zahrnuje CTV spolu s bezpečnostním lemem kompenzujícím možné chyby nastavení a vnitřní pohyby orgánů. K aplikaci radioterapie používáme moderní ozařovací techniku zvanou IMRT, která nám poskytne konformní dávkovou distribuci v cílovém objemu při šetření zdravých tkání (rektum, sigma, močový měchýř a střevní kličky). Tímto způsobem se dosahuje lepších výsledků stran pozdní toxicity léčby. Nutná je každodenní kontrola pomocí cone-beam CT, která nám také

pomáhá snížit riziko poddávkování GTV. Tímto postupem vytvoříme podklad pro vytvoření ozařovacího plánu. (10)

Standardně ozáření malé pánve v sobě zahrnuje oblast čípku děložního, dělohy, parametrií a lymfatických uzlin – vnitřních a zevních ilických, presakrálních a obturatorových. Při postižení dolních pánevních uzlin je do ozařovacího objemu zahrnuta i oblast společných ilických uzlin. V případě postižení společných ilik nebo i postižení paraaortálních uzlin jsou do ozařovacího objemu zahrnuty i paraaortální uzliny. Při postižení dolní třetiny vagíny jsou zavzaty i uzliny inguinální. Po zakreslení cílových objemů a vytvořením ozařovacího plánu fyzikem je plán zhodnocen spolu s dávkově-objemovým histogramem a po schválení radiačním onkologem je připraven k zahájení léčby. Pacient přichází denně k radioterapii vyjma víkendů a svátků. (10)

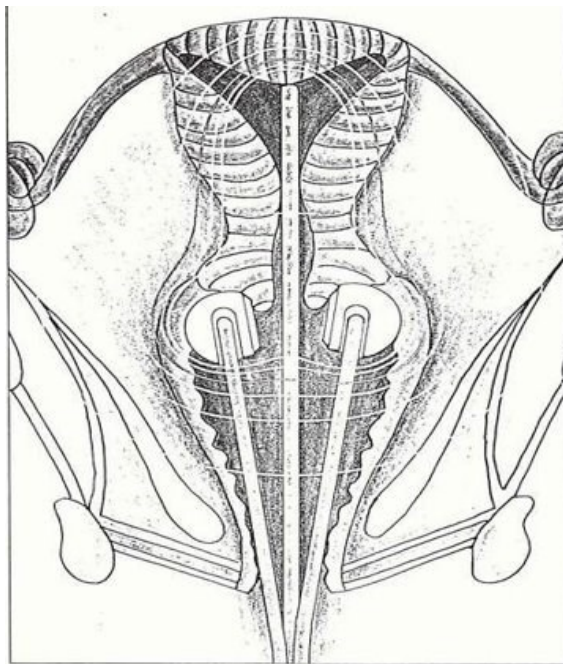


Obrázek 1: Ozařovací plán při ozáření malé pánve

Poslední týden zevní radioterapie nebo hned po jejím skončení je aplikována brachyterapie. Ta nám umožňuje dodat co největší dávku záření přímo do tumoru a jeho bezprostřední blízkosti za současného šetření zdravých tkání v okolí (močový měchýř, rektum, sigmoideum). U karcinomu hrdla děložního používáme uterovaginální aplikaci. Provádí se v krátké celkové anestezii. Pacientka leží v gynekologické poloze. Po lokální dezinfekci a gynekologickém vyšetření je do oblasti hrdla děložního a dělohy zaveden speciální aplikátor s centrální sondou a ovidy/ringem. Poté se provádí tamponáda vagíny k fixaci aplikátoru a oddálení stěny močového měchýře a rekta. Do močového měchýře se zavádí močová cévka s kontrastní látkou

v balonku. Následuje vytvoření ozařovacího plánu – 2 D pomocí RTG nebo 3 D plánování pomocí CT, MRI (to je preferováno). V současné době se standardně provádí 3D plánování.

U definitivní radioterapie je aplikována dávka 45,0 Gy ve 25 frakcích, tj. 1,8Gy/frakci na oblast malé pánve. Při postižení parametřií je možné v individuálních případech zvýšit dávku jenom na oblast parametřií až o 10 Gy. Brachyterapie HDR se aplikuje většinou 2xtýdně, celkem jsou aplikovány 4 frakce, dávka na frakci 6,5 – 7,0 Gy. Celková doba léčby by neměla přesáhnout 56 dnů. Prodloužení celkové doby léčby snižuje pravděpodobnost dosažení lokální kontroly – přibližně 1 den odpovídá 1 %. (11)



Obrázek 2: Aplikátor pro uterovaginální brachyterapii

Konkomitantní chemoterapie se přidává k radioterapii od stadia IIB. Aplikuje se jednou týdně, vždy začátkem týdne. Dle tolerance je celkem podáno 5 až 6 aplikací (většinou 5). Aplikace radioterapie a konkomitantní chemoterapie se zahajuje většinou ve stejný den – nejdříve je aplikace chemoterapie a poté radioterapie. Používáme cytostatikum cisplatina, v dávce 40mg/m², přičemž kumulativní dávka na jednu aplikaci je 70mg z důvodu hematotoxicity a možnosti přerušení radioterapie.

Konkomitantní chemoterapii do léčebného schématu přidáváme jenom u pacientek v celkově velmi dobrém klinickém stavu, bez závažných komorbidit, při dobrém krevním obrazu a hodnotách renálních parametrů. Během celé léčby je pacientka pravidelně sledována včetně kontrolní laboratoře (krevní obraz, biochemie).

3.9 Sledování po léčbě

Ke zhodnocení léčebného efektu musíme vyčkat ještě 3 až 6 měsíců od skončení chemoradioterapie. Po skončení léčby jsou pacientky pravidelně sledovány – první dva roky každé 3 měsíce, 3. až 5. rok každých 6 měsíců a poté 1xročně. Provádí se fyzikální vyšetření, gynekologická prohlídka, základní laboratoř a event. obligatorně i zobrazovací vyšetření (vaginální ultrazvuk nebo MRI, event. CT nebo PET/CT).

3.10 Prognóza pacientek

Prognóza pacientek je závislá od stadia onemocnění při stanovení diagnózy. S pokročilostí (vyšším stadiem onemocnění) se prognóza zhoršuje. K negativním prognostickým znakům patří objem nádoru, hloubka invaze do stromatu hrdla, přítomnost lymfovaskulární invaze, nižší stupeň diferenciacie a histologický typ (adenokarcinom).

Úspěšnost léčby se vyjadřuje v 5 – ti letém přežití – u stadia I kolem 92 %, u stadia II 75 %, stadia III kolem 50 % a stadia IV kolem 19 %. (12)

4 Karcinogeneze

Karcinogeneze je vícestupňový proces trvající několik let, kdy se normální buňka mění na nádorovou na základě vnitřních (spontánní mutace, genomová nestabilita) a vnějších (chemických, fyzikálních a biologických) faktorů vedoucích ke změnám DNA kódující onkogeny a supresorové onkogeny. Všechny mohou individuálně hrát různě významnou roli u každého jednotlivce. Další a další vznikající mutace podněcují nově vzniklou buněčnou populaci k větší agresivitě. U dědičných nádorů se uplatňuje také mutace somatických buněk vznikající na podkladě endogenních chyb v replikaci DNA. Během života dochází ke vzniku spontánních mutací důsledkem nepřesnosti v replikaci DNA a poruch procesů opravy DNA. Většina nádorů však vzniká sporadicky. Při jejich vzniku se především uplatňují faktory zevního prostředí. Ty se dále můžou dělit na faktory chemické, biologické a fyzikální. Zásahem některého z faktorů zevního prostředí dojde ke vzniku genetické změny a na jejím podkladě k aktivaci onkogenů a inaktivaci tumor-supresorových genů. (13)

Jedna genetická změna však nestačí k navození maligní transformace buňky. Takových změn, zásahů je potřeba více a v nemalé míře je důležité také působení i dalších faktorů – kokarcinogenů a promotorů. Kokarcinogeny přímo zvyšují karcinogenní účinek. Promotory zase nepřímo zvyšují karcinogenní účinek stimulací proliferace. (14)

Vznik nádorů je náhodný a nepředvídatelný proces. A také proces nesmírně složitý a neustále se měnící. Celý proces a všechny faktory, které ho ovlivňují, může ještě ovlivnit genomová nestabilita, která může celý tenhle složitý proces zrychlit zvýšenou tvorbou mutací. Takto vzniklá buňka následně prochází procesem klonální expanze. (15) (16)

5 Rizikové faktory

Na vzniku nádorového onemocnění se podílí mnoho rizikových faktorů. Některé jsou méně a některé více důležité. Lze je také rozdělit na neovlivnitelné a preventabilní. Vznik nádorového onemocnění je opravdu komplexní proces, na kterém se podílí mnoho faktorů. Mezi hlavní ovlivnitelné rizikové faktory patří HPV infekce, obezita a kouření. Hlavními neovlivnitelnými rizikovými faktory jsou věk, pohlaví a genetická predispozice. Během života člověka se také postupně kumulují genetické změny a současně s věkem oslabuje protektivní funkce imunitního systému.

5.1 HPV infekce

HPV infekce je důležitý preventabilní rizikový faktor. Tvoří ji skupina více než 170 druhů DNA virů skupiny papillomaviridae. Mají malý genom sestávající z 8000 párů bází, které jsou uspořádané do cirkulární dvouvláknové DNA. Při genové expresi je informace z dsDNA přepsána do komplementární mRNA. Dle ní pak v hostitelské buňce probíhá translace na proteiny. (17) Virové onkogeny E6 a E7 jsou exprimovány v časném stadiu životního cyklu viru. Produkty jejich exprese následně ovlivňují metabolismus hostitelských buněk a vznik nádorů. Protein E6 aktivuje enzym telomerázu a tím indukuje onkogenezi. Interaguje také s proteinem p53 hostitelské buňky a degraduje ho. Protein p53 je zodpovědný za apoptózu infikovaných epiteliálních buněk hostitele. Protein E7 se váže na retinoblastomový protein a inhibuje jeho funkci. Tímto spojením dochází k ovlivnění buněčného cyklu. Proteiny E6 a E7 se vážou také na inhibitory cyklin-dependentní kinázy 4, které regulují přechod mezi fázemi buněčného cyklu G1 a S. Dále proteiny E6 a E7 inhibují interferony hostitelské buňky. Při vysokém stupni genové exprese dochází k začlenění virového genomu do genomu hostitelské buňky a zvyšuje se tím proliferace buněk a zhoubnost nádoru. (18) (19)

Během života se po zahájení intimního života s HPV infekcí setká téměř každý. Přenáší se kontaktem „z kůže na kůži.“ Postihuje buňky kůže a buňky sliznic v oblasti genitálií, anu, dutiny ústní a krku. V oblasti hrdla děložního napadá buňky dlaždicobuněčného epitelu exocervixu i cylindrické buňky endocervixu. Může dojít k vzniku prekancerózy CIN (cervical intraepithelial neoplasia), která může vést až ke vzniku karcinomu. HPV infekce se nešíří krví. Karcinom může vzniknout i po 20 letech od samotné HPV infekce. (20) Z více studií vyplývá, že inkubační doba je většinou 10 let. (21)

Rozlišují se dvě skupiny HPV – nízce a vysoce rizikové. Nízce rizikové HPV způsobují na kůži bradavice (condylomata) nebo laryngeální papilomatózu. Patří sem infekce kmenem 6 nebo 11.

Vysoce rizikové HPV mohou způsobit prekancerózní léze až vznik karcinomu. Kolem 70 % karcinomů je důsledkem vysoce rizikových kmenů HPV 16 nebo 18, dalšími jsou podskupiny 31 a 45. (22)

Náš imunitní systém se dokáže s HPV infekcí popasovat a v téměř 90 % neprojde do chronicity, spontánně odezní většinou do 2 let. Důležitým kofaktorem HPV infekce je kouření. Problém nastává u imunokompromitovaných pacientů nebo při chronické infekci ve stresovém období, kdy oslabením imunitního systému může být HPV infekce důsledkem závažných změn až vznikem nádorového onemocnění. Celosvětově je HPV nejčastěji přenosnou sexuální nemocí. (18) Maximum výskytu pozorujeme u sexuálně aktivních žen před dosažením 25. rokem a poté klesá. Po 35. roku je perzistující u 5-10 % žen. Přítomnost HPV v epitelu (nemusí být zachycena cytologií ani kolposkopií) souvisí s neschopností imunitního systému jej eliminovat. Může to vést až ke vzniku prekanceróz a následně karcinomu. (18) I to je jeden z důvodů, proč se ve screeningu více využívá HR HPV test. V České republice se provádí ve 35., 45. a 55. roku věku.

5.2 Promiskuita

Dalším rizikovým faktorem je množství sexuálních partnerů. Promiskuita zvyšuje šanci nakazit se vysoce rizikovým HPV kmenem. Může tím také stoupat virová nálož. Některé studie ukazují, že vyšší virová nálož může být důsledkem perzistence HPV infekce. (23)

5.3 Kouření

Důležitým a někdy podceňovaným preventabilním rizikovým faktorem je kouření. I když v 50. a 60. letech 20. století bylo kouření velice populární a trendy, postupně se začalo projevovat jeho riziko. Ukázalo se, že rizikové je nejenom aktivní, ale i pasivní kouření, a také žvýkání a šňupání tabáku.

V roce 1989 byla publikována práce z Utahu, kde proběhla studie případů a kontrol. Z jejich výsledků bylo prokázáno, jak rizikové kouření je u karcinomu hrdla děložního. Dle výsledků je riziko u kuřáček 3,42 (95 % CI, 2,10-5,57). U pasivního kouření, kdy je žena vystavena cigaretovému kouři více než 3 hodiny denně, je riziko dokonce 2,96 (95 % CI, 1,25-7,03) a žen nekuřáček dokonce ještě vyšší. (24)

Aktivní kouření má největší důsledky na dýchací ústrojí. Pasivní kouření je nebezpečné akutním postižením cév a je stejně nebezpečné jako kouření aktivní. Aktivní kouření jako příčina úmrtí je v ČR u téměř 16 000 osob/rok, pasivní kouření kolem 1500 osob/rok. (3)

Kouření je rizikový faktor pro dlaždicobuněčné karcinomy, což je uvedeno v IARC, ale není prokázán pro adenokarcinomy. (25)

U žen kuřaček je vyšší riziko prevalence HPV infekce. Riziko HPV positivity stoupá s množstvím vykouřených cigaret za den, dokonce u žen, které vykouří více než 15 cigaret za den, je tohle riziko dvojnásobné. (26) Do roku 2016 se na obalech tabákových výrobků neuvádějí údaje o množství nikotinu, dehtů a CO. Tyto údaje jsou standardně dané zjištěním na kouřícím stroji, ve skutečnosti ale každý kuřák má jinou techniku kouření. Důležitým faktorem při samostatném kouření je pH. Při kouření dýmek a doutníků je zásaditější pH, což je důvodem, proč se vstřebávají již v bukalní sliznici. Při kouření cigaret je nutné nikotin šlukovat, aby se kouř z cigaret dostal až do plic, kde je pH nižší. Nikotin není karcinogen, dopad na zdraví mají produkty vznikající při spalování nikotinu. To může být jeden z důvodů, proč v poslední době stoupá obliba elektronických cigaret. Produkty kouření poškozují DNA buněk sliznic a oslabují imunitní buňky, tj mají karcinogenní imunopresivní účinek. Produkty kouření nikotin a kotinin poškozují DNA cervikální sliznice. Při dlouhodobé expozici cigaretovému kouři dochází k inhibici apoptózy, stimulaci buněčné proliferace a VEGF (vascular endothelium growth factor). (27) V imunitním systému dochází k nerovnováze pro- a protizánětlivých cytokinů a T lymfocytů. (28) Je to i jedno z vysvětlení, proč kuřačky mají téměř dvakrát větší šanci HPV infekce. (29)

5.4 Imunitní systém

Imunitní systém hraje důležitou roli v karcinogenezi. Vysoce rizikové kmeny HPV snižují více mechanismy schopnost imunitního systému infekci rozpoznat. (30) U HIV pozitivních pacientek je vyšší riziko vzniku nádorů a karcinom hrdla děložního patří u žen k nejčastějším. (21)

5.5 Infekce chlamydiemi

Infekce chlamydiemi – chlamydia trachomatis – může být příčinou pánevních zánětů nebo až infertility. Ukazuje se, že slizniční buňky po prodělané chlamydiové infekci mají větší riziko získání HPV infekce. Při infekci chlamydiemi dochází k cervikální hypertrofii a indukují dlaždicobuněčnou metaplasii cervikálních buněk, které se pak stávají více zranitelné k dalším superinfekcím – HPV. (31)

5.6 Hormonální antikoncepce a IUD

Dalším rizikovým faktorem je perorální hormonální antikoncepce. Některé práce dokonce uvádějí až 4x větší riziko u žen HPV-pozitivních, které užívaly antikoncepci více než 10 let.

(32) Další práce tuto asociaci nepotvrdily, nebo poukázaly na koincidenci více rizikových faktorů. (33)

Metaanalýza vztahu použití IUD (intrauterinní tělísko) a riziko cervikálního karcinomu ukázala, že uživatelky měly o třetinu nižší riziko vzniku cervikálního karcinomu. (34)

6 Přednádorové změny

Přednádorové změny hrdla děložního zvané prekancerózy mohou vést až ke vzniku samotného karcinomu. Přednádorové změny se označují jako prekancerózy a mohou vznikat z dlaždicového nebo žlázoového epitelu. Incidence žlázoových a dlaždicových prekanceróz je 1:60-80.

Cervikální intraepiteliální neoplázie (CIN) rozlišujeme dysplasie mírného stupně (CIN I) – patologické změny vznikají v dolní třetině epitelu, dysplasie středního stupně (CIN II) a těžká dysplasie i carcinoma in situ (CIN III) - charakteristická četnými i atypickými mitózami v celé šířce epitelu. Poslední dobou se spíše používá označení L-SIL (CIN I) a H-SIL (CIN II a CIN III). L-SIL změny většinou spontánně odezní nebo je nález dlouhodobě stacionární. U menší části žen může přejít do H-SIL až vzniku karcinomu in situ až invazivního karcinomu.

Cervikální glandulární intraepiteliální neoplázie (CGIN) se dělí na low-grade a high-grade léze zahrnující i adenokarcinom in situ.

7 Prognostické a prediktivní faktory karcinomu hrdla děložního

V moderní patologii, hlavně v onkologii, nabývá na významu molekulární patologie a ta se postupem času stává součástí nových vydání klasifikace nádorů dle WHO. Ukazuje se, že je důležité znát nejenom makroskopické a mikroskopické údaje, ale také údaje vycházející z molekulární biologie a cytogenetiky. I to je jeden z důvodů, proč se začíná používat pojem prognostická a prediktivní patologie. Jejich význam je nejenom v časně diagnostice nádorového onemocnění, ale také ve stanovení citlivosti nádoru na onkologickou léčbu, sledování efektivity léčby, analýze protinádorového efektu nových potenciálně účinných látek nebo v potřebě zintenzivnění onkologické léčby.

7.1 Prognostické faktory

Prognostický marker nám napovídá, jak se onemocnění bude chovat bez ohledu na léčbu, tedy jeho prognózu. Může tedy ovlivnit léčebnou strategii, ale nepředpovídá účinnost léčebné modalit. Prognostické markery jsou skupinou faktorů, které jsou sdruženy s nemocným (věk, celkový klinický stav, komorbidity) nebo vychází ze samotného nádoru (morfologické znaky, laboratorní údaje, molekulárně-biologické a genetické znaky).

K prognostickým faktorům, které jsou součástí standardních léčebných postupů, patří velikost nádoru, hloubka stromální invaze, histopatologický typ nádoru, lymfovaskulární invaze nádoru, metastatické postižení lymfatických uzlin.

Poslední léta se s hlubším pochopením molekulární podstaty a biologie ukazuje více a více, že je potřebné hledat další markery, které by byly ještě přesnější. Tato potřeba je dána skupinou pacientek indikovaných ke konzervativním léčebným postupům a také lepší patologickou diagnostikou. Tím vzniká obrovský prostor, ve kterém může být použita i tekutá biopsie. V nalezení nových markerů by se mohl uplatnit princip personalizované medicíny, kdy by byla léčba pacientce takzvaně „ušita na míru“. V případě agresivnějšího typu nádoru by mohla být již při samotné diagnóze indikována agresivnější léčba a poté i při sledování např. častější kontroly. U fertilitu zachovávajících i pokročilejších nálezů by toto zjištění mohlo být velice nápomocné.

Velikost nádoru je spojená s prognózou onemocnění a rizikem postižení lymfatických uzlin. Důležité je také vědět, jaký je podíl velikosti tumoru k objemu samotného hrdla děložního, vzdálenost od pericervikální fascie. Negativním prognostickým faktorem je i šíření nádoru do dělohy. U nádorů větších než 4 cm a při postižení parametrií stoupá incidence metastatického postižení lymfatických uzlin a přítomnost vzdálených metastáz.

Hloubka stromální invaze patří k dalším významným negativním prognostickým faktorům. S hloubkou invaze stoupá riziko postižení lymfatických cév. To bylo zohledněno i v nové FIGO klasifikaci.

Dle histopatologického gradingu dělíme nádory do skupin: G1 – dobře diferencované, G2 – středně diferencované, G3 – špatně diferencované, G4 – nediferencované a Gx – nelze stupeň diferenciace hodnotit. Prognostický význam je spíše u adenokarcinomů. U spinocelulárních karcinomů se často kombinuje s dalšími markery, hlavně přítomností lymfovaskulární invaze.

Jak již bylo řečeno, histologicky se nejčastěji vyskytují dlaždicobuněčné karcinomy a adenokarcinomy. Invazivní dlaždicobuněčné karcinomy se dále mohou dělit na rohovějící a nerohovějící typ, dále bazaloidní, verukózní, kondylomatózní, papilární, lymphoepiteliomali-like dlaždicový a skvamotransicionální. Prognosticky jsou verukózní a kondylomatózní příznivé. Naopak bazaloidní se většinou chová velice agresivně. U adenokarcinomů se nejčastěji vyskytuje mucinózní karcinom. Dále se mohou dělit na endocervikální, intestinální, z prstenčitých buněk a viloglandulární. Vzácně se může vyskytnout také serózní a světlobuněčný adenokarcinom.

Lymfovaskulární nádorová invaze koreluje s rizikem metastatického postižení lymfatických cév. Byla pozorována přímá úměra mezi mírou lymfovaskulární invaze a metastatickým postižením lymfatických uzlin.

Metastatické postižení lymfatických uzlin je velice důležitým prognostickým markerem. Za metastázu je považována velikost nádorového postižení nad 2 mm v histopatologickém preparátu. V operační léčbě karcinomu hrdla děložního nabývá na významu peroperační vyšetření sentinelové lymfatické uzliny před systematickou lymfadenektomií.

VEGF (vascular endothelial growth factor) je glykoprotein, který hraje důležitou roli v angiogenezi tumoru, maligní transformaci a nádorovém růstu. Působí jako endoteliální buněčný mitogen a zvyšuje vaskulární permeabilitu. Vysoká hladina VEGF a VEGF-C může naznačovat horší prognózu onemocnění. (35) Existují práce o souvislosti velikosti tumoru a sérové hladiny VEGF jakož důležitého faktoru angiogeneze. (36) Vyšší hladina VEGF je také spokojována s vyšším rizikem metastatického šíření do lymfatických uzlin. (37)

Dalšími nadějnými prognostickými faktory jsou biomolekuly proteiny p53 a TAp63, p16, p21, p27, COX-2 a geny hTERT a MYC. (38) (39) (40)

Zhodnocení prognostických markerů nám může poskytnout důležité informace a ulehčit predikci rizika šíření onemocnění mimo primární lokalizaci. Tyto informace mohou významnou mírou přispět k personalizaci onkologické léčby – chirurgické, radioterapeutické a systémové.

7.2 Prediktivní faktor

Prediktivní marker předpovídá průběh onemocnění v závislosti na konkrétní léčbě, tj. účinnost konkrétního léku.

NLR (neutrophile-lymphocyte ratio) je poměr absolutní hodnoty neutrofilů a lymfocytů. Jejich poměr před zahájením léčby se ukazuje jako nezávislý prediktivní faktor ve vztahu k PFS a OS. Tento vztah se ukazuje u karcinomu ovaria, endometria, prsu a kolorektálního karcinomu. U systémové zánětlivé reakce mají neutrofilové důležité roli. Utlumují odpověď lymfocytů a T buněk a tím modulují, utlumují systémovou zánětlivou odpověď. (41) Hrají tedy důležitou roli v zánětlivém mikroprostředí a ovlivňují růst, vaskularizaci a tvorbu metastáz nádorových buněk. (42) Rovnováha mezi systémovou zánětlivou odpovědí a protinádorovou systémovou odpovědí se projevuje u nádorových onemocnění jako neutrofilie, trombocytóza a relativní lymfopénie v krevním obraze. Ukazuje se také, že vyšší NLR a vyšší hodnota nádorových markerů jsou asociovány s horší prognózou onemocnění. Přítomnost cirkulujících nádorových buněk (CTC) a vyšší poměr neutrofilů k lymfocytům (NLR) je u solidních nádorů spojováno s horší prognózou onemocnění, např. u karcinomu prsu (43).

Práci zabývajících se jejich významem u karcinomu hrdla děložního není mnoho.

Dalšími nezávislými prognostickými a prediktivními faktory se jeví leukocytóza, trombocytóza, anémie, poměr NLR, které nám také mohou pomoci odhalit rizikové pacientky. (44)

Tekutá biopsie a CTC jsou také významným prediktivním faktorem. Jejich poznáním můžeme odhadnout odpověď na protinádorovou terapii vyšetřením genové exprese, např. zjistit primární chemorezistenci, citlivost na léčbu.

8 Prevence

Prevence v onkologii je neméně důležitou modalitou jako onkologická léčba samotná. Má významný dopad nejenom na samotný vznik onemocnění, ale také na jeho prognózu. Včasná diagnostika nemoci může významně ovlivnit samotnou léčebnou strategii. Dále při samotné terapii prevence nežádoucích účinků ovlivní toleranci léčby a akceptování nemoci pacientem. Prevenci je z těchto důvodů potřeba chápat jako komplexní problematiku, která je nesmírně důležitá a nesmíme na ní zapomínat.

Všeobecně rozlišujeme čtyři podtypy prevence – primární, sekundární, terciární a kvartérní.

8.1 Primární prevence

Primární prevence se snaží zabránit samotnému vzniku nádorového onemocnění. Jejím principem je ovlivnění rizikových faktorů vedoucích ke vzniku nádorového onemocnění. Cílem je snaha ovlivnit incidenci onemocnění. Objektem je celá společnost a životní prostředí, ve kterém existuje. Indikátorem kvality je snížení incidence onemocnění. K primární prevenci patří programy pro odvykání kouření a léčby závislosti na tabáku, boj s alkoholismem, vakcinace proti papilomavirům a hepatitidám, ochrana kůže při expozici nadměrnému slunečnému záření, eradikace infekcí žaludku *Helicobacter pylori*, podpora zdravého životního stylu s pestrou vyváženou stravou a dostatkem pohybu a také analýza životního prostředí a kancerogenů.

V primární prevenci karcinomu hrdla děložního je důležitá HPV vakcinace. Víme, že onemocnění je HPV asociováno. Dlouhodobá expozice HPV infekci, hlavně typům 16 a 18, je významným rizikovým faktorem v karcinogenezi onemocnění. Během života se téměř 80 % žen setká s HPV infekcí. Při dobře fungujícím imunitním systému se s ní většinou dobře vyrovná a zlikviduje ji. V průměru až za 15 let od setkání s rizikovým typem HPV dochází k rozvoji přednádorových změn na hrdle děložním. V České republice se očkují chlapci a dívky ve 11-15 let. V současnosti jsou dostupné tři druhy vakcín proti rizikovým kmenům HPV infekce bivalentní, kvadrivalentní a nonvalentní. První byla v roce 2006 zaregistrována vakcína Silgard zaměřena proti onkogenních typů 16 a 18 a méně rizikovým typům 6 a 11 (způsobují condylomata). Další registrovanou vakcínou byl Cervarix zaměřen na onkogenní typy 16 a 18. Poslední nonvalentní byla registrována v roce 2016 – Gardasil 9. Očkování je hrazeno za zdravotního pojištění dívkám a chlapcům ve věku 11-15 let před zahájením sexuálního života.

Vakcinací se sníží riziko vzniku onemocnění u sexuálně naivních žen o více než 90 %. Pokud se žena očkuje později, kdy se již s HPV infekcí setkala, toto riziko se sníží o 40 až 50 %. Proočkovanost české populace je kolem 60 %. Poslední léta bohužel klesá. Ke srovnání v západních zemích je proočkovanost kolem 75 %. (3)

8.2 Sekundární prevence

Sekundární prevence se snaží aktivně vyhledávat přednádorová stadia onemocnění a zabránit sledováním prekanceróz vzniku nádorového onemocnění. Snahou je zachytit onemocnění ve vyléčitelném stádiu. Indikátorem kvality je poměr lokalizovaných stadií nádorů k pokročilejším stádiím onemocnění a také trend úmrtnosti na nádorové onemocnění.

Důležitými nástroji sekundární prevence jsou – samovyšetření, včasné vyhledání lékaře při zdravotních obtížích a screening nádorových onemocnění. Screeningový program je plošné vyšetření populace, kdy se pomocí levného a jednoduchého testu, snažíme detekovat nádorové onemocnění ve včasném stadiu u nádorů s relativně vysokou incidencí a mortalitou. Z těchto důvodů není screeningový program vhodný pro každé nádorové onemocnění. Cílem screeningu je identifikovat a léčit přednádorové stavy a odstranit lokalizované nádorové onemocnění, než se rozšíří do diseminované podoby.

V ČR byly od roku 2002 postupně do praxe zaváděny screeningové programy pro karcinom prsu, kolorektální karcinom, karcinomu děložního čípku a maligní melanom. V sekundární prevenci probíhá od roku 2012 screeningový program karcinomu hrdla děložního, ve kterém jsou zvány ženy k preventivní gynekologické prohlídce 1x ročně. Při preventivní prohlídce mají pacientky nárok na cytologické vyšetření k odhalení prekanceróz. (45) Dále probíhají preventivní onkologické prohlídky u praktického lékaře, stomatologa, urologa, ORL a na gastroenterologii. Postupně jsou do praxe zaváděny pilotní programy pro metodologii včasného zachytu karcinomu prostaty, plic, pankreatu a ledvin a program zaměřený na specifickou skupinu obyvatelstva – seniory.

Poslední léta je důležitou součástí sekundární prevence také dispenzarizace jedinců, u kterých je prokázána predispozice, zvýšené riziko vzniku nádorového onemocnění, na podkladě rodinné anamnézy nebo genetického testování.

Nejlepší výsledky zatím dosahuje screening u karcinomu prsu při relativně nízkých nákladech. Podíl včasných stadií se i přes probíhající screeningový program u kolorektálního karcinomu a karcinomu hrdla děložního bohužel zatím nemění. Může to být dáno i obtížnější metodikou

než u karcinomu prsu. Screeningový karcinom hrdla děložního zve každý rok pacientky na preventivní gynekologické vyšetření. Součástí prohlídky je také odběr stěru z děložního hrdla k cytologickému vyšetření, které je odesláno do akreditované laboratoře. Ženy ve věku 25-60 let, které se dva roky nedostavily k preventivní gynekologické prohlídce, obdrží od zdravotní pojišťovny doporučení ke gynekologickému vyšetření. Když se i přes to k vyšetření nedostaví, je pojištěkyně písemně zvána každý následující rok. (45)

Screening karcinomu hrdla děložního je součástí Doporučení Rady Evropské unie ze dne 2.prosince 2003 o screeningu zhoubných nádorů. Tento dokument doporučuje sběr dat o preventivních vyšetřeních, následné diagnostice a konečných diagnózách. Podrobné doporučení pro implementaci screeningových programů v jednotlivých státech obsahuje dokument European Guidelines for Quality in Cervical Cancer Screening z 12. března 2018. Tato organizace screeningových programů umožňuje monitoring programu způsobem kompatibilním s European Guidelines. (45)

Poslední léta se do popředí dostává HPV DNA test. U žen mladších 30 let je prevalence HPV infekce velice častá a většinou sama odezní. HPV infekce má dynamický průběh. Z organismu ji eliminuje vlastní obranyschopnost, nebo ji naopak může organismus i nově přenést. Pokud je pacientka do 30 let bezpříznaková, není nutné testování provádět. U starších žen se situace mění. Kombinace cytologického vyšetření a HPV DNA testu má 4krát vyšší schopnost detekovat závažné přednádorové změny na děložním čípku. To potvrdila i tříletá česká studie jménem Libuše, do které se zapojilo 2409 žen ve věku 30 až 60 let z 12 gynekologických centrech v České republice. Cílem bylo získat data o výskytu infekce HPV. HPV test byl proveden ve 3letém intervalu. Díky detekci HPV infekce lze zvýšit citlivost screeningu rakoviny děložního čípku. Umožní to identifikovat závažné prekancerózy, kterých včasný záchyt a léčba zabrání vzniku nádorového onemocnění. Při opakování testu po 3 letech byla potvrzena nižší frekvence pozitivivity HPV testu i abnormálních cytologických nálezů ale hlavně pokles výskytu závažných před nádorových změn. Ve sledované populaci se snížila frekvence HPV pozitivivity z původních 7,4 % na 5,3 %. Průměrný věk, kdy došlo k eliminaci viru byl 41 let. Nejčastěji byla nová infekce diagnostikována mezi 41. a 47. rokem věku. (46) V současnosti je HPV DNA test hrazen ze zdravotního pojištění u žen ve 35, 45 a 55 letech.

8.3 Terciární prevence

Terciární prevence si klade za cíl zabránit progresi nádorového onemocnění. Indikátorem kvality je doba celkového přežití s nádory diagnostikovými v I. až III. stadiu onemocnění.

Poslední léta je snaha o reorganizaci dispenzární péče. Důraz je kladen na lepší komunikaci mezi onkologickým pracovištěm, registrujícími specialisty a praktickými lékaři. Registrující specialisté a praktičtí lékaři se i s pomocí změny úhradové vyhlášky začínají více podílet na dispenzární péči a stávají se její nedílnou součástí. Tento koncept má pomoci také více i u již onkologicky dispenzarizovaných pacientů účasti v programech sekundární prevence. Riziko vzniku dalších novotvarů je v této podskupině vyšší než u běžné populace.

8.4 Kvartérní prevence

Kvartérní prevence se snaží zamezit a předcházet důsledkům nádorového onemocnění a jeho dopad na snižující kvalitu života v poslední fázi onemocnění. Důležitá je její úroveň somatická, psychická i sociální. Její součástí je analgetická terapie, nutriční podpora, řešení komplikací nádorových onemocnění, např. zajištění stentáže při obstrukci, stabilizace skeletu a zachování mobility pacienta u kostních metastáz, aj. Indikátorem kvality jsou dotazníky kvality života, které by měly být včas a pravidelně vyhodnocovány. Důležitým nástrojem v kvartérní prevenci je paliativní medicína a paliativní týmy, které se stávají standardní v nemocniční i ambulantní péči o onkologicky nemocné pacienty. Paliativní péče se snaží pečovat nejenom o pacienta samotného, ale také být podporou pro rodinné příslušníky, kterých zapojení a akceptování onemocnění blízkého člověka je neméně důležité. (47)

9 Nádorové markery

Nádorová markery nebo onkomarkery jsou chemické substance, které jsou přítomny v nádoru nebo jsou nádorem produkovány nebo jsou produkovány nenádorovými buňkami jako reakce na přítomnost nádoru. Můžeme je dělit podle místa produkce, specifčnosti, chemické struktury a biologického charakteru. Patří sem široké spektrum látek, které můžeme dále rozdělit na antigeny, enzymy, nukleové kyseliny, hormony, růstové faktory, receptory nebo proteiny sdružené s nádorovým onemocněním. Některé nádorové markery mohou pomoci odhalit specifické mutace v nádorové tkáni (např. RAS, EGFR) nebo mohou být také sdružené s buněčnou diferenciací (např. PSA, CEA) nebo proliferací (např. Ki67).

Jejich přítomnost můžeme měřit v krvi, moči, výpotcích nebo je stanovovat přímo z biotického vzorku pomocí histochemie. U zdravého člověka se většinou v krvi nevyskytuje jejich zvýšená hladina.

Specifita a senzitivita nádorových markerů při diagnostice onemocnění je většinou nízká. Je to důvod, proč se jejich měření nevyužívá ve screeningu. Výjimkou je nádorový marker PSA u karcinomu prostaty. Při vyšetření může být také jejich hodnota falešně negativní nebo pozitivní, protože jejich analýza může být zatížena chybou v preanalytické fázi – preanalytická chyba (špatný odběr, kontaminace, špatná příprava před odběrem vzorku), chybné stanovení v laboratoři, atypické chování nádoru (neprodukuje dané nádorové markery). Vyšší hladina nádorových markerů u zdravého jedince může svědčit také pro benigní nález, zánětlivý proces, cirhózu jater, kožní eflorescence nebo výpotky při kardiálním selhávání aj. Vyšší hladina bývá většinou také u kuřáků, typicky je vyšší hladina CEA. Jeden nádorový marker může být elevován u různých nádorových onemocnění, např. CEA u kolorektálního karcinomu, karcinomu hrdla děložního, karcinomu prsu. U nádorového onemocnění je jejich koncentrace většinou vysoká a jejich hladina závisí na velikosti nádorové masy, intenzitě sekrece nádorového markeru nádorovými buňkami nebo degradací molekul markeru.

V léčbě nádorového onemocnění je dynamika nádorových markerů důležitým vodítkem monitorování efektu léčby, např. u karcinomu ovaria, prostaty, pankreatu, aj. Mohou pomoci ve sledování při remisi onemocnění a odhalit časný relaps onemocnění. Vedle sledování klinického stavu pacienta a zobrazovacích vyšetření nám mohou poskytnout důležitou informaci o vývoji nemoci – mají pomocnou roli. Při hodnocení hladiny nádorových markerů se za zvýšenou hladinu považuje hladina obvykle nad 95. percentilem populace. Vždy je nutno hladiny a dynamiku posuzovat individuálně u každého jedince. Příkladem může být karcinom

ovaria a hladina nádorového markeru Ca125. S použitím algoritmu ROMA zvyšuje senzitivitu, a i výsledek spadající do normálního populačního intervalu může u daného jedince upozornit na elevaci.

U karcinomu hrdla děložního jsou nejčastěji v praxi používány nádorové markery SCC, CEA a Ca19-9.

Nádorový marker SCC patří do skupiny antigenů. SCC je produkován především epidermoidními buňkami. Jeho hladina je typicky zvýšená u dlaždicobuněčných karcinomů. Často se využívá jako pomocný marker u karcinomu plic, karcinomu hrdla děložního, nádorů hlavy a krku. Při sledování během onkologické léčby jeho hodnota koreluje s léčebnou odpovědí a také může pomoci včasné odhalit relaps onemocnění. (48) Senzitivita nádorového markeru SCC je nízká (53,3 %), ale specifita je poměrně vysoká (94,3 %). (49) Dle některých prací může SCC předcházet klinický relaps onemocnění až o 5 měsíců. (50)

CEA je glykoprotein, který se nejspíše podílí na procesu buněčné adheze. U dospělého člověka je produkován v minimálním množství epiteliálními buňkami gastrointestinálního traktu, žaludku a bronchů. Největší význam při stagingu a monitorování nádorového onemocnění má u nádorů gastrointestinálního traktu. Často bývá elevován také u nádorů plic, gynekologických nádorů a nádorů prsu. Jeho zvýšená hladina je také častá u kuřáků.

Ca19-9 patří mezi antigeny, které jsou u dospělého člověka produkovány ve velmi malém množství epiteliálními buňkami bronchů a trávícího traktu.

10 Cirkulující nádorové buňky

Poslední léta se hledají jiné možnosti, které by mohly pomoci k diagnostice i monitorování nádorových onemocnění. Nadějí se stává tekutá biopsie. Tekutá biopsie je jednoduchá metoda, která není zatěžující pro pacienta a odběrem ampulky krve můžeme získat zajímavé informace o nádorovém onemocnění.

Je známo, že nádorové buňky u solidních nádorů v průběhu onemocnění často mutují. Novými mutacemi mění své vlastnosti a citlivost k onkologické léčbě. Tento rozbor nám také může poskytnout cenné informace o minimální reziduální nemoci (tj. o nádorových buňkách, které nejsou zachytitelné běžnými zobrazovacími vyšetřeními). Z odebrané periferní krve můžeme analyzovat cirkulující DNA nebo cirkulující nádorové buňky, které můžeme dále molekulárně zkoumat včetně celogenomové analýzy. V klinické praxi nám tedy tekutá biopsie může dát cenné informace o sledování odpovědi na léčbu, cíleném výběru terapie, monitoraci reziduální nemoci, detekce nových mutací v nádoru, včasné detekci metastáz, pomocnou by mohla být u screeningu osob s vysokým rizikem onkologického onemocnění. (51)

Cirkulující nádorové buňky pocházejí z nádoru, cirkulují v krevním řečišti a mohou zahrnout vzdálené metastázy, které pak také mohou být zdrojem CTC. Jsou součástí hematogenního rozsevu onemocnění. Proces uhníždění vysvětluje hypotéza seed and soil dle S. Pageta. CTC se po odloučení z nádoru dostává přes kapiláry do krevního řečiště. Možnost tzv. intravazace často podmiňuje proces epiteliálně mesenchymální transformace (EMT), který mění molekulární charakter buňky. CTC mohou zakládat vzdálené metastázy a při zachycení na endotel kapiláry a extravazaci se vracejí zpátky k původním vlastnostem pomocí mesenchymálně epiteliální transformace (MET). To vysvětluje, proč mají CTC charakteristické vlastnosti dle tkáně, ze které pocházejí. (52) (53)

CTC hrají klíčovou roli při šíření nádoru několika biologickými procesy. Zejména je to proces EMT (epiteliální – mesenchymální transformace). Během něj epitelové buňky ztrácejí cell- to- cell adhezi zprostředkovanou down-regulací epiteliálně asociovaného E-cadherinu a up- regulací mesenchymálního N-cadherinu, což jim umožňuje invadovat extracelulární matrix a migrovat do vzdálených tkání. (54)

Hematogenní šíření také vysvětluje, proč mají pacienti se zvýšenou hladinou CTC vyšší riziko tromboembolické nemoci. (52)

Všeobecně jsou CTC vzácné. V krvi je jedna CTC buňka detekována asi na 10^7 krevních elementů. Zvýšená hladina CTC a nádorových markerů svědčí pro horší prognózu onemocnění. Dlouho se věřilo, že přítomnost CTC je znakem agresivity onemocnění a jeho schopnosti metastazovat, a tedy znakem spíše pokročilého onemocnění. Nyní už víme, že pozitivita CTC svědčí pro horší prognózu onemocnění. Vyšší hladina CTC během léčby značí také horší odpověď na léčbu a prognózu onemocnění. (55) (56) (57) Naopak nízká hladina CTC během léčby je příznivým indikátorem odpovědi na léčbu a přežití. (58) CTC jsou prognostickým i prediktivním markerem onemocnění. (52) Zvýšená hladina CTC během léčby svědčí i přes odpověď dle zobrazovacích vyšetření (CT, PET) pro její nedostatečnost. (59) (60)

Izolovat CTC můžeme různými separačními metodami. Může to být na základě exprese povrchových markerů (např. Epcam), na které je založena první FDA certifikovaná metoda – CellSearch. Druhým způsobem je separace na základě fyzikálních vlastností (např. velikost, deformabilita, aj.). Výhodou tohoto způsobu je, že CTC se zachovají živé a může se s nimi dále pracovat – kultivovat je in vitro a provést buněčnou a molekulární analýzu, např. genovou expresi nebo sekvenční analýzu. Genová exprese nám může poskytnout důležité informace o genech asociovaných s tumorem nebo o genech asociovaných s chemorezistencí. Tyto informace nám můžou pomoci ve zlepšení strategie léčebného procesu.

11 Cíle studie

V našem výzkumu jsme se zaměřili na pacientky s inoperabilním karcinomem hrdla děložního, které byly léčeny radikální radioterapií s konkomitantní chemoterapií. Naším cílem bylo najít nový marker, který by nám pomohl identifikovat rizikové pacientky a také by nám pomohl odhalit dřívější relaps onemocnění. Měl by to být také marker, který by byl lehce zpracovatelný a mohl by nám poskytnout cenné informace o onemocnění. Takový marker nám v běžné praxi chybí. I když jsou nám k dispozici histologické vyšetření, zobrazovací vyšetření a laboratorní vyšetření včetně nádorových markerů, v běžné klinické praxi ale často i to nestačí. Každé onemocnění si jde svou vlastní cestou i přes naši největší snahu tuto cestu ovlivnit. V projektu jsme se proto zaměřili na hledání nových molekul, které by mohly pomoci ke sledování efektu léčby, popřípadě být pomocným nástrojem k jejímu zintenzivnění. Zajímali nás také vztah těchto molekul k běžně používaným markerům ke zhodnocení léčebné odpovědi. Dále by tyto molekuly mohly být nápomocné také k odhalení relapsu onemocnění.

Do projektu byly zařazeny pacientky Onkologické kliniky FNKV. Cílem projektu bylo přinést nové informace, které by nám pomohly zlepšit celkové přežití pacientek.

V našem projektu se vedle běžně prováděných vyšetření při stagingu onemocnění analyzovala také tekutá biopsie – zaměřovali jsme na cirkulující nádorové buňky. Sledovali jsme jejich výskyt u inoperabilního karcinomu hrdla děložního léčeného chemoradioterapií a dále jejich dynamiku během dalšího sledování pacientek.

Hledali jsme souvislost mezi výskytem CTC a stádiem onemocnění, dále CTC a nádorovým markerem SCC. Sledovali jsme četnost výskytu CTC před léčbou, po skončení léčby a při dispenzárním sledování pacientek jako důležitého prognostického a prediktivního faktoru, který nám může pomoci zefektivnit a zkvalitnit léčebnou strategii k dosažení co nejlepšího výsledku léčby.

CTC se jeví jako nový pomocný marker v tolik diskutované personalizované medicíně. (61) Předpokládali jsme, že monitorování CTC je citlivý a včasný ukazatel agresivního onemocnění u pacientek v riziku. Tento marker by nám také mohl pomoci odhalit subklinickou recidivu onemocnění. To vše by nám mohlo umožnit včasnější zahájení cílené léčby a zlepšení prognózy pacientek. Zajímali nás vstupní hodnoty CTC a NLR při zahájení léčby ke vztahu k prognóze onemocnění.

Sledování CTC v běžné klinické praxi je jednoduché minimálně invazivní vyšetření. Toto vyšetření pacientky ještě více nezatěžuje při již tak náročné onkologické terapii.

12 Postup práce

12.1 Metodologie

Náš výzkum probíhal na Onkologické klinice FNKV v letech 2018 až 2021. Bylo do něj zařazeno 30 pacientek naší kliniky, které byly diagnostikovány s karcinomem hrdla děložního. Všechny pacientky byly diagnostikovány s inoperabilním stadiem onemocnění. Žádná pacientka nepodstoupila operaci. Všechny pacientky byly léčeny radikální radioterapií s potenciací konkomitantní chemoterapií.

Každá pacientka byla o probíhající výzkumu informována ústně při návštěvě naší kliniky. Všechny pacientky podepsaly informovaný souhlas ve výzkumném šetření o ochraně osobních údajů. Zpracování dat bylo schváleno Etickou komisí FNKV (EK-VP/67/0/2019).

Klinická data byla získávána ze zdravotnické dokumentace, pomocí UNIS FNKV a odběrem periferní krve u každé zařazené pacientky.

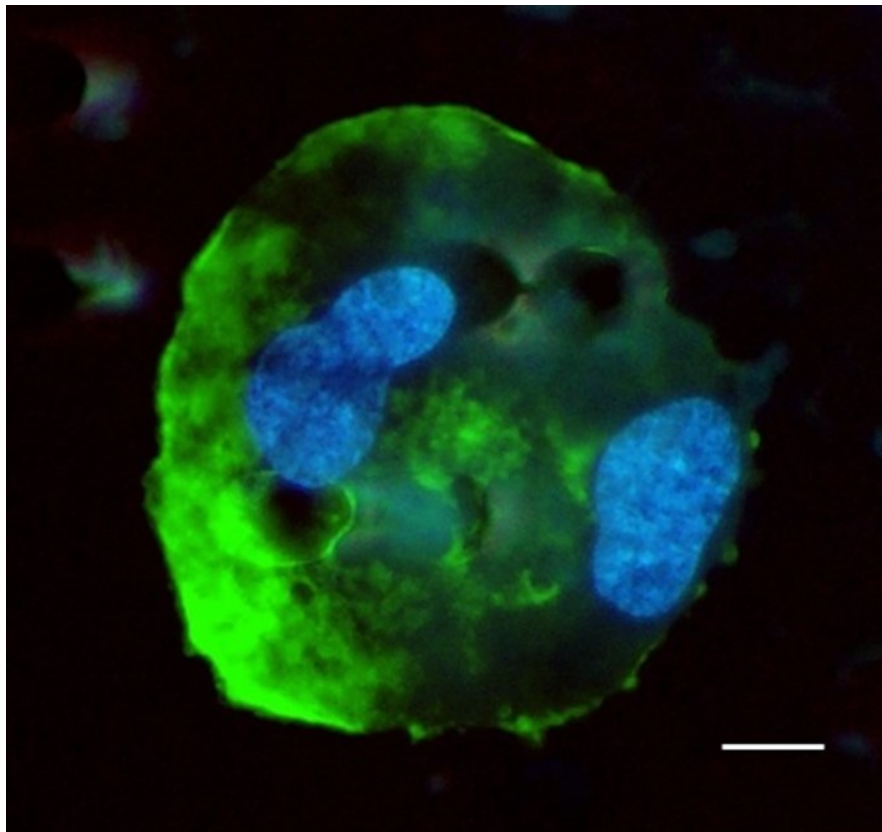
V našem souboru jde o prospektivní analýzu se zaměřením na CTC v korelaci s charakteristikou nádorového onemocnění, stadiem onemocnění, odpovědí na léčbu a dispenzarizaci pacientek. U všech pacientek byly odebrány CTC před zahájením léčby, během léčby a při dalším sledování pacientek.

U všech pacientek byl proveden staging onemocnění. Rozvaha o léčebné strategii proběhla v rámci multidisciplinárního týmu. Všechny pacientky byly indikovány k radikální radioterapii s potenciací chemoterapií. Každá pacientka absolvovala vstupní gynekologické a fyzikální vyšetření a odběr anamnézy. Onemocnění bylo verifikováno biopsií. Pomocí biopsie byl zjištěn histologický typ nádoru. Pokud to bylo možné, v některých případech i stupeň diferenciací nádoru a zjištění přítomnosti lymfangioinvaze. Všechny pacientky v našem souboru měly histologicky verifikovaný typ nádoru. Vstupně byla všem pacientkám odebrána také krev na základní laboratorní vyšetření – hematologické, základní biochemie a odběr nádorových markerů. Horní hranice normy nádorového markeru SCC je v naší laboratoři 2,0 ng/ml. Byly doplněny také zobrazovací vyšetření. K posouzení lokální pokročilosti nálezu a postižení pánevních lymfatických uzlin vaginální ultrazvuk, popřípadě také magnetická rezonance pánve. K vyloučení vzdálených metastáz lymfatických uzlin parenchymových orgánů CT vyšetření, případně PET vyšetření. U pacientek byl také proveden odběr periferní krve k analýze CTC. Odběr CTC byl proveden před zahájením léčby, během léčby a při sledování pacientek (většinou každé 3 měsíce).

Po dokončení stagingu všechny pacientky podstoupily léčbu chemoradioterapií. V našem souboru byly stadia T2b až T3b, N0 nebo N1 (dle TNM klasifikace). Všechny pacientky podstoupily radikální radioterapii na oblast malé pánve, i.d. 45,0 Gy aplikovanou v 25 frakcích. Dle rozsahu postižení lymfatických uzlin bylo dle doporučení EMBRACE v některých případech ozařované pole rozšířeno – při postižení zevních ilik byl horní okraj pole rozšířen na horní okraj L4, u postižení společných ilik po horní okraj L2, při postižení paraaortální uzlin zahrnutý do ozařovacího objemu i paraaortální uzliny, při postižení dolní třetiny vagíny také inguinální uzliny. (62) Před dokončením zevního ozáření byly pacientky gynekologicky vyšetřeny k průběžnému zhodnocení efektu léčby. Následně pacientky podstoupily 2 D, nebo častěji 3 D uterovaginální brachyterapii. Brachyterapie byla nejdříve zařazena v 5.týdnu zevní radioterapie nebo hned po jejím skončení. Byla použita brachyterapie pomocí Ir 192 HDR. Byly provedeny celkem 4 aplikace brachyterapie, dávka na frakci 6,5 nebo 7,0 Gy, aplikace 2x týdně. Konkomitantní chemoterapie byla aplikována 1x týdně, začátkem týdne. Při zahájení léčby byla ve většině případů aplikována konkomitantní chemoterapie a poté byla pacientce aplikována radioterapie. Jako cytostatikum byla použita cisplatina v dávce 40mg/m², nejvýše absolutně 70mg/dávka. U jedné pacientky byl konkomitantně aplikován paclitaxel weekly (adenokarcinom, vstupně horší renální parametry). Aplikováno bylo celkem 5 dávek konkomitantní chemoterapie. U pacientek většinou léčba nepřesáhla 52 dnů.

CTC byly získány odběrem periferní krve 2x8ml z kubity do EDTA zkumavky, která obsahuje jako antikoagulans 1,6mg EDTA/ml. Ještě před zpracováním bylo odebráno 200 µl promíchané periferní krve do eppendorfky a uloženo do mrazícího zařízení. Z periferní krve byly CTC izolovány pomocí metody Metacell (Metacell, Metacell s.r.o., Ostrava, Czech Republic). Tato metoda je založená na separování buněk na základě jejich velikosti. Filtrace přes Metacell odfiltruje buňky průměru 8 mikrometrů. Touto přirozenou filtrací se od sebe oddělí krevní buňky od CTC. Filtraci se snažíme provést do 24 hodin od odběrů krve od pacienta, do té doby vzorek uchováváme v lednici ideálně při 4 až 8°C. Membránu s nosičem vložíme do 6 jamkové destičky. Poté je destička kultivována in vitro, většinou 3 až 5 dnů v termostatu (37 °C, 5,0% tenze CO²). Cytomorfologické hodnocení pro identifikaci CTC je založeno na vitálním fluorescenčním barvení jádra a cytoplazmy. Buňky jsou pak obarveny. K nabarvení cytoplazmy jsme používali CellTracker (CellTracker, Thermofischer Scientific, Waltham, MA, USA) a k nabarvení jádra Nucblue (Nucblue, Thermofischer Scientific, Waltham, MA, USA). Po nabarvení jsou CTC pozorovány pod mikroskopem a odečteny (nejdříve za 30 minut po nabarvení). CTC mají většinou velké jádro s několika nukleoly, jádro má nepravidelný

okraj. Buněčná membrána může být také nepravidelná. V buňkách můžeme také nabarvit mitochondrie a tím zobrazit proliferaci a buněčnou aktivitu. Za hranici negativity je považováno 5 buněk. (2) Vzorek byl následně zpracován. Po mikroskopickém odečtu jsou možnosti zpracování k molekulární analýze – membrána se dává do RLT a následně do mrazicího zařízení nebo k imunohistochemii – membrána se dává na sklo. V následujících dnech, většinou 3 dny, bylo provedeno druhé čtení, opět s nabarvením jádra a cytoplazmy. Poté je opět vzorek dále zpracován.



Obrázek 3: CTC z periferní krve po fixaci a nabarvení

Po identifikaci CTC může dojít k jejich další specifikaci pomocí profilování genové exprese a funkčních testů. Profilování genové exprese je důležitý nástroj, který umožňuje získat informaci o výskytu mRNA. V našem souboru byla provedena také qPCR analýza RNA izolovaná z CTC. qPCR analýza zahrnovala tumor-asociované (TA) a chemorezistentně-asociované (CA) geny. Buňky zachyceny na membráně byly lyzovány v RLT+ beta- mercaptoethanol buffer a uchovány při teplotě -20 °C pro RNA analýzu. Analýza qPCR identifikuje frakci leukocytů a získanou CTC frakci (po in vitro inkubaci) získanými před zahájením terapie. TaqMan™ Gene Expression Assays (Thermo Fischer Scientific, U.S.) byl použit ke genové expresi ve všech vzorcích: tumor-asociované geny (TA) - ACTB

(kontrola), CD68, CD45, CD68, KRT18, KRT19, EpCAM, VIM, HIF1A, POU5F1, VEFA, PDL1, SOX2 a také geny asociované s chemoterapií (CA) – byly požitý MRP1, MRP5, MRP7 a ERCC1. Na základě analýzy genové exprese vzorky s CTC byly považovány za CTC-positivní při expresi dvou nebo více TA genů ve srovnání se vzorky s leukocyty.

U každé pacientky byla také sledována dynamika změn v počtu CTC vlivem onkologické léčby – chemoterapie a radioterapie.

Všechny výsledky byly zadány do naší databáze.

Po skončení léčby byly pacientky sledovány každé 3 měsíce. Při každém vyšetření byla pacientka gynekologicky vyšetřena a byl proveden odběr CTC. Dále byla fakultativně doplněna laboratoř (krevní obraz, základní biochemie) včetně nádorových markerů, zobrazovací vyšetření – ultrazvuk, MRI nebo CT. Zhodnocení efektu léčby bylo za 3 měsíce – předpokladem byla makroskopická kompletní remise onemocnění.

12.2 Charakteristika patientek v souboru

V našem souboru bylo zařazeno celkem 30 patientek. Všechny pacientky měly řádně doplněný staging onemocnění, gynekologické a fyzikální vyšetření, laboratorní vyšetření včetně nádorových markerů a histologickou verifikaci tumoru. Všechny pacientky byly indikovány gynekologicko-onkologickým multidisciplinárním týmem FNKV k radikální radioterapii. Žádná z patientek nepodstoupila primární operační výkon pro diagnózu karcinom hrdla děložního. Medián věku patientek v souboru byl 63 let. V souboru bylo 23 patientek postmenopauzálních před zahájením léčby.

Z našeho souboru mělo 11 patientek postižení lymfatických uzlin dle zobrazovacích vyšetření, zbylých 19 patientek postižené lymfatické uzliny nemělo. Dále bylo 21 patientek stadia T2b, 1 patientka stadia T3a, 6 patientek stadia T3b a 1 patientka stadia T1b2 a 1 patientka T1b2-T2b. U patientek stadia T1b2 nebyl v jednom případě operační výkon indikován vzhledem k věku a komorbiditám a u druhé pacientky byla v minulosti provedena excise z čípku, proto nebylo možné relevantně o stadiu onemocnění rozhodnout.

Na základě histologické verifikace byl u 25 patientek potvrzen invazivní dlaždicobuněčný karcinom, u 4 patientek invazivní adenokarcinom a u 1 pacientky invazivní adenoskvamózní karcinom. Většina (23 patientek) měla doplněn i grading onemocnění – G1 diagnostikováno v 1 případě, G2 u 10, G3 u 10 a G4 u 2 případů. Patientky podstoupily radioterapii a konkomitantní chemoterapii dle ESTRO, ESGO a NCCN guidelines.

Počet pacientů		30
Průměrný věk		63 (30-87)
Stadium onemocnění	T1b2	2
	T2b	21
	T3a	1
	T3b	6
Postižení lymfatických uzlin	N0	19
	N1	11
Vzdálené metastázy	M0	30
	M1	0
Histologie	Dlaždicobuněčný karcinom	25
	Adenokarcinom	4
	Adenoskvamózní karcinom	1
Lymfovaskulární invaze	nepřítomna	2
	přítomna	5
	neznáma	23
Nádorový grade	Gx	7
	G1	1
	G2	10
	G3	10
	G4	2

Tabulka 1: Charakteristika pacientek v souboru

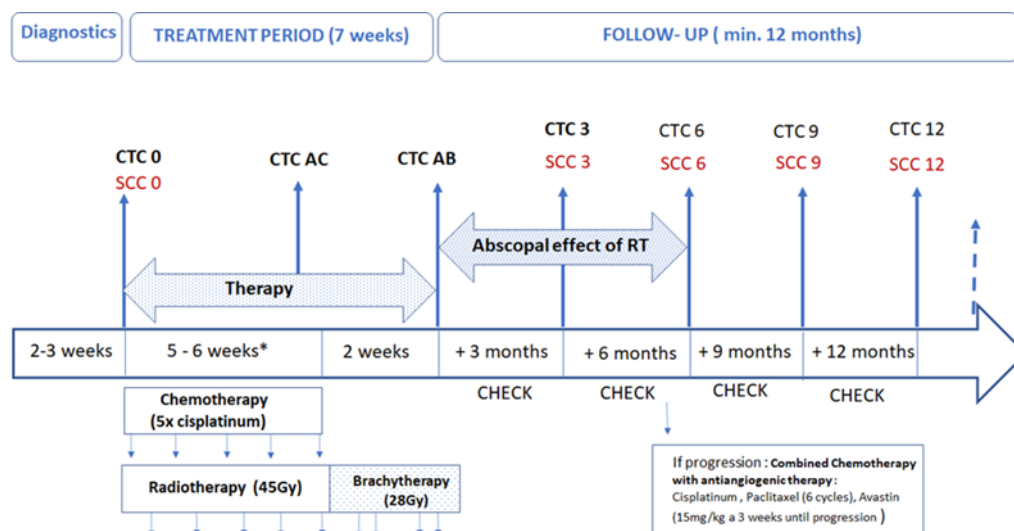
Pacientky podstoupily radioterapii na oblast malé pánve, l.d. 45,0Gy/25 frací v délce 5 týdnů, denně od pondělí do pátku. Na základě postižení lymfatických uzlin bylo u některých pacientek ozařované pole rozšířeno – u 8 pacientek o paraaortální lymfatické uzliny po horní okraj L2, u 5 pacientek při postižení společných nebo vnitřních iliak po horní okraj L4 a u 2 pacientek při postižení dolní třetiny vagíny o tříselné uzliny.

Chemoterapie byla aplikována konkomitantně 1x týdně. Z našeho souboru 5 pacientek neabsolvovalo konkomitantní chemoterapii vzhledem k věku, komorbiditám a méně pokročilému vstupnímu nálezu.

Všechny pacientky dokončily řádně plánovanou léčbu, žádná pacientka neukončila léčbu předčasně. Zhodnocení léčby proběhlo 3 měsíce po skončení radioterapie. U všech pacientek došlo k regresi nálezu. Po skončení konkomitantní chemoradioterapie byly pacientky sledovány jednou za 3 měsíce. Při kontrole bylo provedeno gynekologické vyšetření, laboratorní odběry včetně nádorových markerů, odběr CTC a event. zobrazovací vyšetření (UZ, CT, MRI nebo PET). Průměrná doba sledování byla 439 dnů (14 měsíců), údaj při statistickém zpracování 2022, a bylo provedeno 167 rozborů krve na CTC. Při gynekologickém vyšetření byl lokální nález zhodnocen jako kompletní odpověď (CR), částečná odpověď (PR), stabilní onemocnění (SD) nebo progrese (PD). Při dostupnosti zobrazovacího vyšetření byla odpověď zhodnocena dle RECIST kritérií. Hodnota SCC během sledování byla hodnocena jako stoupající, klesající nebo stabilní. CTC byly reportovány jako negativní, pozitivní nebo během sledování stabilní.

Relaps onemocnění byl definován jako lokální relaps nebo přítomnost vzdálených metastáz. V našem souboru progredovalo 10 pacientek – lokálně nebo vzdáleně, ve většině případů byly přítomny i vzdálené metastázy. Ze vzdálených metastáz byly diagnostikovány metastázy lymfatických uzlin, plic a jater. Tyto pacientky byly při dobrém klinickém stavu indikovány k terapii cisplatinou, paclitaxelem a bevacizumabem, která se podává intravenózně á 3 týdny do progrese onemocnění nebo nepřijatelné toxicity. Dvě pacientky, které zprogredovaly, byly zařazeny do klinické studie s imunoterapií – atezolizumab, na základě jejich HPV16 pozitivity.

Jedna pacientka z našeho souboru se po skončení léčby odstěhovala a dále nedocházela ke kontrolám.



Obrázek 4: Přehled průběhu léčby a sledování pacientek včetně odběrů CTC a SCC

12.3 Hypotézy

V našem výzkumu jsme se snažili zodpovědět otázky:

- Koreluje počet a dynamika CTC před léčbou a po léčbě s prognózou onemocnění?
- Existuje vztah hladiny CTC a stadia onemocnění při zahájení léčby?
- Existuje vztah mezi CTC a nádorovým markerem SCC?
- Jsou CTC prognostickým markerem?
- Jsou CTC prediktivním markerem?

12.4 Statistická analýza

Ke statistické analýze jsme použili program STATISTIKA statistické testy – t-test, párové testy, ANNOVA. Za statisticky významnou p-hodnotu jsme uvažovali hodnotu $p > 0,05$. U všech kvantitativních proměnných byly vyhodnoceny, spočteny základní deskriptivní parametry jako směrodatná odchylka, průměr, medián, minimum i maximum a u kvalitativních proměnných procentuální zastoupení i absolutní počty. Kvalitativní i kvantitativní proměnné byly hodnoceny celkově i v jednotlivých skupinách.

Data byla také porovnána standardními testy použitím GraphPad Prism software vs.9.1.0 (GraphPadPrism, U.S.).

Vyhodnocení qPCR dat bylo na základě standardu ddCT metody (Livak et al., 2001). qPCR výsledky byly analyzovány použitím GenEx Professional software (MultiD, SE). Rozdíly mezi vzorky byly srovnány U Mann-Whitney testem (signifikance level při $p < 0,05$, když nenastaveno automaticky GenEx).

12.5 Limitace práce

Největší limitací naší práce je epidemiologická situace poslední doby související s pandemií COVID. Tato situace ovlivnila běžný provoz nemocnic a tím i naši práci. Nejvíce byl tenhle dopad patrný ve stadiu diagnostiky onemocnění, kdy se ukazuje, že pacientky chodily v čase pandemie na preventivní kontroly méně často. Na onkologii se někdy ani nedostaly pro pokročilost onemocnění. V době bez covidu by bylo možné pacientky sledovat pravidelněji a doplnit více odběrů. Je to také jeden z důvodů, proč u některých pacientek některý z plánovaných odběrů chyběl. Kontroly byly často ovlivněny pandemickou situací a omezením provozu nemocnic. Další limitací se jeví menší soubor pacientek, protože naše práce probíhala jen ve FNKV. Na druhé straně se naše nemocnice řadí k jedné s nejvyšším počtem léčených

pacientek s gynekologickými malignitami. V posledních letech jich je dokonce nejvíce v ČR. Větší soubor pacientek s sebou přináší přesvědčivější výsledky.

13 Výsledky studie

V našem souboru bylo zařazeno celkem 30 pacientek. Při hodnocení jsme se zaměřili hlavně na prvních 9 měsíců sledování, protože dále byl sběr dat ovlivněn covidovou pandemií a odběr vzorků neprobíhal dle původního plánu.

Když se podíváme na soubor všech pacientek, vstupní hodnota SCC byla průměrně 17,52 a CTC 227, tj. u většiny pacientek zvýšená hodnota. Za 3 měsíce od skončení léčby dochází k poklesu a následně k mírnému vzestupu. Průměrné přežití je více než 27 měsíců.

	N	Průměr	CI -95 %	CI 95%	Medián
Před léčbou					
SCC	28	17.526	10.313	24.739	10.060
CTC 1.odčítání	26	227.308	77.071	377.544	40.000
CTC 2.odčítání	26	235.692	85.423	385.962	30.000
NLR	27	2.970	2.519	3.422	2.925
Před brachyterapií					
CTC 1.odčítání	25	103.320	12.933	193.707	20.000
CTC 2.odčítání	23	172.826	24.124	321.528	20.000
3 měsíce po skončení léčby					
SCC	27	4.900	-2.629	12.429	1.030
CTC 1.odčítání	26	44.000	3.774	84.226	7.500
CTC 2.odčítání	25	54.200	20.599	87.801	20.000
6 měsíců po skončení léčby					
SCC	21	1.916	0.846	2.987	1.290
CTC 1.odčítání	23	69.435	17.716	121.154	20.000
CTC 2.odčítání	22	53.546	6.300	100.791	20.000
9 měsíců od skončení léčby					
SCC	20	4.389	-0.187	8.964	1.545
CTC 1.odčítání	18	84.611	-31.613	200.835	5.000
CTC 2.odčítání	19	157.368	8.723	306.014	15.000
Přežití (měsíce)	30	27.900	25.218	30.649	29.000

Tabulka 2: Soubor všech pacientek – vztah CTC a SCC

Když se podíváme podrobněji, u stadia T2b pokles trvá i v 6. měsíci sledování.

	N	Průměr	CI -95 %	CI 95%	Medián
Před léčbou					
SCC	20	16,370	8,212	24,527	10,060
CTC 1.odčítání	18	279,611	79,481	479,741	50,000
CTC 2.odčítání	18	288,222	87,680	488,765	50,000
NLR	19	2,956	2,364	3,547	2,967
Před brachyterapií					
CTC 1.odčítání	17	126,059	-7,083	259,206	20,000
CTC 2.odčítání	16	113,000	-29,486	255,486	15,000
3 měsíce po skončení léčby					
SCC	20	6,380	-3,946	16,705	1,170
CTC 1.odčítání	18	13,556	4,066	23,045	4,000
CTC 2.odčítání	17	48,235	10,105	86,365	10,000
6 měsíců po skončení léčby					
SCC	15	1,559	0,967	2,151	1,100
CTC 1.odčítání	16	39,438	-0,192	79,067	10,000
CTC 2.odčítání	15	27,533	6,068	48,998	5,000
9 měsíců od skončení léčby					
SCC	14	2,638	1,116	4,160	1,750
CTC 1.odčítání	12	107,250	-73,605	288,105	7,500
CTC 2.odčítání	13	203,077	-16,150	422,304	15,000
Přežití (měsíce)	21	27,619	24,537	30,701	29,000

Tabulka 3: Vztah CTC a SCC u stadia T2b

Pacientky stadia T3b mají klesající trend CTC až do 9.měsíce, i když od 6.měsíce je vidět vzestupný trend u SCC.

	N	Průměr	CI -95 %	CI 95%	Medián
Před léčbou					
SCC	5	28,646	-2,696	59,988	22,390
CTC 1.odčítání	6	143,667	-193,956	481,289	12,500
CTC 2.odčítání	6	151,667	-182,091	485,425	22,500
NLR	6	3,098	2,064	4,133	2,788
Před brachyterapií					
CTC 1.odčítání	5	61,400	-69,910	192,710	20,000
CTC 2.odčítání	5	411,400	-255,895	1078,695	30,000
3 měsíce po skončení léčby					
SCC	4	0,705	0,404	1,006	0,690
CTC 1.odčítání	6	128,333	-70,275	326,942	50,000
CTC 2.odčítání	6	65,833	-55,938	187,605	20,000
6 měsíců po skončení léčby					
SCC	5	3,270	-2,337	8,877	1,370
CTC 1.odčítání	5	83,200	-25,428	191,828	50,000
CTC 2.odčítání	5	43,000	-10,334	96,334	30,000
9 měsíců od skončení léčby					
SCC	4	12,315	-22,128	46,758	1,680
CTC 1.odčítání	4	40,250	-76,213	156,713	5,000
CTC 2.odčítání	4	25,000	-17,100	67,100	20,000
Přežití (měsíce)	6	24,833	16,619	33,498	27,000

Tabulka 4: Vztah CTC a SCC u stadia T3b

Největší rozdíl je patrný u pacientek s negativními a pozitivními lymfatickými uzlinami. U pacientek s N0 jsme pozorovali pokles CTC až do 6. měsíce a poté jejich pozvolný vzestup, SCC zaostávalo.

	N	Průměr	CI -95 %	CI 95%	Medián
Před léčbou					
SCC	19	11,062	3,584	18,540	6,630
CTC 1.odčítání	16	240,188	34,897	445,478	40,000
CTC 2.odčítání	16	289,250	61,111	517,389	40,000
NLR	16	2,908	2,259	3,558	2,788
Před brachyterapií					
CTC 1.odčítání	17	119,471	-13,502	252,443	20,000
CTC 2.odčítání	15	116,333	-36,119	268,786	10,000
3 měsíce po skončení léčby					
SCC	17	1,315	0,685	1,942	1,030
CTC 1.odčítání	15	48,933	-21,820	119,687	3,000
CTC 2.odčítání	14	40,000	7,338	72,662	20,000
6 měsíců po skončení léčby					
SCC	14	1,386	0,967	1,806	1,195
CTC 1.odčítání	15	54,733	-16,665	126,131	10,000
CTC 2.odčítání	14	58,429	-17,089	133,946	15,000
9 měsíců od skončení léčby					
SCC	14	2,024	1,093	2,954	1,545
CTC 1.odčítání	12	95,167	-86,384	276,718	5,000
CTC 2.odčítání	13	216,539	-1,292	434,369	30,000
Přežití (měsíce)	19	29,632	26,699	32,563	30,000

Tabulka 5: Vztah CTC a SCC u pacientek N0(bez postižení lymfatických uzlin)

U onemocnění N1 rozdíl proti N0 není tolik výrazný.

	N	Průměr	CI -95%	CI 95%	Medián
Před léčbou					
SCC	9	31,173	17,479	44,868	30,930
CTC 1.odčítání	10	206,700	-57,275	470,675	40,000
CTC 2.odčítání	10	150,000	-33,384	333,384	30,000
NLR	11	150,000	-33,384	333,384	30,000
Před brachyterapií					
CTC 1.odčítání	8	69,000	-12,611	150,621	22,000
CTC 2.odčítání	8	278,750	-95,509	653,009	27,500
3 měsíce po skončení léčby					
SCC	10	10,997	-11,376	33,370	1,025
CTC 1.odčítání	11	37,273	8,324	66,222	30,000
CTC 2.odčítání	11	72,273	1,487	143,058	30,000
6 měsíců po skončení léčby					
SCC	7	2,976	-0,646	6,597	1,370
CTC 1.odčítání	8	97,000	11,828	182,172	50,000
CTC 2.odčítání	8	45,000	6,107	83,893	25,000
9 měsíců od skončení léčby					
SCC	6	9,907	-8,400	28,213	1,685
CTC 1.odčítání	6	63,500	-12,839	139,839	40,000
CTC 2.odčítání	6	29,167	-14,409	72,743	7,500
Přežití (měsíce)	11	25,000	19,307	30,693	25,000

Tabulka 6: Vztah SCC a CTC u stadia N1 (s postižením lymfatických uzlin)

U dlaždicobuněčných karcinomů je největší pokles CTC ve 3.měsíci po skončení léčby, u SCC trvá až do 6.měsíce, poté jsme pozorovali mírný vzestup.

	N	Průměr	CI -95%	CI 95%	Medián
Před léčbou					
SCC	25	18,918	10,982	26,854	12,760
CTC 1.odčítání	22	219,318	59,148	379,488	40,000
CTC 2.odčítání	22	212,182	51,690	372,673	30,000
NLR	22	2,963	2,456	3,470	2,941
Před brachyterapií					
CTC 1.odčítání	20	63,500	7,433	119,568	20,000
CTC 2.odčítání	19	122,263	-27,244	271,771	20,000
3 měsíce po skončení léčby					
SCC	24	5,370	-3,153	13,893	1,030
CTC 1.odčítání	21	19,714	7,570	31,859	5,000
CTC 2.odčítání	20	44,250	11,956	76,535	15,000
6 měsíců po skončení léčby					
SCC	19	1,973	0,783	3,163	1,290
CTC 1.odčítání	18	51,444	12,355	90,534	17,500
CTC 2.odčítání	17	34,000	13,343	54,658	20,000
9 měsíců od skončení léčby					
SCC	17	4,925	-0,503	10,353	1,610
CTC 1.odčítání	15	100,533	-40,322	241,389	5,000
CTC 2.odčítání	16	184,375	8,308	360,443	32,500
Přežití (měsíce)	25	28,480	25,757	31,203	29,000

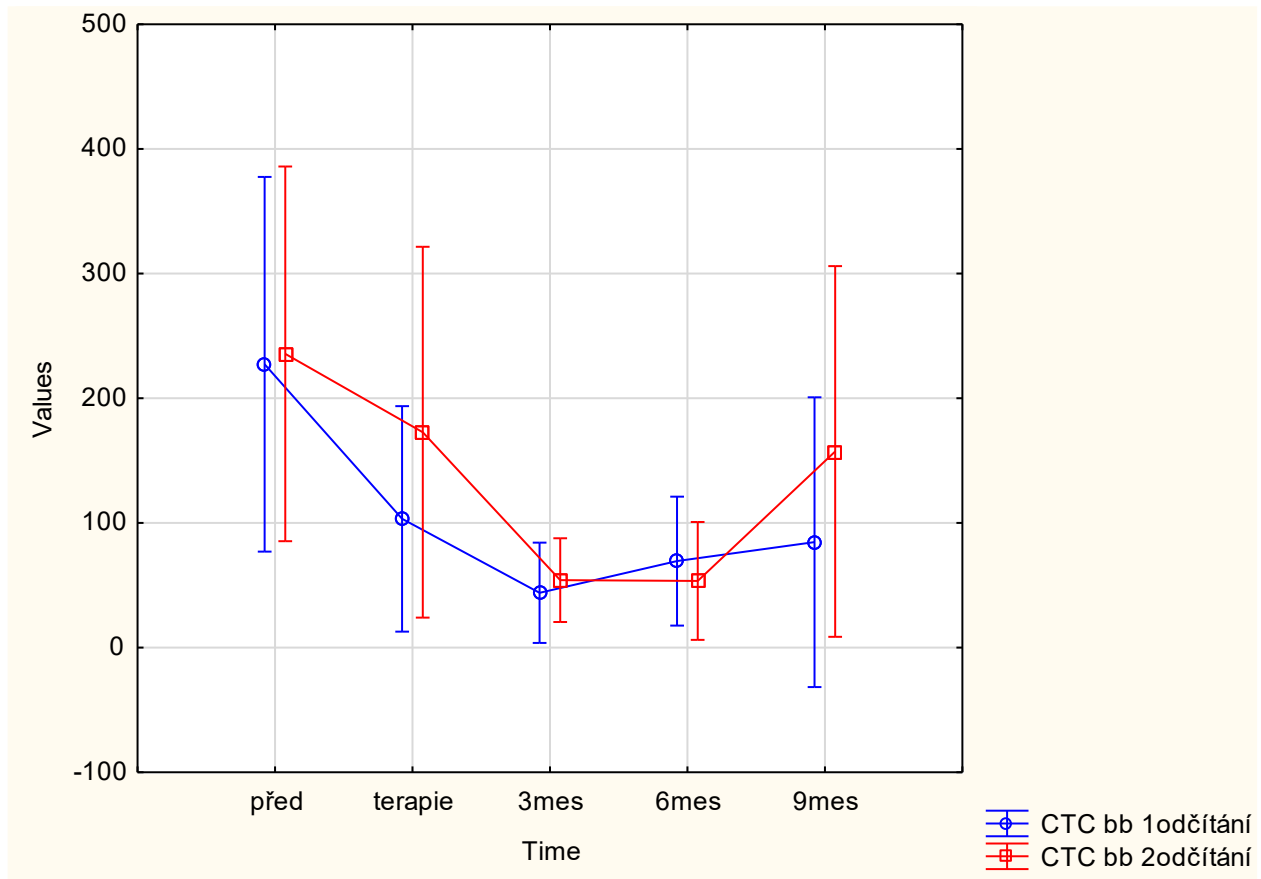
Tabulka 7: Vztah SCC a CTC u dlaždicobuněčných karcinomů

Nádorový marker SCC není zcela typický pro adenokarcinomy a v našem souboru měly adenokarcinomy minoritní postavení.

	N	Průměr	CI -95%	CI 95%	Medián
Před léčbou					
SCC	2	4,290	-11,466	20,046	4,290
CTC 1.odčítání	4	271,250	-502,374	1044,874	40,000
CTC 2.odčítání	4	365,000	-364,016	1094,016	225,000
NLR	4	2,843	0,602	5,083	2,295
Před brachyterapií					
CTC 1.odčítání	4	320,750	-420,998	1062,498	140,000
CTC 2.odčítání	4	413,000	-292,798	1118,798	325,000
3 měsíce po skončení léčby					
SCC	2	1,425	0,726	2,124	1,425
CTC 1.odčítání	4	175,000	-183,761	522,761	100,000
CTC 2.odčítání	4	92,500	-130,034	315,034	35,000
6 měsíců po skončení léčby					
SCC	2	1,375	-2,882	5,632	1,375
CTC 1.odčítání	4	42,750	-71,961	157,461	10,500
CTC 2.odčítání	4	25,000	-29,737	79,737	12,500
9 měsíců od skončení léčby					
SCC	2	1,475	-3,671	6,621	1,475
CTC 1.odčítání	2	7,500	-24,266	39,266	7,500
CTC 2.odčítání	2	20,000	-107,062	39,266	7,500
Přežití (měsíce)	4	22,500	6,614	38,386	23,000

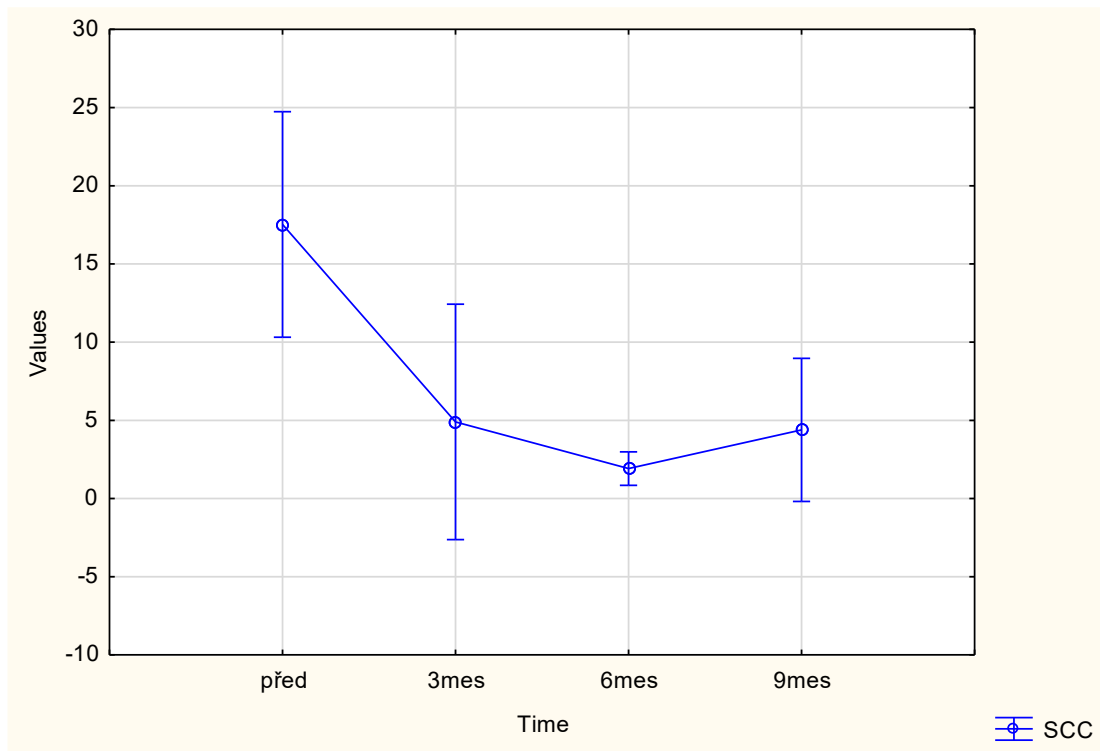
Tabulka 8: Vztah CTC a SCC u adenokarcinomů

Během sledování výrazné rozdíly mezi 1. a 2. odečtem v počtu buněk nejsou patrné. Mezi 3. a 6. měsícem nastává fáze plató.



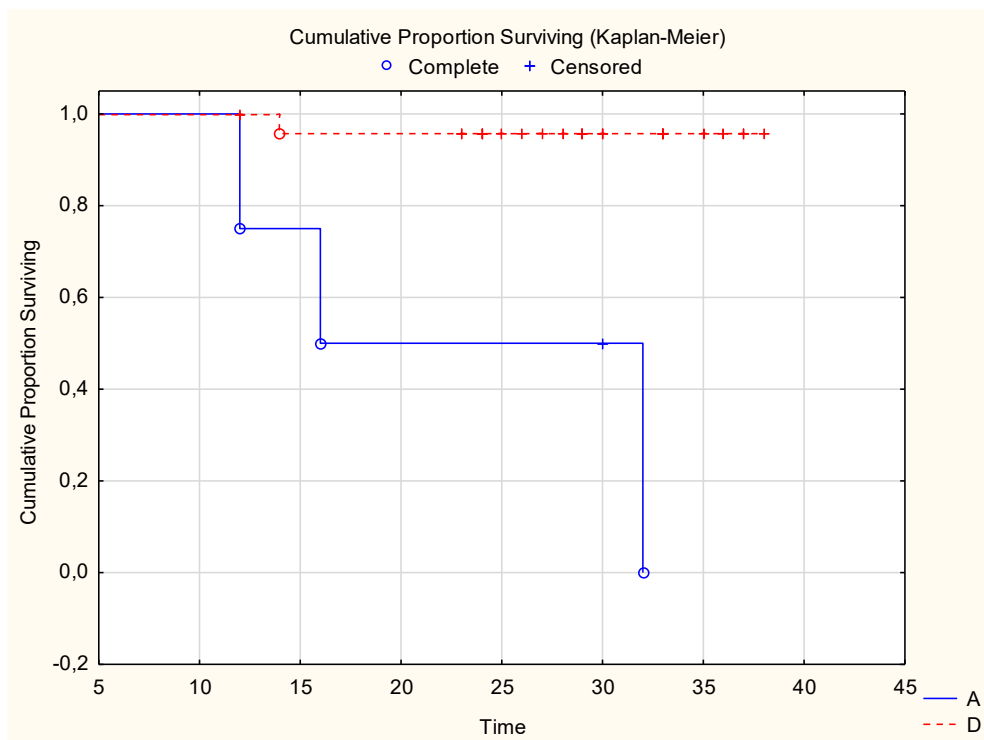
Graf 1: Průměry a konfidenční intervaly (95%)

U nádorového markeru SCC trvá klesající trend až do 6.měsíce, kdy dosahuje nejnižší hodnotu.



Graf 2: Průměry a konfidenční intervaly SCC (95%)

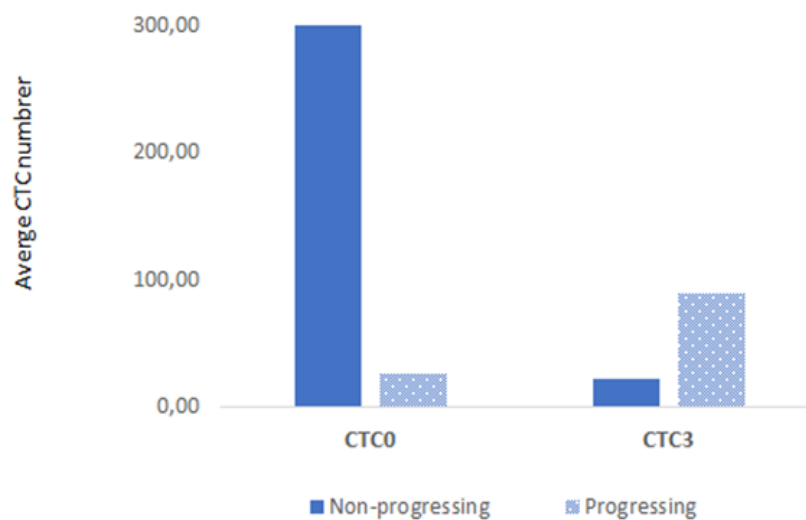
Křivky přežití nejsou zcela signifikantní pro menší počet pacientek v souboru.



Graf 3 Křivka přežití dlaždicobuněčných karcinomů a adenokarcinomů

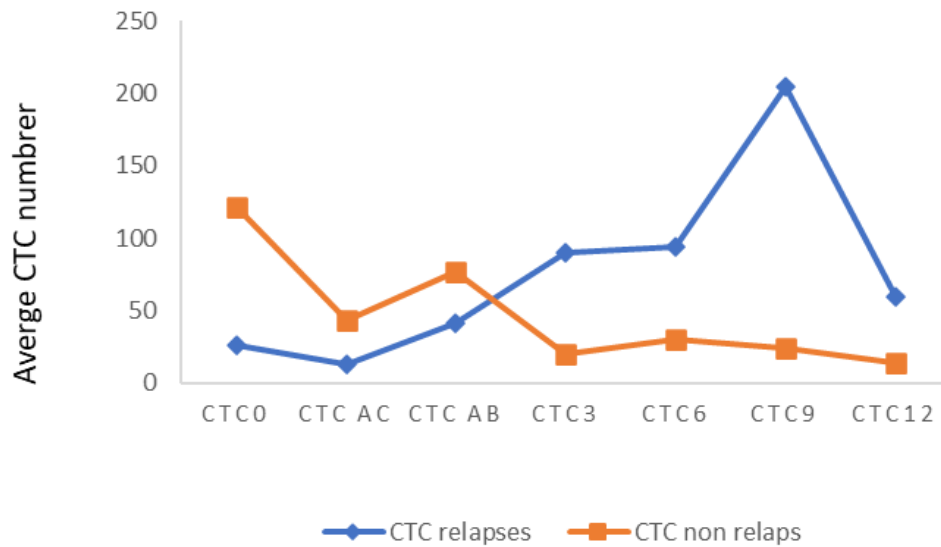
V našem souboru byla odpověď na léčbu u 90 % pacientek (27/30). Lehce vyšší odpověď byla u dlaždicobuněčných karcinomů než u adenokarcinomů (96 % vs. 80 %).

Při srovnání pacientek, které zprogredovaly a nezprogredovaly, jsme pozorovali rozdíl v počtu CTC 3 měsíce po skončení léčby.



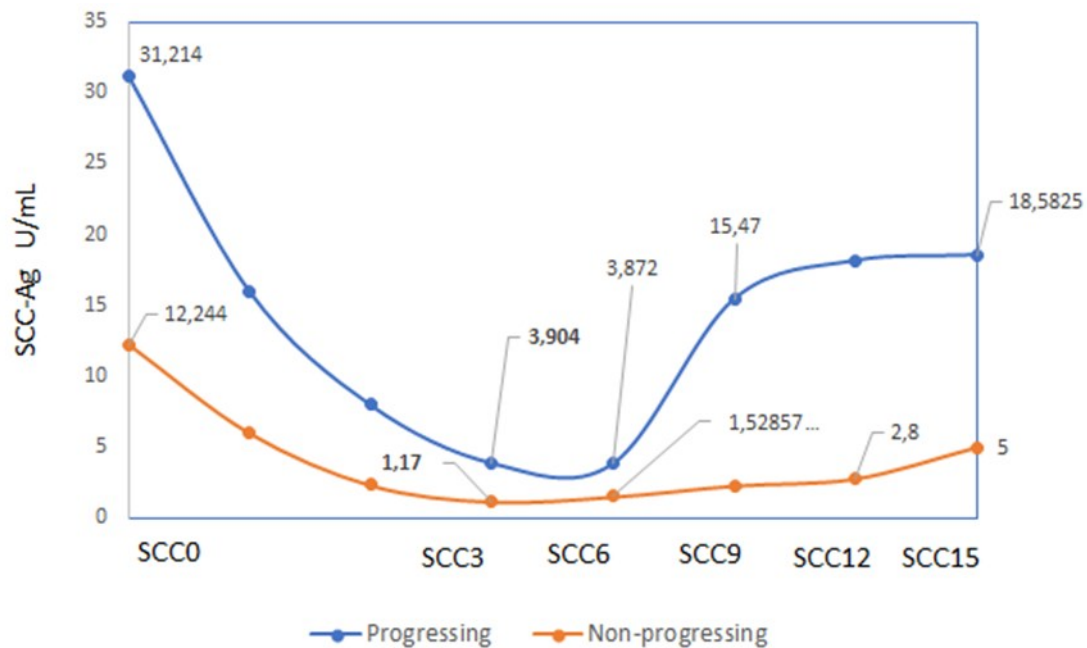
Obrázek 5: Průměrný počet CTC u pacientek před zahájením léčby a 3 měsíce po jejím skončení

Když se podíváme na dynamiku CTC před léčbou a během sledování u progredujících a neprogredujících pacientek, pozorovali jsme největší rozdíl 3 až 6 měsíců po skončení chemoradioterapie. Překvapivé bylo, že neprogredující pacientky měly před zahájením terapie vyšší hladinu CTC.



Obrázek 6: Průměrné CTC u progredujících a neprogredujících pacientek před léčbou, během léčby a sledování

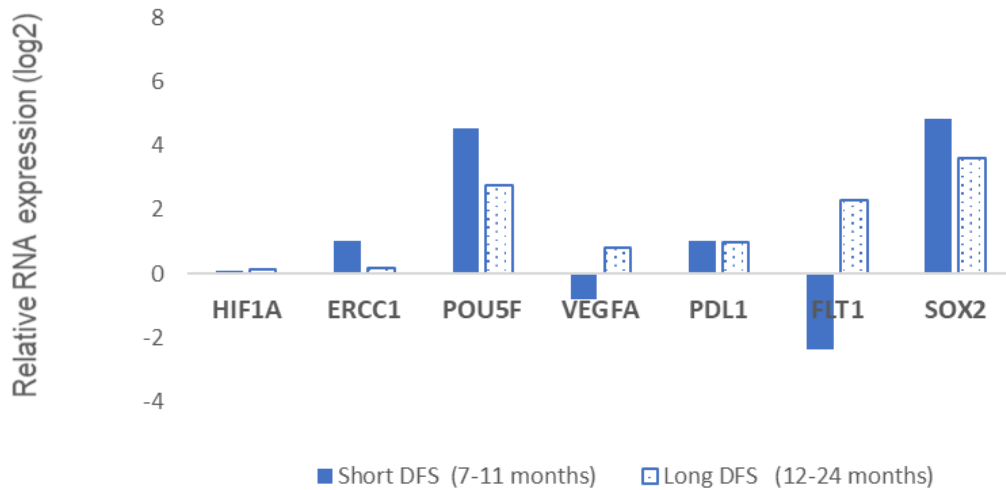
Když jsme se u těchto pacientek podívali také na hladiny SCC, pozorovali jsme zvýšení SCC 6 až 9 měsíců po skončení chemoradioterapie.



Obrázek 7: Průměrné SCC u progredujících a neprogredujících pacientek před zahájením léčby, během léčby a sledování

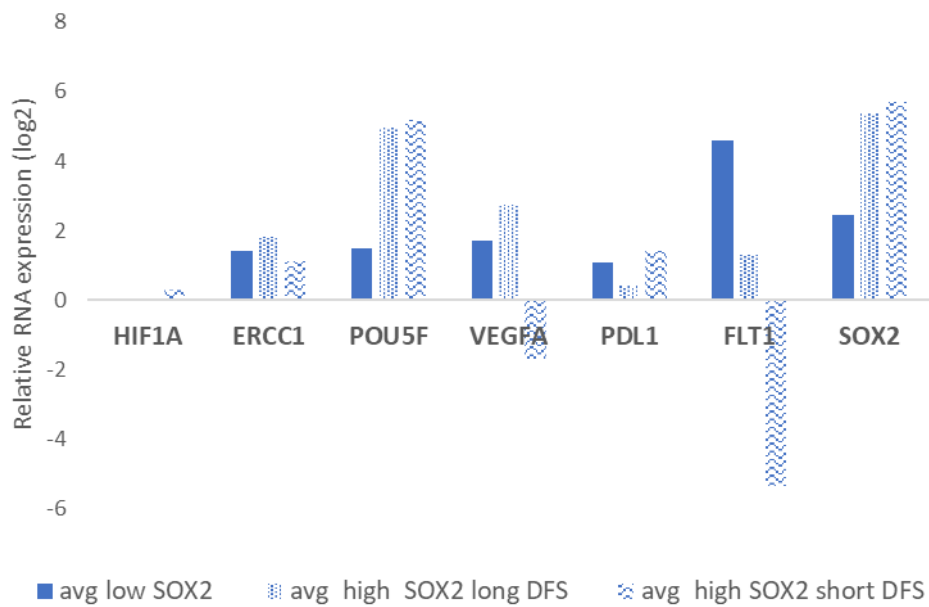
V našem souboru jsme pozorovali pokles CTC i SCC po léčbě, co korelovalo s klinickým obrazem a pozorováním regrese onemocnění. To souhlasí s doporučením evaluace výsledku léčby až s časovým odstupem po skončení chemoradioterapie i vzhledem k abskopálnímu efektu radioterapie.

Při profilování genové exprese značila horší výsledky léčby zvýšená exprese genů spojených s chemorezistencí. Před zahájením léčby jsme měli vyšší hladinu exprimovaných genů kmenových buněk SOX2, POU5F u relabujících pacientek. Když jsme pacientky rozdělili do dvou skupin na základě DFS – období bez nemoci (méně nebo více 12 měsíců), pacientky s krátkým DFS vykazovaly větší expresi SOX2 a POU5F ($p < 0,02$) a malou expresi VEGF a FLT1.



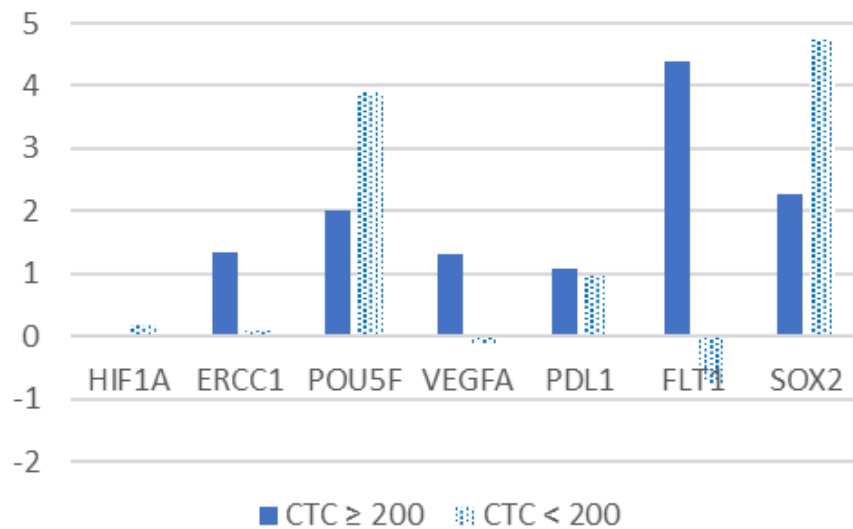
Obrázek 8: Profilování genové exprese u CTC na základě DFS

Při zaměření se na expresi SOX2 a rozdělení vzorků do dvou skupin – vysoké a nízké hladiny exprese SOX2 a dále i na základě DFS, ve skupině s vysokou expresí SOX2 a dlouhým DFS exprimují signifikantně více VEGF a FLT1 u CTC. Skupina s nízkou hladinou exprese SOX2 exponuje více VEGF a FLT1 expresi, co může být indikátorem citlivost anti-VEGF terapie.



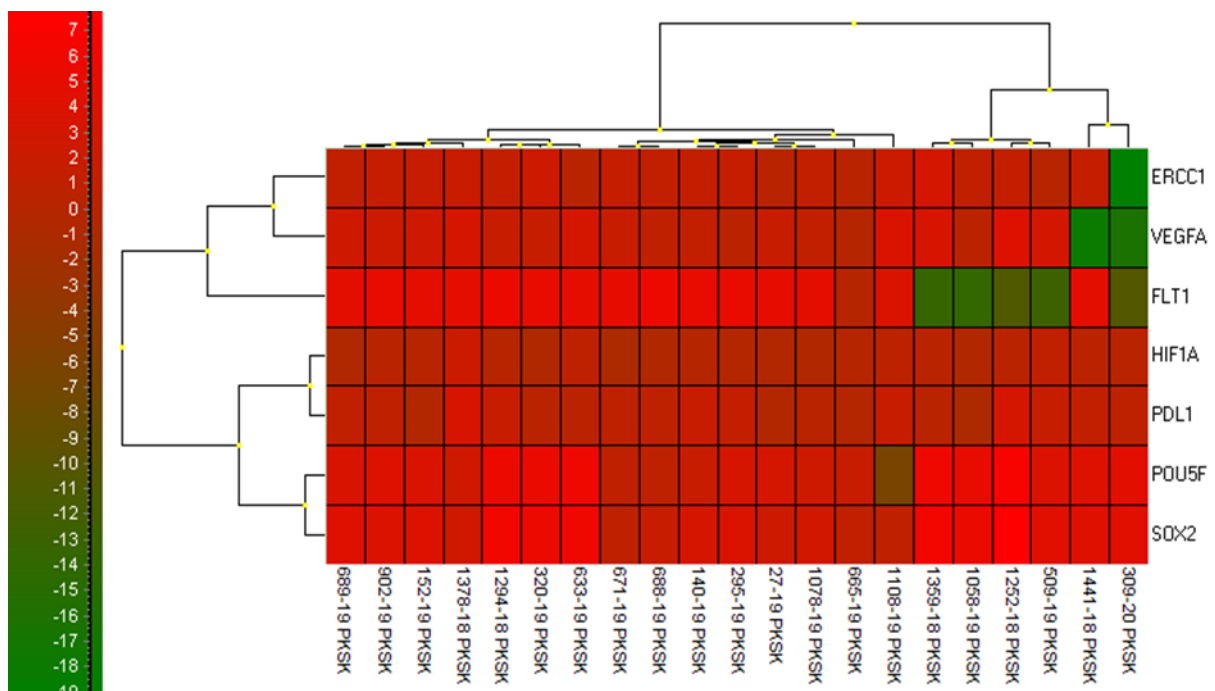
Obrázek 9: Profilování genové exprese na základě SOX2

Při rozdělení pacientek s počtem CTC nad 200 a pod 200 se ukázalo, že elevace SOX2 a POU5F je nezávislá od počtu CTC.



Obrázek 10: Elevace SOX2 a POU5F je nezávislá od počtu CTC

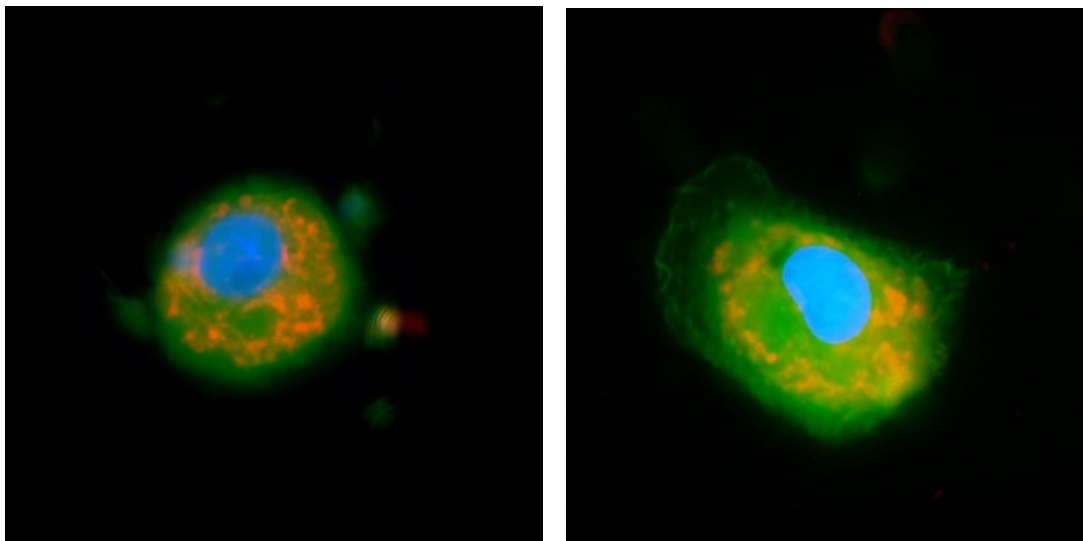
CTC s vysokou expresí SOX2 a POU5F exprimovaly signifikantně méně VEGF a FLT1. Na základě toho předpokládáme, že nádorové buňky jsou u těchto vzorků méně diferencované. Ve skupině s nízkou expresí SOX2 se ukázala vysoká exprese VEGF a FLT1, která by mohla pomoci k poukázání na efektivní léčbu – anti – VEGF terapii. Dalším pomocným ukazatelem by mohla být vyšší exprese PDL1, která by mohla poukázat na efekt imunoterapie.



Obrázek 11: qPCR

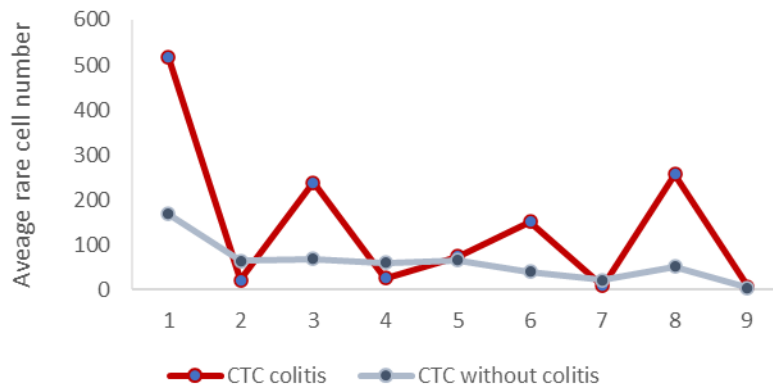
Morfologie CTC se měnila během léčby i po léčbě a během sledování. CTC po léčbě byly malé a měly chlupatou cytoplasmu s protruzemi. Pozorovali jsme také změny v buněčném metabolismu – mitochondriální aktivitě, na základě, čeho jsme mohli identifikovat méně a více aktivní buňky.

U pacientek léčených chemoradioterapií je jeden z častých nežádoucích účinků léčby postradiační kolitis. V souboru našich pacientek jsme při analýze CTC pozorovali velké množství cirkulujících epiteliálních buněk v periferní krvi právě u pacientek s kolitidou. To korelovalo i s klinickým obrazem.



Obrázek 12: Cirkulující epiteliální buňky u pacientek s postradiační kolitidou jsou menší a mají hladší jádro bez viditelných jadérek

Cirkulující vzácné buňky jsou definovány jako CTC a cirkulující epiteliální buňky. Při srovnání pacientek s postradiační kolitidou a bez ní je jejich množství výrazně větší u pacientek s kolitidou.



Obrázek 13: Cirkulující buňky u pacientek s postradiační kolitidou a bez ní

V naší práci jsme se snažili najít další vhodný marker k odhalení pacientek s vyšším rizikem relapsu onemocnění k dosud známým rizikovým faktorům. Předpokládali jsme, že pacientky s vysokým NLR a CTC budou více rizikové. Pacientky, které zrelabovaly, měly NLR v rozmezí 1,7-4,9. Pacientky zprogredovaly nejdéle za 14 měsíců. Z našeho souboru ale zrelabovaly pacientky, které měly NLR a CTC nízké ve srovnání s ostatními sledovanými pacientkami. To může souviset s horší odpovědí na chemoradoterapii, která se projeví dřívějším relapsem onemocnění. Je otázkou, jestli u těchto pacientek není nutná ještě další léčebná modalita (imunoterapie). Doplnění NLR a CTC při stanovování stagingu onemocnění by mohlo být také pomocným markerem.

Odpovědi na hypotézy:

Koreluje počet a dynamika CTC před léčbou a po léčbě s prognózou onemocnění?

Ze souboru našich pacientek se ukazuje, že významnější, než vstupní hodnota CTC je jejich počet po skončení léčby a během 3.-6. měsíce. U pacientek, u kterých došlo k relapsu onemocnění, došlo i k vzestupu CTC v této době. V našem souboru jsme dále pozorovali, že zvýšená hladina CTC byla pozorována přibližně 12 týdnů před relapsem onemocnění zobrazeného na zobrazovacích vyšetřeních. Analýza potvrdila zvýšení SOX2 a POU5F expresi u CTC u skupiny s relapsem. Agresivita nemoci může být spojena se zvýšenou expresí markerů kmenových CTC – CTC nádorová nálož a agresivita.

Existuje vztah hladiny CTC a stadia onemocnění při zahájení léčby?

Pacientky s vyšším stadiem onemocnění – stadia III – měly vyšší počet CTC při zahájení léčby.

Existuje vztah mezi CTC a nádorovým markerem SCC?

Existuje. Z našeho souboru se ukazuje, že elevace CTC předchází elevaci SCC.

Jsou CTC prognostickým markerem?

Ano, ale je nutné korelovat jejich dynamiku s léčbou a sledováním.

Jsou CTC prediktivním markerem?

CTC jsou vhodným prediktivním markerem. U antiangiogenní léčby i svým počtem, protože se šíří hematogenně. Jejich potenciál a prediktivní význam je hlavně v sekvenování, kdy pomocí cíleného dovyšetření můžeme zjistit jednak charakteristické znaky, ale také odpověď na léčbu.

14 Diskuse k tématu

Poslední léta je patrný mírný klesající trend v incidenci u gynekologických malignit. Karcinom hrdla děložního je 3. nejčastější gynekologická malignita u žen. Z hlediska mortality se řadí stále k malignitám s horší prognózou. (63)

Stadium onemocnění je u všech malignit silný prognostický faktor. S pokročilostí onemocnění, a tedy vyšším stadiem onemocnění se zhoršuje prognóza a klesá přežití pacientek. K dalším negativním prognostickým znakům patří hloubka invaze, velikost primárního nádoru, nádorový grade, šíření do lymfatických cév, přítomnost lymfadenopatie a v neposlední řadě i histologie. (64) Adenokarcinomy mají všeobecně horší prognózu, jsou více chemo a radiorezistentní. (65)

CTC nesou vlastnosti a znaky, které jsou charakteristické pro nádorovou tkáň, ze které se uvolňují (primární nádor i jeho metastázy). Tyto vlastnosti jsou unikátní a jejich poznání může být cenným zdrojem při diagnostice nádorového onemocnění, odpovědi na léčbu, také během sledování i při progresi onemocnění. Vyšší počet CTC při zahájení léčby nebo jejím průběhu se jeví jako ukazatel horší prognózy onemocnění. Přetrvávající vyšší počet CTC i po ukončení léčby může poukazovat na agresivnější onemocnění a být ukazatelem nedostatečnosti léčby. Naopak nižší hladina CTC v průběhu léčby je ukazatelem odpovědi na probíhající léčbu a příznivější prognózu onemocnění. Morfologie a vlastnosti CTC jsou také cenným zdrojem informací o primárním nádoru nebo metastáze. Analýzou CTC a dalším profilováním můžeme získat cenné informace nejenom o CTC samotných, ale i o jejich odpovědi na léčbu profilováním nádorových genů a genů spojených s rezistencí k zefektivnění aplikace léčby. Počet CTC není ukazatelem velikosti nádoru, ale ukazatelem zvýšení morbidity s ovlivněním mortality. (56) (53) (66)

Z prací se ukazuje korelace mezi stadiem onemocnění a výskytem CTC. U pacientek bez vzdálených metastáz (stadium M0), které mají pozitivní CTC při diagnóze onemocnění, dochází k časnějšímu výskytu hematogenních metastáz než u pacientů bez detekovaných CTC. (67)

Vyšší hladina CTC je asociovaná s horší prognózou u karcinomu prsu (68), prostaty a kolorektálního karcinomu. (69) U nádoru plic můžou CTC předcházet manifestaci relapsu onemocnění na CT vyšetření o několik let. U nemetastatického onemocnění je většinou hladina CTC při diagnóze nízká. (70)

V metaanalýze u diagnózy karcinomu prsu se z 21 studií ukazuje, že vyšší CTC u neoadjuvantní léčby je asociována s horším D-DFS a OS. Bylo také pozorováno, že pacientky, které dosáhly patologickou kompletní remisi po neoadjuvantní léčbě, měly o něco častěji nízkou hladinu CTC při zahájení léčby. CTC jsou prediktivním markerem u karcinomu prsu léčeného radioterapií. Detekce CTC po mastektomii upozorňuje na okultní nemoc a poukazuje na nutnost použití adjuvantní radioterapie k lepší lokální kontrole onemocnění. Radioterapie spádových lymfatických uzlin také stimuluje systémovou imunitní odpověď ke zlepšení kontroly onemocnění. (71)

CTC jako pomocný prognostický faktor byly prokázány také u karcinomu jícnu. Pozorovala se jejich přítomnost nebo nepřítomnost před primární operací. Pozitivita CTC byla spojena s kratším PFS a OS. Ukazuje se, že u lokalizovaného onemocnění je přítomnost CTC silnější prognostický faktor než postižení lymfatických uzlin. (72)

Také u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic stadia T1a-T2a léčených stereotaktickou radioterapií se ukazuje, že vyšší hladina CTC před léčbou a její perzistence je spojena s vyšším rizikem relapsu onemocnění. (73)

Přítomnost CTC u karcinomu pankreatu před primární operační léčbou svědčí pro přítomnost okultních metastáz. (74) (75)

Význam CTC jako prediktivního faktoru relapsu onemocnění poukazuje práce japonských vědců. Tuto souvislost pozorovali u pacientek s karcinomem cervixu stadia IIB – IVA léčených definitivní radioterapií. (76)

U pacientek s diagnózou karcinomu hrdla děložního léčených chemoradioterapií svědčí přítomnost CTC před zahájením léčby kratší PFS na rozdíl od pacientek, u kterých CTC nebyly přítomny. Přítomnost CTC je nezávislým prognostickým faktorem. Počet CTC je asociován se stadiem onemocnění, probíhající léčbou a metodou izolace CTC. (77)

V další malé prospektivní studii lokalizovaného karcinomu hrdla děložního léčeného chemoradioterapií, přítomnost CTC korelovala s horším přežitím pacientek – více než 50 % pacientek s pozitivními CTC mělo relaps onemocnění. (78)

Přítomnost CTC by mohla svědčit pro agresivitu onemocnění, a proto by mohli být použity jako jednoduchý nástroj k prevenci nadměrné diagnostiky, a i onkologické terapie.

Dále se nabízí otázka, jestli je SCC vhodným nástrojem k dřívějšímu zjištění relapsu onemocnění. V našem souboru jsme pozorovali elevaci CTC ještě před elevací SCC u pacientek s relapsem onemocnění a jeho klinickou manifestací.

Zajímavé jsou výsledky studie GOG Study 240, která jako jedna z prvních prováděla rozbor CTC buněk ve velké skupině 452 pacientek s diseminovaným onemocněním. Pacientkám byla aplikována chemoterapie cisplatina, paclitaxel s bevacizumabem/placebo. Na základě výsledků studie byl bevacizumab registrován do klinické praxe u karcinomu hrdla děložního. Pacientky, u kterých byl vysoký počet CTC před zahájením léčby, měly v rameni s bevacizumabem lepší léčebnou odpověď a delší PFS na rozdíl od pacientek, u kterých byly CTC nízké. Je to dáno i tím, že CTC se šíří hematogenně a v nádoru je zvýšená neovaskularizace a zranitelnost VEGF inhibice. (79)

V další retrospektivní studii vyhodnocující CTC u pacientek s karcinomem hrdla děložního (všech stadií onemocnění), po radioterapii nebo chemoradioterapii u pacientek, se ukázaly CTC být nezávislým prognostickým faktorem. Pacientky s CTC měly signifikantně kratší PFS než pacientky, u kterých byly CTC negativní. (80)

Nádorový marker SCC je vysoce specifický pro dlaždicobuněčné karcinomy. Vyšší hladina při diagnóze může značit agresivnější typ nádoru a větší nádorovou nálož v čase diagnózy. Dynamika hladiny SCC během léčby a po léčbě koreluje s efektem léčby a jeho opětovná elevace může značit relaps onemocnění. Některé práce udávají, že jeho vyšší hladina může předcházet relapsu onemocnění až o 5 měsíců. Senzitivita SCC je nízká (udává se kolem 53 %), ale jeho specificita je vysoká (udává se kolem 94 %). (50) Je to jeden z důvodů, proč se nepoužívá jako screeningová metoda.

SCC je nezávislým prognostickým markrem během chemoradioterapie. Perzistující vyšší hladiny predikují horší prognózu onemocnění. Tento vztah byl pozorován v práci zahrnující 140 pacientek diagnostikovaných s dlaždicobuněčným karcinomem hrdla děložního. Z této skupiny mělo před léčbou 58,6 % pacientek pánevní lymfadenopatii dle CT/PET-CT. Všechny pacientky podstoupily léčbu kombinovanou radioterapií s potenciací cisplatinou. Ve skupině pacientek s elevací SCC před léčbou, u nichž došlo k normalizaci hodnoty po 27.dnu léčby, byla pozorována lepší prognóza onemocnění. Poléčebné hodnocení SCC může odhalit dříve relaps onemocnění, v této skupině pacientek to bylo o více než rok před klinickými symptomy. (81)

Nedávno byl SCC definován jako mediátor rezistence na radioterapii. Rozlišujeme dvě formy SCC – SCC1 (SERPINB3) a SCC2 (SERPINB4). SCC1 chrání nádor před toxickým efektem lysosomálních cysteinových proteáz uvolňujících se při vystavení škodlivým podnětům. Dále se SCC1 přímo podílí na rezistenci k radioterapii. Zablokování SCC1 senzitivizuje buňky více než cisplatina. (82)

Práci o CTC a nádorových markerech u diagnózy karcinomu hrdla děložního není mnoho. Práce japonských vědců zkoumala souvislost mezi SCC a CTC u pacientek stadia IIB až IVA léčených chemoradioterapií. Kombinace CTC a SCC je lepším prediktivním markerem ve srovnání s jejich samostatnou hodnotou. Ve srovnání s naší prací byla použita jiná technika radioterapie (box) a v konkomitantní chemoterapii byla použita i kombinace s docetaxelem, která se u nás nepoužívá. CTC byly analyzovány in situ FISH hybridizací s detekcí chromozomu 8. Tento vztah potvrdila také další studie autorů, kdy elevace CTC a SCC svědčí pro horší prognózu lokálně pokročilého karcinomu hrdla děložního léčeného radioterapií. (83)

Předoperační hodnota NLR vyšší než 2,0 je nezávislý prediktivní faktor u pacientek s lokalizovaným karcinomem hrdla děložního podstupujících radikální hysterektomii. Spolu se stadiem, postižením lymfatických uzlin identifikuje rizikové pacientky. (84) (85) (86)

V retrospektivním sledování 1061 pacientek stadia IB až IVA se NLR ukázal také jako negativní prognostický faktor. Cut off hodnota byla 1,9. Pacientky s vyšším NLR byly mladší a většinou měly diagnostikováno i onemocnění v pokročilejším stadiu. V této studii byly vyloučeny pacientky s adenokarcinomem, které mají všeobecně horší prognózu onemocnění. Pacientky podstoupily hysterektomii s nebo bez lymfadenektomie s následným sledováním nebo pooperační léčbou, nebo ve druhé skupině radioterapii samostatnou nebo potenciovanou chemoterapií. Pacientky s vyšším NLR častěji podstoupily chemoradioterapii. (87)

V další práci zahrnující 184 pacientek se zaměřovali na stratifikaci dle NLR před léčbou a stadiem onemocnění. Pacientky s vyšším NLR měly lokálně pokročilejší onemocnění. Práce ukazuje, že vyšší NLR může pomoci v rozhodování, jestli pacientka podstoupí primární operaci nebo chemoradioterapii. (88)

Vztah mezi NLR a nádorovým markerem byla pozorována u karcinomu ovaria. Když se srovnávala hodnota NLR a hladina nádorového markeru Ca125 u pacientek s karcinomem ovaria, jejich vyšší hodnota svědčila pro agresivnější onemocnění s horší

prognózou. Zvýšená hodnota NLR u suspektních nálezů vaječníků může být nápomocná spolu s Ca125 k rozlišení benigního a maligního nálezu. (89)

15 Závěr

Karcinom hrdla děložního je často onemocnění mladších žen. Se zlepšujícími se možnostmi diagnostiky a léčby se prodlužuje celkové přežití pacientek. Pokroky dosahujeme i v podpůrné léčbě. I díky tomu si pacientky při relabujícím, metastatickém onemocnění zachovávají dobrou kvalitu života. Nejdůležitější však stále zůstává primární léčba onemocnění. Naší snahou je najít co nejcitlivější ukazatel, který by nám pomohl odhalit pacientky s agresivnějším onemocněním. Zdá se, že tekutá biopsie může být významným přínosem. Její stanovení v době diagnózy a v průběhu sledování onemocnění se stává cenným nástrojem. Předpokládáme, že tato dynamika nás povede k poznání nových prognostických a prediktivních markerů.

Při stanovení diagnózy mohou být CTC ukazatelem agresivity onemocnění. Na druhé straně monitorování CTC během léčby a sledování může pomoci odhalit dřívější relaps onemocnění a ovlivnit prognózu pacientky. Morfologie vitálních CTC a její změny mohou být velmi nápomocné. Významnou roli hrají nádorové kmenové buňky. Tyto nové poznatky si zaslouží další zkoumání, neboť mohou ovlivnit aplikovanou léčbu a být vhodným nástrojem v personalizované medicíně. Velkou výhodou je i jednoduchost získání CTC z periferní krve. Během léčby a sledování nemoci CTC mění morfologií a dochází ke změnám v buněčném metabolismu. Mohou se tedy stát ukazatelem nádorové nálože a agresivity nemoci.

CTC, jejich analýza a získané informace mohou pomoci k individualizaci diagnostického postupu, zvýšení efektivity terapie a zkvalitnění léčebné strategie. Tím jsme krůček blíže k personalizované medicíně.

Výsledky našeho výzkumného šetření by mohly sloužit jako návrh na zlepšení komplexní péče o pacientky s inoperabilním karcinomem hrdla děložního a v neposlední řadě i jako prevence relapsu, a diseminace onemocnění.

16 Seznam použitých zkratek

CTC	cirkulující nádorové buňky
CT	počítačová tomografie
MRI	magnetická rezonance
VAG UZ	vaginální ultrazvuk
FNKV	Fakultní nemocnice Královské Vinohrady
OS	celkové přežití
D-DFS	čas do vzdálené diseminace onemocnění
PFS	čas do progresu onemocnění
HPV	lidský papilomavirus
NLR	poměr neutrofilů k leukocytům
CEA	karcinoembryonální antigen
SCC	tumor marker dlaždicobuněčného karcinomu
PET	pozitronová emisní tomografie

17 Literatura

1. Systém pro vizualizaci onkologických dat. [Online] <https://www.svod.cz>.
2. *Liquid biopsy and minimal residual disease - latest advances and implications for cure*. Pantel, Klaus and Alix-Panabières, Catherine. England : Nature Publishing Group, 2019, Nature reviews. Clinical oncology, Vol. 16, pp. 409-424. ISSN: 1759-4774.
3. www.uzis.cz. [Online] <http://www.uzis.cz>.
4. Abraham, Jame. Cervical Cancer. *The Bethesda Handbook of Clinical Oncology, Fourth Edition*. Philadelphia, USA : Wolters Kluwer Health, 2014, stránky 252-263.
5. *Cervical cancer*. Waggoner, Steven E. London : Elsevier Ltd, 2003, The Lancet (British edition), Vol. 361, pp. 2217-2225. ISSN: 0140-6736.
6. *Recent advances in invasive adenocarcinoma of the cervix*. Stolnicu, Simona, Hoang, Lien and Soslow, Robert A. Berlin/Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 2019, Virchows Archiv : an international journal of pathology, Vol. 475, pp. 537-549. ISSN: 0945-6317.
7. *2022-RA-1536-ESGO Cervical adenocarcinoma: application of the Silva criteria and correlation with prognostic factors, recurrence rate and survival*. García, Marta Heras, et al. Oxford : BMJ Publishing Group Ltd, 2022, International journal of gynecological cancer, Vol. 32, pp. A63-A63. ISSN: 1048-891X.
8. *Corrections to "Cervical cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up"*. Marth, C., et al. England : Elsevier Ltd, 2018, Annals of oncology, Vol. 29, pp. iv262-iv262. ISSN: 0923-7534.
9. ESMO. <https://www.esmo.org/guidelines/gynaecological-cancers>. [Online] ESMO - European Society of Medical Oncology.
10. *The European Society of Gynaecological Oncology/European Society for Radiotherapy and Oncology/European Society of Pathology Guidelines for the Management of Patients with Cervical Cancer*. Cibula, David, et al. Berlin/Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 2018, Virchows Archiv : an international journal of pathology, Vol. 472, pp. 919-936. ISSN: 0945-6317.

11. *The effect of treatment time in locally advanced cervical cancer in the era of concurrent chemoradiotherapy*. Song, Suisui, et al. Hoboken : Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 2013, Cancer, Vol. 119, pp. 325-331. ISSN: 0008-543X.
12. *Prognostic Model for Survival in Patients With Early Stage Cervical Cancer*. Biewenga, Petra, et al. Hoboken : Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 2011, Cancer, Vol. 117, pp. 768-776. ISSN: 0008-543X.
13. *Carcinogenesis* . Rijeka : IntechOpen, 2013. ISBN: 953-51-7075-9.
14. *A General Theory of Carcinogenesis*. Comings, D. E. United States : National Academy of Sciences of the United States of America, 1973, Proceedings of the National Academy of Sciences - PNAS, Vol. 70, pp. 3324-3328. ISSN: 0027-8424.
15. *The multistep nature of cancer development*. FARBER, E. Philadelphia : American Association for Cancer Research, 1984, Cancer research (Chicago, Ill.), Vol. 44, pp. 4217-4223. ISSN: 0008-5472.
16. *Hormesis and dose–response-mediated mechanisms in carcinogenesis: evidence for a threshold in carcinogenicity of non-genotoxic carcinogens*. Fukushima, Shoji, et al. Oxford : Oxford University Press, 2005, Carcinogenesis (New York), Vol. 26, pp. 1835-1845. ISSN: 0143-3334.
17. *Human papillomavirus : proving and using a viral cause for cancer* . London : Academic Press, 2020. ISBN: 0-12-814457-2.
18. *Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention*. SCHEURER, M. E., TORTOLERO-LUNA, G. a ADLER-STORTHZ, K. 2005, Sv. 15, stránky 727-746. ISSN: 1048-891X.
19. *Cyclin D and oncogenesis*. Motokura, Toru and Arnold, Andrew. England : Elsevier Ltd, 1993, Current opinion in genetics & development, Vol. 3, pp. 5-10. ISSN: 0959-437X.
20. *A systematic review of the prevalence of mucosal and cutaneous human papillomavirus types*. Bzhalava, Davit, et al. United States : Elsevier Inc, 2013, Virology (New York, N.Y.), Vol. 445, pp. 224-231. ISSN: 0042-6822.
21. *Postmodern cancer: the role of human immunodeficiency virus in uterine cervical cancer*. Clarke, B. and Chetty, R. London : BMJ Publishing Group Ltd and Association of Clinical Pathologists, 2002, Molecular pathology, Vol. 55, pp. 19-24. ISSN: 1366-8714.

22. *Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer: Epidemiology, Screening, and Vaccination—Review of Current Perspectives*. Chan, Chee Kai, et al. New York : Hindawi, 2019, Journal of oncology, Vol. 2019, pp. 1-11. ISSN: 1687-8450.
23. *Determinants of Persistent Detection of Human Papillomavirus DNA in the Uterine Cervix*. Brisson, J., a další. 1996, Sv. 173, stránky 794-799. ISSN: 0022-1899.
24. *Cigarette smoking and exposure to passive smoke are risk factors for cervical cancer*. Slattery, Martha L., a další. místo neznámé : American Medical Association, 1989, Jama, Sv. 261, stránky 1593–1598.
25. *Smoking and Cervical Cancer*. Fonseca-Moutinho, José Alberto. United States : International Scholarly Research Network, 2011, ISRN obstetrics and gynecology, Vol. 2011, pp. 847684-6. ISSN: 2090-4436.
26. *Smoking is an independent risk factor for oncogenic human papillomavirus (HPV) infections but not for high-grade CIN*. Syrjänen, Kari, a další. 2007, Sv. 22, stránky 723-735. ISSN: 0393-2990.
27. *Smoking, The Missing Drug Interaction in Clinical Trials: Ignoring the Obvious*. Gritz, Ellen R., Dresler, Carolyn a Sarna, Linda. 2005, Sv. 14, stránky 2287-2293. ISSN: 1055-9965.
28. *Effects of Mainstream and Environmental Tobacco Smoke on the Immune System in Animals and Humans: A Review*. Johnson, Jerry D., a další. 1990, Sv. 20, stránky 369-395. ISSN: 1040-8444.
29. *Damage to DNA in cervical epithelium related to smoking tobacco*. Simons, A. M., Phillips, D. H. a Coleman, D. V. 1993, Sv. 306, stránky 1444-1448. ISSN: 0959-8138.
30. *Host defence and persistent human papillomavirus infection*. Stanley, Margaret. Netherlands : Elsevier B.V, 2021, Current opinion in virology, Vol. 51, pp. 106-110. ISSN: 1879-6257.
31. *Chlamydia trachomatis infection: implications for HPV status and cervical cancer*. Silva, Jani, Cerqueira, Fátima and Medeiros, Rui. Berlin/Heidelberg : Springer Berlin Heidelberg, 2013, Archives of gynecology and obstetrics, Vol. 289, pp. 715-723. ISSN: 0932-0067.

32. *Human papillomavirus, number of pregnancies, oral contraceptives and cervical cancer.* Munoz, N. s.l. : Elsevier SAS, 2002, *Biomedicine & pharmacotherapy*, Vol. 56, pp. 266-267. ISSN: 0753-3322.
33. *Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review.* Smith, Jennifer S., et al. London : Elsevier Ltd, 2003, *The Lancet (British edition)*, Vol. 361, pp. 1159-1167. ISSN: 0140-6736.
34. *Intrauterine Device Use and Cervical Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-analysis.* Cortessis, Victoria K., et al. United States : by The American College of Obstetricians and Gynecologists. Published by Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved, 2017, *Obstetrics and gynecology (New York. 1953)*, Vol. 130, pp. 1226-1236. ISSN: 0029-7844.
35. *Influence of Serum VEGF Levels on Therapeutic Outcome and Diagnosis/Prognostic Value in Patients with Cervical Cancer.* Du, Ke, Gong, Hong-Ying and Gong, Zhi-Min. 2014, *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, Vol. 15, pp. 8793-8796. ISSN: 1513-7368.
36. *Serum Vascular Endothelial Growth Factor and Serum Leptin in Patients with Cervical Cancer.* Lebrecht, Antje, et al. San : Elsevier Inc, 2002, *Gynecologic oncology*, Vol. 85, pp. 32-35. ISSN: 0090-8258.
37. *Prognostic role of vascular endothelial growth factor in cervical cancer: a meta-analysis.* Zhang, Jing, et al. United States : Impact Journals LLC, 2017, *Oncotarget*, Vol. 8, pp. 24797-24803. ISSN: 1949-2553.
38. *Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling.* Engeland, Kurt. místo neznámé : Springer Science and Business Media LLC, March 2022, *Cell Death & Differentiation*, Sv. 29, stránky 946–960. ISSN: 1476-5403.
39. *Cyclooxygenase 2: protein-protein interactions and posttranslational modifications.* Alexanian, Anna a Sorokin, Andrey. místo neznámé : American Physiological Society, November 2017, *Physiological Genomics*, Sv. 49, stránky 667–681. ISSN: 1531-2267.
40. *Initial Experience with Determination of hTERT and MYCC Amplification in Cervical Intraepithelial Neoplasia and Cervical Carcinoma in the Czech Republic.* Moukova, Lucie, a

další. místo neznámé : Touch Medical Media, Ltd., 2012, European Oncology & Haematology, Sv. 08, str. 92. ISSN: 2045-5275.

41. *Chemokines in cancer related inflammation*. Allavena, Paola, et al. United States : Elsevier Inc, 2011, Experimental cell research, Vol. 317, pp. 664-673. ISSN: 0014-4827.

42. *Inflammation and cancer: back to Virchow?* Balkwill, Fran and Mantovani, Alberto. London : Elsevier Ltd, 2001, The Lancet (British edition), Vol. 357, pp. 539-545. ISSN: 0140-6736.

43. *Circulating Tumor Cells (CTC) Are Associated with Defects in Adaptive Immunity in Patients with Inflammatory Breast Cancer*. Mego, M., a další. místo neznámé : Ivyspring International Publisher, 2016, Journal of Cancer, Sv. 7, stránky 1095–1104. ISSN: 1837-9664.

44. *Anemia, leukocytosis and thrombocytosis as prognostic factors in patients with cervical cancer treated with radical chemoradiotherapy: A retrospective cohort study*. Koulis, Theodora A., a další. místo neznámé : Elsevier BV, June 2017, Clinical and Translational Radiation Oncology, Sv. 4, stránky 51–56. ISSN: 2405-6308.

45. Screening karcinomu hrdla děložního. [Online]
<https://www.zpmvcr.cz/pojistenci/prevence/screeningove-programy/screening-karcinomu-delozniho-hrdla>.

46. *Is phased implementation of HPV testing and triage with dual staining the way to transform organized cytology screening?* Sláma, Jirí, a další. místo neznámé : Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health), September 2023, European Journal of Cancer Prevention, Sv. 33, stránky 168–176. ISSN: 0959-8278.

47. al., T.Fait et. *Preventivní medicína*. 2021Prague.

48. *Can serial evaluation of serum SCC-Ag-level predict tumor recurrence and patient survival in squamous-cell carcinoma of uterine cervix treated with definitive chemoradiotherapy? A multi-institutional analysis*. Choi, Kyu Hye, et al. Singapore : Springer Singapore, 2020, International journal of clinical oncology, Vol. 25, pp. 1405-1411. ISSN: 1341-9625.

49. *Cancer of the uterine cervix: Sensitivity and specificity of serum squamous cell carcinoma antigen determinations*. Duk, Jitze M., et al. San : Elsevier Inc, 1990, Gynecologic oncology, Vol. 39, pp. 186-194. ISSN: 0090-8258.
50. *The role of squamous cell carcinoma antigen as a prognostic and predictive factor in carcinoma of uterine cervix*. Jeong, Bae Kwon, a další. místo neznámé : Korean Society for Therapeutic Radiology and Oncology, 2011, Radiation oncology journal, Sv. 29, str. 191.
51. *Circulating Tumor Cells: Overview and Opportunities in Cytology*. Sundling, Kaitlin E. and Lowe, Alarice C. United States : Copyright Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved, 2019, Advances in anatomic pathology, Vol. 26, pp. 56-63. ISSN: 1072-4109.
52. *Biology, vulnerabilities and clinical applications of circulating tumour cells*. Ring, Alexander, a další. místo neznámé : Springer Science and Business Media LLC, December 2022, Nature Reviews Cancer, Sv. 23, stránky 95–111. ISSN: 1474-1768.
53. *Circulating tumor cells: detection, molecular profiling and future prospects*. Jacob, Karine, Sollier, Caroline and Jabado, Nada. England : Taylor & Francis, 2007, Expert review of proteomics, Vol. 4, pp. 741-756. ISSN: 1478-9450.
54. *The biological and clinical importance of epithelial–mesenchymal transition in circulating tumor cells*. Liu, Huiying, a další. místo neznámé : Springer Science and Business Media LLC, June 2014, Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, Sv. 141, stránky 189–201. ISSN: 1432-1335.
55. *Circulating tumor cells: advances in detection methods, biological issues, and clinical relevance*. Sun, Yun-Fan, a další. místo neznámé : Springer Science and Business Media LLC, June 2011, Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, Sv. 137, stránky 1151–1173. ISSN: 1432-1335.
56. *Biology, detection, and clinical implications of circulating tumor cells*. Joosse, Simon A., Gorges, Tobias M. a Pantel, Klaus. 2015, EMBO molecular medicine, Sv. 7, stránky 1–11.
57. *Serial enumeration of circulating tumor cells predicts treatment response and prognosis in metastatic breast cancer: a prospective study in 393 patients*. Wallwiener, Markus, a další. místo neznámé : Springer Science and Business Media LLC, July 2014, BMC Cancer, Sv. 14. ISSN: 1471-2407.

58. *Circulating tumour cells for early detection of clinically relevant cancer*. Lawrence, Rachel, a další. místo neznámé : Springer Science and Business Media LLC, June 2023, *Nature Reviews Clinical Oncology*, Sv. 20, stránky 487–500. ISSN: 1759-4782.
59. *Predictive value of circulating tumor cells (CTCs) in newly-diagnosed and recurrent ovarian cancer patients*. Liu, Joyce F., a další. místo neznámé : Elsevier BV, November 2013, *Gynecologic Oncology*, Sv. 131, stránky 352–356. ISSN: 0090-8258.
60. *The Complementary Role of Imaging and Tumor Biomarkers in Gynecological Cancers: An Update of the Literature*. Anastasi, Emanuela, et al. Iran : West Asia Organization for Cancer Prevention, 2018, *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, Vol. 19, pp. 309-317. ISSN: 1513-7368.
61. *The European Society for Medical Oncology (ESMO) Precision Medicine Glossary*. Yates, L. R., et al. England : Elsevier Ltd, 2018, *Annals of oncology*, Vol. 29, pp. 30-35. ISSN: 0923-7534.
62. *MRI-guided adaptive brachytherapy in locally advanced cervical cancer (EMBRACE-I): a multicentre prospective cohort study*. Pötter, Richard, et al. England : Elsevier Ltd, 2021, *The lancet oncology*, Vol. 22, pp. 538-547. ISSN: 1470-2045.
63. *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries*. Sung, Hyuna, et al. United States : s.n., 2021, CA: a cancer journal for clinicians, Vol. 71, pp. 209-249. ISSN: 0007-9235.
64. *Cervical cancer*. Cohen, Paul A., et al. England : Elsevier Ltd, 2019, *The Lancet (British edition)*, Vol. 393, pp. 169-182. ISSN: 0140-6736.
65. *Adenocarcinoma: A unique cervical cancer*. Gien, Lilian T., Beauchemin, Marie-Claude and Thomas, Gillian. United States : Elsevier Inc, 2009, *Gynecologic oncology*, Vol. 116, pp. 140-146. ISSN: 0090-8258.
66. *Clinical utility of circulating tumor cells: an update*. Vasseur, Antoine, et al. United States : John Wiley & Sons, Inc, 2021, *Molecular oncology*, Vol. 15, pp. 1647-1666. ISSN: 1574-7891.
67. *Isolation, primary culture, morphological and molecular characterization of circulating tumor cells in gynecological cancers*. Kolostova, Katarina, a další. místo neznámé : e-Century Publishing Corporation, 2015, *American journal of translational research*, Sv. 7, str. 1203.

68. *Meta-analysis of the prognostic value of circulating tumor cells in breast cancer.* Zhang, Liling, a další. místo neznámé : AACR, 2012, Clinical cancer research, Sv. 18, stránky 5701–5710.
69. *Significance of circulating tumor cells detected by the CellSearch system in patients with metastatic breast colorectal and prostate cancer.* Miller, M. Craig, Doyle, Gerald V. a Terstappen, Leon W. M. M. místo neznámé : Hindawi, 2010, Journal of oncology, Sv. 2010.
70. *The prognostic role of circulating tumor cells (CTCs) in lung cancer.* Kapeleris, Joanna, a další. místo neznámé : Frontiers, 2018, Frontiers in oncology, Sv. 8, str. 311.
71. *The Role of Circulating Tumor Cells in Breast Cancer and Implications for Radiation Treatment Decisions.* Goodman, Chelain R. and Speers, Corey W. United States : Elsevier Inc, 2021, International journal of radiation oncology, biology, physics, Vol. 109, pp. 44-59. ISSN: 0360-3016.
72. *Circulating Tumor Cells as a Biomarker for Preoperative Prognostic Staging in Patients With Esophageal Cancer.* Reeh, Matthias, et al. United States : s.n., 2015, Annals of surgery, Vol. 261, pp. 1124-1130. ISSN: 0003-4932.
73. *Circulating Tumor Cells Are Associated with Recurrent Disease in Patients with Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer Treated with Stereotactic Body Radiotherapy.* Frick, Melissa A., et al. United States : s.n., 2020, Clinical cancer research, Vol. 26, pp. 2372-2380. ISSN: 1078-0432.
74. *Circulating tumor cells predict occult metastatic disease and prognosis in pancreatic cancer.* Ankeny, Jacob S., a další. místo neznámé : Springer, 2018, Annals of surgical oncology, Sv. 25, stránky 1000–1008.
75. *Circulating Tumor Cells Predict Occult Metastatic Disease and Prognosis in Pancreatic Cancer.* Court, Colin M., et al. Cham : Springer International Publishing, 2018, Annals of surgical oncology, Vol. 25, pp. 1000-1008. ISSN: 1068-9265.
76. *Predictors of distant relapse in patients with FIGO stage IIB–IVA cervical cancer treated with definitive radiotherapy.* Okazawa-Sakai, Mika, et al. Australia : Wiley Subscription Services, Inc, 2017, The journal of obstetrics and gynaecology research, Vol. 43, pp. 1743-1750. ISSN: 1341-8076.

77. *Circulating Tumor Cells Counting Act as a Potential Prognostic Factor in Cervical Cancer*. Du, Kunpeng, et al. Los : SAGE Publications, 2020, Technology in cancer research & treatment, Vol. 19. ISSN: 1533-0346.
78. *The Role of Circulating Tumor Cells as Potential Predictive and Prognostic Factors in Cervical Cancers*. Nesbit, E. A., a další. místo neznámé : Elsevier BV, November 2022, International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics, Sv. 114, str. S91. ISSN: 0360-3016.
79. *Circulating Tumor Cells In Advanced Cervical Cancer: NRG Oncology-Gynecologic Oncology Group Study 240 (NCT 00803062)*. Tewari, Krishnansu S., et al. United States : s.n., 2020, Molecular cancer therapeutics, Vol. 19, pp. 2363-2370. ISSN: 1535-7163.
80. *Liquid Biopsy in Cervical Cancer: Hopes and Pitfalls*. Cafforio, Paola, a další. místo neznámé : MDPI AG, August 2021, Cancers, Sv. 13, str. 3968. ISSN: 2072-6694.
81. *Serum squamous cell carcinoma antigen as an early indicator of response during therapy of cervical cancer*. Markovina, Stephanie, a další. místo neznámé : Springer Science and Business Media LLC, November 2017, British Journal of Cancer, Sv. 118, stránky 72–78. ISSN: 1532-1827.
82. *SERPINB3 (SCCA1) inhibits cathepsin L and lysoptosis, protecting cervical cancer cells from chemoradiation*. Wang, Songyan, a další. místo neznámé : Springer Science and Business Media LLC, January 2022, Communications Biology, Sv. 5. ISSN: 2399-3642.
83. *Elevated circulating tumor cells and squamous cell carcinoma antigen levels predict poor survival for patients with locally advanced cervical cancer treated with radiotherapy*. Wen, Yue-Feng, et al. United States : Public Library of Science, 2018, PloS one, Vol. 13, pp. e0204334-e0204334. ISSN: 1932-6203.
84. *Preoperative neutrophil/lymfocyte ratio as a prognostic factor in patients with early cervical cance treated with radical hysterectomy*. Young Lee. 2010, Gynecologic Oncology, Vol. 120, pp. S112-S112.
85. *Pretreatment Neutrophil: Lymfocyte Ratio as a Prognostic factor in Cervical Cancer*. Kim, Yoo-Young Lee Byoung-Gie. 2012, Aticancer Research, pp. 1555–1562.

86. *Preoperative neutrophil/lymfocyte ratio as a prognostic factor in patients with early cervical cance treated with radical hysterectomy.* Lee, Young. 2010, Gynecologic Oncology, Vol. 120, pp. S112-S112.

87. *Pretreatment Neutrophil: Lymfocyte Ratio as a Prognostic factor in Cervical Cancer.* Byoung-Gie Kim, Yoo-Young Lee. 2012, Aticancer Research, pp. 1555-1562.

88. *The predictive value of neutrophil to lymphocyte ratio and platelet to lymphocyte ratio in determining cervical cancer stage.* Teoh, D. G. K., et al. s.l. : Elsevier Inc, 2017, Gynecologic oncology, Vol. 145, pp. 83-83. ISSN: 0090-8258.

89. *Pre-treatment neutrophil to lymphocyte ratio is elevated in epithelial ovarian cancer and predicts survival after treatment.* Cho, HanByoul, et al. Berlin/Heidelberg : Springer-Verlag, 2009, Cancer Immunology, Immunotherapy, Vol. 58, pp. 15-23. ISSN: 0340-7004.