

Cirkulující nádorové buňky v onkourologii

Circulating tumor cells in oncurology

Alžběta Kantorová, Viktor Soukup, Otakar Čapoun

Urologická klinika VFN a 1. LF UK, Praha

Došlo: 23. 10. 2024

Přijato: 17. 6. 2024

Kontaktní adresa:

MUDr. Alžběta Kantorová
Urologická klinika VFN a 1. LF UK
Ke Karlovu 6, 128 00 Praha
e-mail: alzbeta.kantorova@vfn.cz

Střet zájmů: Autorka prohlašuje, že má následující možný konflikt zájmů: přednášející Ipsen.

Prohlášení o podpoře: Podpořeno projektem MZ ČR – RVO-VFN64165.

SOUHRN

Kantorová A, Soukup V, Čapoun O. Cirkulující nádorové buňky v onkourologii.

V onkourologii využíváme řadu biomarkerů v diagnostice, monitoraci léčby, předpovědi relapsu či rezistence na terapii. Nejčastěji užívaným biomarkerem v onkourologii je prostatický specifický antigen (PSA) u léčby karcinomu prostaty. Další markery se uplatňují u nádorů varlat, konkrétně alfa-fetoprotein (AFP), beta-podjednotka lidského choriogonadotropinu (beta-hCG) a laktátdehydrogenáza (LD). U karcinomu močového měchýře využíváme vyšetření cytologie moči, jejímž úskalím je však i přes dobrou senzitivitu a specifitu v zachytu high-grade uroteliálního karcinomu nízká senzitivita při detekci low-grade lézí. U ostatních

onkourologických onemocnění nám však stále specifické biomarkery chybí. V současné době probíhá výzkum cirkulujících nádorových buněk (circulating tumor cells – CTC), které jsou odebírány pomocí tzv. „tekuté biopsie“ a mohly by se stát slibnými biomarkery v řadě onemocnění. V této práci podáváme přehled aktuálního využití CTC u onkourologických onemocnění.

KLÍČOVÁ SLOVA

Cirkulující nádorové buňky, tekutá biopsie, karcinom prostaty, nádory ledviny, nádory močového měchýře.

ABSTRACT

Kantorová A, Soukup V, Čapoun O. Circulating tumor cells in oncurology.

In oncurology, we use a number of biomarkers for diagnosis, monitoring treatment, predicting relapse or resistance to therapy. The most commonly used biomarker in oncurology is prostate specific antigen (PSA) in the treatment of prostate cancer. Other markers used in testicular tumours are alpha-fetoprotein (AFP), beta-subunit of human chorionic gonadotropin (betahCG) and lactate dehydrogenase (LD). For bladder cancer we use urine cytology test, which despite good sensitivity and specificity in detecting high-grade urothelial carcinomas has the disadvantage of low sensitivity in detecting low-grade lesions. However, we still lack specific biomarkers for other oncological

diseases. Currently, research is being conducted on circulating tumour cells (CTCs), which are collected by a so-called “liquid biopsy” and could be promising biomarkers for a number of diseases. In this paper, we provide an overview of the current use of CTCs in oncological diseases.

KEY WORDS

Circulating tumour cells, liquid biopsy, prostate cancer, kidney cancer, bladder cancer.

.....

ÚVOD

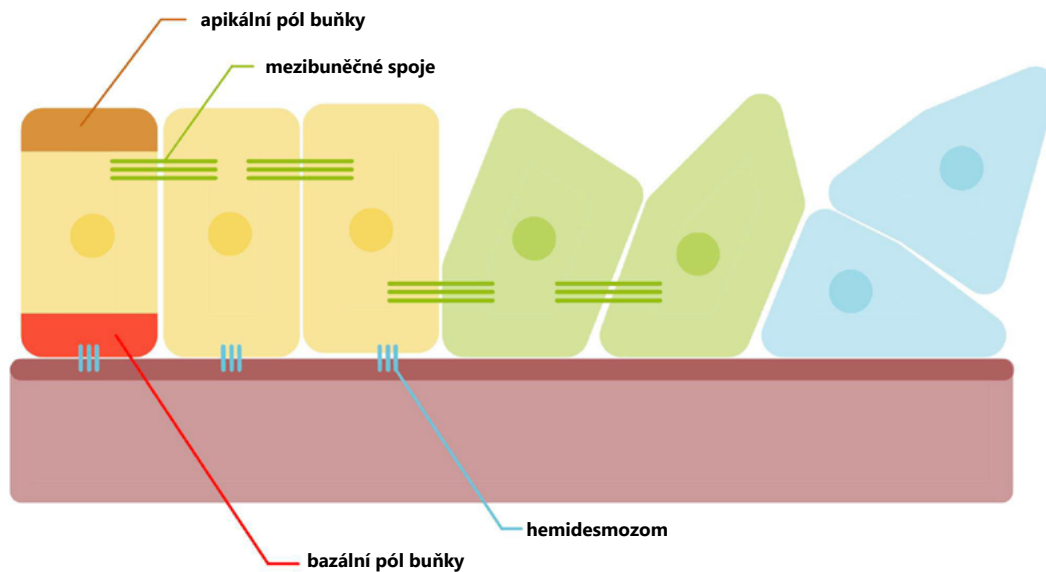
Přestože již bylo objeveno mnoho slibných onkomarkerů, stále chybí specifické molekuly, které by nám umožnily nejen diagnostikovat dané onemocnění, ale i monitorovat průběh léčby a předpovídat relaps či rezistenci pacienta na zvolenou terapii. Jelikož je pro nádorové onemocnění charakteristické, že se buňky postupnou evolucí a schopností selektovat nové mutace stávají odolnější k aplikované léčbě, nemožnost monitorovat tyto změny je bohužel často příčinou neúspěchu léčby (1). Pro tento účel by bylo ideální zvolit co nejméně invazivní metodu, která by oproti standardní biopsii umožnila provádět opakované odběry v průběhu léčby pacienta. Jako ideální přístup odběru vzorků se nabízí vyšetření periferní krve či moči pacienta. Pro tento způsob vyšetření se užívá již tradiční pojem „tekutá biopsie“, která zahrnuje použití krve a jiných lidských tekutin jako náhradních materiálů tkáňových/cytologických vzorků (2, 3). Výzkum v tekuté biopsii se v současnosti zaměřuje zejména na cirkulující nádorové buňky (circulating tumor cells), jaderné buňky, které se oddělily od primárního tumoru nebo metastáz a vstoupily do krevního oběhu a svým průchodem krevním řečištěm mohou založit metastázy v dalších orgánech (4). Hlavním úskalím, na které metody detekující CTC narážejí, je extrémně nízká koncentrace CTC v periferní krvi, průměrná koncentrace se udává jedna cirkulující buňka na 10 000 leukocytů, a proto je jejich detekce velmi obtížná (5).

MECHANISMUS VZNIKU CTC

Přesný mechanismus metastazování není stále přesně znám, avšak prokázaný a v posledních letech stále podrobněji studovaný je proces tzv. epiteliálně-mezenchymální tranzice (EMT). Při té dochází ke změně buňky z epiteliálního na mesenchymální fenotyp. Během tohoto procesu buňky ztrácejí svou buněčnou polaritu a buněčné spoje, které jim umožňují buněčnou adhezi. Tím získávají své migrační a invazivní schopnosti (6, 7). Na molekulární úrovni bylo zjištěno, že se na EMT podílejí transkripční faktory ZEB1 (zinc finger E-box binding homeobox 1), TWIST1 (twist family bHLH transcription factor 1) a SNAIL (snail family transcriptional repressor 1), u kterých dochází při buněčné tranzici k upregulaci. Výsledné produkty těchto kaskád pak způsobují modulaci buněčných spojů, přestavbu cytoskeletu a aktivují matrixové metaloproteázy, které rozpouštějí extracelulární matrix, což napomáhá odpojení buňky od její bazální membrány. Dále dochází u buněk ke ztrátě epiteliálních cadherinů (Ecadherinů) a oproti tomu se zvyšuje produkce neurálních cadherinů (N-cadherinů), pomocí kterých buňky lépe interagují se stromálními a endoteliálními buňkami a snadněji prochází do krevního řečiště (7, 8). Díky výše uvedeným změnám buňky získávají schopnosti rychlé proliferace, rezistence k apoptóze, deregulace metabolismu a pohyblivosti. Tyto buňky se pak odpojují od primárního tumoru a díky své vysoké pohyblivosti a schopnosti pronikat do tkání a krevního řečiště putují a zakládají sekundární nádorová ložiska (8).

DIAGNOSTICKÉ MOLEKULÁRNÍ METODY

Mezi převládající molekulární metody patří imunomagnetická separace a následné analýzy pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR), imunocytochemie nebo fluorescenčního zobrazování. Tyto metody umožňují selektivní zachycení CTC a identifikaci specifických molekulárních markerů prostaty, jako jsou například prostatický specifický antigen



Obr. 1. Ilustrace mechanismu epiteliálně-mezenchymální tranzice (EMT). Buňka postupně ztrácí své buněčné spoje, adhezi k bazální membráně, polaritu, pravidelný tvar až na závěr dochází k odloučení buňky od bazální membrány. Autor: Kryštof Kantor

Fig 1. Illustration of the mechanism of epithelial-mesenchymal transition (EMT). The cell gradually loses its cell connections, adhesion to the basement membrane, polarity and regular shape and finally detaches from the basement membrane. Author: Kryštof Kantor

(PSA), epiteliální buněčná adhezní molekula (Ep-CAM) a další.

Další významnou technologií je izolace CTC pomocí mikrofluidních zařízení a jejich následná analýza na úrovni jednotlivých buněk. Tyto postupy umožňují detailní molekulární charakterizaci CTC na genomické a proteomické úrovni, což může poskytnout informace o heterogenitě nádoru a jeho potenciálních terapeutických cílech (9).

KARCINOM PROSTATY

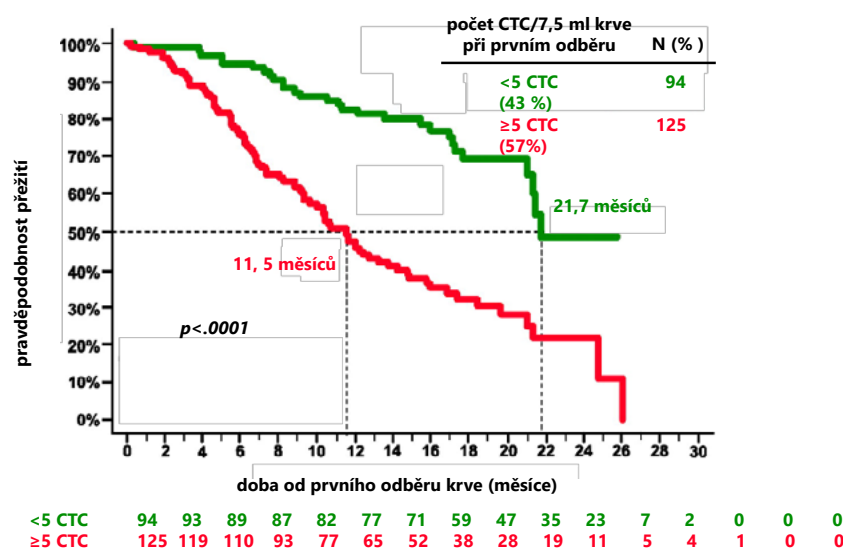
Limitací detekce CTC je nedostatek standardizovaných metod, které by se mohly užívat v klinické praxi. Zatím jedinou oficiálně povolenou metodou je od roku 2005 systém CellSearch®, který je americkým úřadem Food and Drug Administration (FDA) schválen pouze v diagnostice karcinomu prostaty (KP), kolorektálního karcinomu a karcinomu prsu. Není proto překvapivé, že ze všech onkourologických onemocnění proběhlo právě

u KP dosud nejvíce studií týkajících se CTC. Již v roce 2008 de Bono et al. publikovali studii, kde u celkem 276 pacientů s metastatickým kastračně rezistentním KP (metastatic castration-resistant prostate cancer – mCRPC) bylo cílem zjistit vztah mezi počtem CTC po léčbě a celkovým přežitím (overall survival – OS). U pacientů byla odebrána periferní krev před zahájením a následně po podání chemoterapie. Pacienti byli rozděleni dle výsledků do příznivé (< 5 CTC/7,5 ml krve) nebo nepříznivé skupiny (≥ 5 CTC/7,5 ml krve). Z 276 zařazených pacientů bylo hodnoceno 231 pacientů. Pacienti zařazení do nepříznivé skupiny měli kratší OS (medián OS 11,5 vs. 21,7 měsíců; hazard ratio [HR] 3,3; 95% CI 2,2–5,1; $p < 0,0001$), kratší OS měli rovněž pacienti v nepříznivém počtu CTC po léčbě (medián OS 6,7–9,5 vs. 19,6–20,7 měsíců; HR 4,5; 95% CI 3,0–6,7; $p < 0,0001$). Naopak u pacientů iniciálně zařazených do nepříznivé skupiny, kteří měli po absolvované léčbě příznivý počet CTC, se OS prodloužil (6,8 až 21,3 měsíců). V této studii tedy byl počet ≥ 5 CTC v 7,5 ml krve stanoven jako

nepříznivý prognostický faktor, zatímco pokles počtu CTC po léčbě jako příznivý prognostický faktor (10). Další významnou prací je studie z roku 2014, ve které se Antonarakis et al. zabývali izoformou androgenního receptoru (AR) se sestřihovou variantou 7 (ARV7), jejíž přítomnost v CTC u mužů s metastatickým KP je spojena se vznikem mCRCP. Tato prospektivní studie hodnotila pacienty s pokročilým KP, kteří byli v první linii léčeni buď enzalutamidem nebo abirateronem. Primární cíl sledoval souvislost přítomnosti AR-V7 a míru odpovědi PSA, autoři dále sledovali přežití bez progresu (progression free survival – PFS) a OS. Zařadili celkem 31 pacientů léčených enzalutamidem a 31 pacientů léčených abirateronem, z nichž 39 % a 19 % mělo detekovatelnou AR-V7 v CTC. Mezi muži užívajícími enzalutamid měli ti AR-V7 pozitivní (AR-V7 +) nižší míru odpovědi PSA než AR-V7 negativní (AR-V7 –) pacienti (0 % vs. 53 %; 95% CI 29–76;

$p = 0,004$) a kratší dobu PFS (medián PFS 2,1 měsíce vs. 6,1 měsíce; HR 16,1; 95% CI 3,9–66,0; $p < 0,001$) a OS (medián OS 5,5 měsíce vs. nedosažen; HR 6,9; 95% CI 1,7–28,1; $p = 0,002$). Podobně u mužů AR-V7 + léčených abirateronem byla prokázána nižší odpověď PSA než u AR-V7 – pacientů (0 % vs. 68 %; $p = 0,004$) a OS (medián OS 10,6 měsíce vs. nedosažen; $p = 0,006$). Jedná se o první studii, která hodnotila souvislost positivity AR-V7 v CTC s rezistencí na terapii enzalutamidem a abirateronem (11). Na tuto studii pak navázal stejný tým prospektivní studií, kdy rozšířili velikost kohorty na 202 pacientů s mCRCP a potvrdili důležitost detekce AR-V7 v CTC stran předpovědi odpovědi pacienta na hormonální léčbu (12).

Významnosti počtu CTC jako prediktoru OS a přežití bez metastáz (MFS – metastasis-free survival) u pacientů s vysoce rizikovým karcinomem prostaty se věnovala práce Cieślowski et al. z roku



Obr. 2. Kaplan-Meierovy křivky pravděpodobnosti celkového přežití (OS – overall survival) u pacientů s metastatickým kastročně rezistentním KP (mCRPC – metastatic castration-resistant prostate cancer) před zahájením terapie rozdělených dle iniciační koncentrace cirkulujících nádorových buněk (CTC – circulating tumor cells) do dvou skupin – červeně skupina pacientů s nepříznivou prognózou (koncentrace CTC před zahájením terapie ≥ 5 CTC/7,5 ml krve) a zeleně skupina pacientů s příznivou prognózou (koncentrace CTC před zahájením terapie < 5 CTC/7,5 ml krve) (10)

Fig. 2. Kaplan-Meier curves of the probability of overall survival in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer before the start of therapy, divided into two groups according to the initial concentration of circulating tumour cells – in red the group of patients with an unfavourable prognosis (CTC concentration before the start of therapy ≥ 5 CTC/7.5 ml blood) and in green the group of patients with a favourable prognosis (CTC concentration before the start of therapy < 5 CTC/7.5 ml blood) (10)

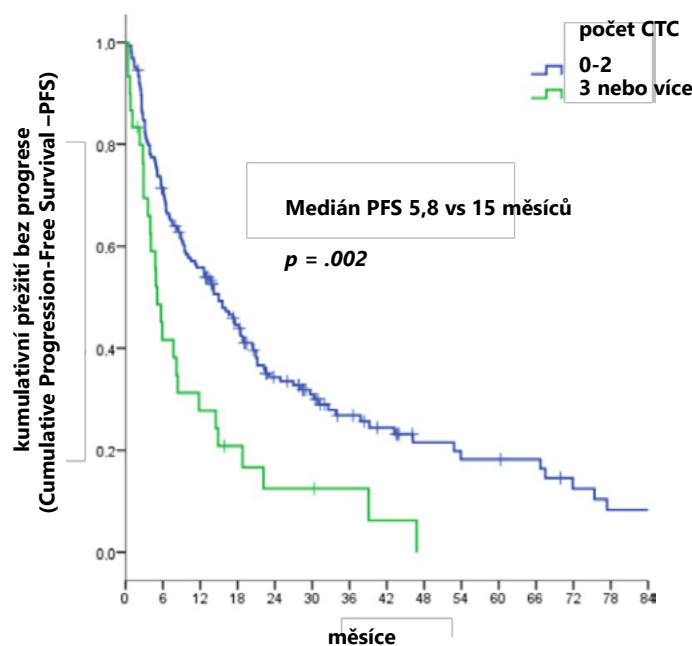
2023. Ve studii hodnotili data 104 pacientů, u kterých byla provedena detekce CTC prostřednictvím systému CellSearch®, EPISPOT assay a GILUPI Cell-Collector. Bylo prokázáno, že při počtu CTC ≥ 1 , detekovaným systémem měli pacienti statisticky významnou asociaci s horším OS, včetně podskupiny pacientů s lokalizovanou formou KP. Jako další prediktory horšího OS bylo prokázáno Gleasonovo skóre ≥ 8 , nález cT $\geq 2c$ a přítomnost metastáz v počáteční fázi diagnózy. Kumulativního 5leté OS dosáhlo 66 % sledovaných (95% CI: 56–74 %) (13).

Autoři tohoto přehledového článku si jsou vědomi staršího data informací prezentovaných v tomto textu. Recentní revize portálu PubMed na téma významu CTC v oblasti KP však nepřinesla žádné nové publikace s aktuálnějšími poznatky či zásadními novými informacemi v této problematice. I přes absenci novějších zjištění zůstáváme otevření možnosti, že se v oblasti našeho zájmu

mohou objevit nové významné poznatky či výsledky, které budou pro další pochopení daného tématu klíčové.

NÁDORY LEDVIN

Dle statistik Světového fondu pro výzkum rakoviny (World Cancer Research Fund) z roku 2020 má Česká republika hned po Litvě nejvyšší incidenci renálního karcinomu (renal cell carcinoma – RCC) (14). První studii, zabývající se CTC u renálního karcinomu, provedli Bluemke et al. v roce 2009. Cílem práce bylo prokázat klinickou relevanci přítomnosti CTC v periferní krvi u pacientů s RCC. Hodnotili celkem 233 vzorků periferní krve od 154 pacientů a prokázali signifikantně významnou korelaci mezi přítomností CTC a pozitivním uzlinovým postižením ($p < 0,001$), přítomností synchronních



Obr. 3. Kaplan-Meierovy křivky přežití bez progresce (PFS – progression free survival) u pacientů s metastatickým renálním karcinomem léčených inhibitory tyrosinové kinázy rozdělených dle iniciální koncentrace cirkulujících nádorových buněk (CTC – circulating tumor cells) do dvou skupin – modře skupina pacientů s < 3 CTC/7,5 ml krve a zeleně skupina pacientů s ≥ 3 CTC/7,5 ml krve (15)

Fig. 3. Kaplan-Meier curves of progression-free survival (PFS) in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with tyrosine kinase inhibitors, divided into two groups according to baseline circulating tumour cells (CTC) concentration – blue the group of patients with < 3 CTC/7.5 ml of blood and in green the group of patients with ≥ 3 CTC/7.5 ml of blood (15)

metastáz v době resekce primárního tumoru ($p = 0,014$) a horším OS (HR 2,3; $p = 0,048$). Další data přinesla v roce 2021 multicentrická prospektivní studie týmu Basso et al., jejímž cílem bylo zjistit prognostickou roli CTC u pacientů s metastatickým renálním karcinomem (mRCC). Primárně posoudili korelaci mezi počtem CTC a PFS, sekundární cíl pak představoval porovnání OS. Sledovali skupinu 195 pacientů s mRCC léčených inhibitory tyrosinové kinázy, a to buď sunitinibem (77,5 %) nebo pazopanibem (21 %). Počet CTC byl pak zjišťován ve čtyřech časových úsecích – v den zahájení léčby, pak 28. a 56. den léčby, a poté při progresi nebo ve 12 měsících bez progresu. Na začátku léčby prokázali přítomnost alespoň jedné nebo více CTC/7,5 ml periferní krve u 46,7 % pacientů. U 15 % pacientů pak byla zjištěna koncentrace tří a více CTC/7,5 ml krve. Soubor pacientů pak rozdělili do dvou skupin – pacienty s méně než třemi CTC/7,5 ml krve a pacienty s tři a více CTC/7,5 ml krve. U pacientů s tři a více CTC/7,5 ml krve byl nižší medián PFS (5,8 vs. 15 měsíců; HR 1,99; 95% CI 1,28–3,03; $p = 0,002$), kratší odhadovaný OS (13,8 měsíců vs. 52,8 měsíců; HR 1,99; 95% CI, 1,17–3,2; $p = 0,003$). Studie prokázala, že přítomnost tří a více CTC/7,5 ml krve na začátku léčby pacientů s mRCC je spojena s významně kratším PFS a OS (15).

NÁDORY MOČOVÉHO MĚCHÝŘE A HORNÍCH CEST MOČOVÝCH

Nádory močového měchýře a horních cest močových (urothelial cancer – UC) se řadí k nádorovým onemocněním s nejvyššími náklady na léčbu. Přibližně 75 % karcinomů močového měchýře (KMM) je diagnostikováno v neinvazivním stadiu. Toto stadium má sice nízkou nádorovou specifickou mortalitu, ale je charakterizováno častou recidivou. To vede k nutnosti celoživotního sledování, které je založeno na opakovaných invazivních a nákladných cystoskopických kontrolách a v případě recidiv musí být pacient opakovaně hospitalizován a operován, což vede k vysokým nákladům. Z toho důvodů je snaha o nalezení markerů, které by kromě zlepšení diagnostiky, určení prognózy a sledování efektu

terapie, také usnadnily nákladnou a často invazivní dispenzarizaci pacientů (16). Fakt, že přítomnost CTC je negativním prognostickým faktorem, potvrdili v roce 2014 Gazzania et al. prospektivní, unicentrickou studii, která zařadila 120 pacientů s KMM stadia pT1 G3, kteří byli indikováni k transuretrální resekci močového měchýře (TURM) a následně adjuvantní Bacillus Calmette Guerin (BCG) intravezikální imunoterapii. Cílem bylo prokázat asociaci incidence CTC s dobou do první rekurence (time to first recurrence – TFR) a přežití bez progresu (progression free survival – PFS). Detekovány byly CTC u celkem 24 (20 %) pacientů a prokázala se jak sníženou TFR (HR 1,99; 95% CI 1,38–6,18; $p = 0,005$), tak sníženým PFS (HR 7,17; 95% CI 1,89–27,21; $p = 0,004$). Tato studie potvrdila, že pomocí analýzy CTC by pacientům s pT1 KMM mohlo být prokázáno systémové onemocnění již v době diagnózy a mohli by eventuelně profitovat ze systémové léčby (17). Negativní prognostickou hodnotu CTC potvrdila i studie Flaig et al., kde ze 44 zařazených pacientů s KMM byla detekována alespoň jedna CTC/7,5 ml krve u pěti pacientů ze 30 (17 %) s klinicky lokalizovaným KMM a u sedmi pacientů (50 %) s metastatickým KMM. S mediánem sledování 337 dnů zemřelo všech sedm jedinců s metastatickým KMM a detekovatelnými CTC (18). Dále byla v roce 2017 byla publikována rozsáhlá metaanalýza k posouzení prognostické a diagnostické hodnoty CTC u UC. Zahrnuto bylo 30 publikovaných studií s celkem 2 161 pacienty s UC z databází Medline, Embase a Web of Science. Rozsáhlá metaanalýza v roce ukázala, že pozitivita CTC byla významně spojena se stadiem nádoru ($\leq$ II vs. III, IV) (Odds Ratio [OR] 4,60, 95% CI 2,34–9,03), histologickým stupněm (I, II vs. III) (OR 2,91; 95% CI 1,92–4,40), přítomností metastáz (OR 5,12; 95% CI 3,47–7,55) a přítomností metastáz do regionálních lymfatických uzlin (OR 2,47; 95% CI 1,75–3,49). Přítomnost CTC byla také významně spojena se špatným OS (HR 3,98; 95% CI 2,20–7,21) a PFS (HR 2,22; 95% CI 1,80–2,73) (19).

Význam monitorace hladiny CTC během léčby podporuje i práce Jin et al. z roku 2023, jejímž cílem bylo potvrdit prognostickou hodnotu detekce CTC u pacientů se svalovinu infiltrujícím KMM (MIBC – muscle invasive bladder cancer) léčených neoad-

juvantní chemoterapií (NAC – neoadjuvant chemotherapy). Do studie bylo zařazeno 107 pacientů s MIBC, u všech proběhl odběr před zahájením NAC, po ukončení NAC před radikální cystektomií. Z 68 pacientů, kteří dostávali NAC, bylo u 45 pacientů (66 %) detekováno snížení počtu CTC po NAC. Snížení počtu CTC bylo klíčovým prognostickým faktorem pro lepší PFS u všech pacientů s MIBC léčených NAC ($p < 0,01$) (20).

Limitací zatím proběhlých studií je především to, že se jednalo většinou o studie nerandomizované, na malé kohortě pacientů. Z výše uvedených studií vyplývá, že CTC zatím své místo v diagnostice nenašly. Avšak detekce CTC mohla být užívána pro lepší iniciační stratifikaci pacientů a pomoci při rozhodování o další terapii, zda např. provést pouze TURM nebo ev. doplnit adjuvantní systémovou léčbu (21).

OSTATNÍ ONKOUROLOGICKÁ ONEMOCNĚNÍ

V oblasti výzkumu nádorů penisu a nádorů varlat v době psaní článků nebyly publikovány téměř žádné práce týkající se výzkumu CTC u těchto onemocnění.

ZÁVĚR

Tekutá biopsie a konkrétně detekce CTC je jistě slibnou metodou nejen v diagnostice, ale i v monitoraci průběhu léčby, předpovědi relapsu či rezistenci pacienta na terapii. Intenzivní výzkum CTC probíhá u KP, nádorů ledvin či močového měchýře. I přes intenzivní probíhající výzkum si budeme muset na levnou a rychlou metodu, která by se mohla užívat v klinické praxi, ještě počkat.

LITERATURA

1. Ondroušková E, Hrstka R. Circulating Tumor DNA in Blood and Its Utilization as a Potential Biomarker for Cancer. *Klin Onkol.* 2015 Sep 15; 28(Suppl. 2): 2S69–74.
2. Cimadamore A, Aurilio G, Nolé F, et al. Update on Circulating Tumor Cells in Genitourinary Tumors with Focus on Prostate Cancer. *Cells.* 2020 Jun 19; 9(6): 1495.
3. Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017 Sep; 14(9): 531–548.
4. Lozar T, Gersak K, Cemazar M, et al. The biology and clinical potential of circulating tumor cells. *Radiol Oncol.* 2019 May 8; 53(2): 131–147.
5. Van Der Toom EE, Verdone JE, Gorin MA, Pienta KJ. Technical challenges in the isolation and analysis of circulating tumor cells. *Oncotarget.* 2016 Sep 20; 7(38): 62754–66.
6. Capoun O, Soukup V, Mikulová V, et al. Circulating tumor cells and prostate cancer prognosis. *Cas Lek Cesk.* 2014; 153(2): 72–7.
7. Matějka VM, Fínek J, Králíčková M. Epithelial-mesenchymal Transition in Tumor Tissue and Its Role for Metastatic Spread of Cancer. *Klin Onkol.* 2017 Feb 15; 30(1): 20–7.
8. Dongre A, Weinberg RA. New insights into the mechanisms of epithelial – mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019 Feb; 20(2): 69–84.
9. Strati A, Markou A, Kyriakopoulou E, Lianidou E. Detection and Molecular Characterization of Circulating Tumour Cells: Challenges for the Clinical Setting. *Cancers.* 2023 Apr 6; 15(7): 2185.
10. de Bono JS, Scher HI, Montgomery RB, et al. Circulating Tumor Cells Predict Survival Benefit from Treatment in Metastatic Castration – Resistant Prostate Cancer. *Clin Cancer Res.* 2008 Oct 1; 14(19): 6302–9.
11. Antonarakis ES, Lu C, Wang H, et al. AR-V7 and Resistance to Enzalutamide and Abiraterone in Prostate Cancer. *N Engl J Med.* 2014 Sep 11; 371(11): 1028–38.
12. Antonarakis ES, Lu C, Luber B, et al. Clinical Significance of Androgen Receptor Splice Variant-7 mRNA Detection in Circulating Tumor Cells of Men With Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer Treated With First- and Second-Line Abiraterone and Enzalutamide. *J Clin Oncol.* 2017 Jul 1; 35(19): 2149–56.

13. Cieřlikowski WA, Milecki P, řwierczewska M, et al. Baseline CTC Count as a Predictor of Long-Term Outcomes in High-Risk Prostate Cancer. *J Pers Med*. 2023 Mar 30; 13(4): 608.
14. Kidney cancer statistics | World Cancer Research Fund International [Internet]. [cited 2023 Oct 17]. Available from: <https://www.wcrf.org/cancer-trends/kidney-cancer-statistics/>.
15. Basso U, Facchinetti A, Rossi E, et al. Prognostic Role of Circulating Tumor Cells in Metastatic Renal Cell Carcinoma: A Large, Multicenter, Prospective Trial. *The Oncologist*. 2021 Sep 1; 26(9): 740–50.
16. Svatek RS, Hollenbeck BK, Holmång S, et al. The Economics of Bladder Cancer: Costs and Considerations of Caring for This Disease. *Eur Urol*. 2014 Aug; 66(2): 253–62.
17. Gazzaniga P, De Berardinis E, Raimondi C, et al. Circulating tumor cells detection has independent prognostic impact in high-risk non- muscle invasive bladder cancer: Influence of CTC on the Natural Course of Early Bladder Cancer. *Int J Cancer*. 2014 Oct 15; 135(8): 1978–82.
18. Flaig TW, Wilson S, Van Bokhoven A, et al. Detection of Circulating Tumor Cells in Metastatic and Clinically Localized Urothelial Carcinoma. *Urology*. 2011 Oct; 78(4): 863–7.
19. Zhang Z, Fan W, Deng Q, et al. The prognostic and diagnostic value of circulating tumor cells in bladder cancer and upper tract urothelial carcinoma: a meta-analysis of 30 published studies. *Oncotarget*. 2017 Aug 29; 8(35): 59527–38.
20. Jin D, Qian L, Xia J, et al. In vivo detection demonstrates circulating tumor cell reduction instead of baseline number has prognostic value in bladder cancer patients receiving neoadjuvant chemotherapy. *Cell Oncol*. 2023 Jun; 46(3): 793–7.
21. Král M, Hradil D, Kudláčková ř, et al. New diagnostic options and prognosis prediction of urinary bladder cancer. *Urol. praxi*. 2017 May 1; 18(2): 64–8.