

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy



Habilitační práce

Nádorové mikroprostředí melanomu

Tumor microenvironment of melanoma

MUDr. Ondřej Kodet, Ph.D.

Praha, 2021

Identifikační záznam:

KODET, Ondřej. *Nádorové mikroprostředí melanomu, Tumor microenvironment of melanoma*. Praha, 2021. Počet stran 170, bez příloh. Součástí příloh je 16 publikací v časopisech s IF. Habilitační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Anatomický ústav 1. LF UK a Dermatovenerologická klinika 1. LF UK a VFN.

Abstrakt:

Melanom představuje nejzhoubnější kožní nádor, který vychází z melanocytů, buněk tvořících pigment melanin. Incidence melanomu celosvětově stoupá a představuje tak významné zatížení zdravotnického systému. Navzdory velkému pokroku v biologii melanomu, zlepšené diagnostice a léčbě, je nadále prognóza pacientů s metastatickým onemocněním vážná a nejistá.

Tato práce je věnována nádorovému mikroprostředí melanomu. V úvodní teoretické části je popsána histogeneze melanomu od prekurzorových buněk neurální lišty, normálních melanocytů, k progresi a vzniku melanomu. Dále jsou popsány jednotlivé klinické varianty melanomu a jejich léčba, která navzdory pokrokům v biologii melanomu je primárně nadále chirurgická. Podrobněji je diskutována léčba adjuvantní, neoadjuvantní a léčba metastazujícího či lokálně pokročilého melanomu. Základním pilířem léčby je v současné době tzv. cílená léčba BRAF a MEK inhibitory a imunoterapie *checkpoint* inhibitory. Stěžejní část teoretického úvodu je věnována problematice nádorového mikroprostředí melanomu od horizontální fáze šíření po vertikální růstovou fázi a jednotlivé složky nádorového stromatu. V samostatných kapitolách je diskutována role nádorově asociovaných fibroblastů, které se významně podílejí na podpoře nádorového mikroprostředí, růstu a šíření nádorových melanocytů. Dále je dokumentována role nádor infiltrujících lymfocytů a s nádorem asociovaných makrofágů, které se také významně podílí na formování nádorového mikroprostředí a odpovídají za utváření protinádorové imunitní odpovědi. Význam komplexního chápání nádorového mikroprostředí se odráží ve studiu mechanismů rezistence na cílenou léčbu a imunoterapii melanomu. V poslední části teoretického úvodu jsou diskutovány biomarkery melanomu, které lze využít k diagnostice, predikci a prognóze onemocnění.

Ve druhé části práce jsou stručně popsány předložené práce, které podávají ucelený soubor věnovaný problematice melanomu a studiu jeho mikroprostředí. Jednotlivé práce jsou rozděleny do 4 tematických okruhů věnovaných jednak nádorovému mikroprostředí se zaměřením na studium nádorově asociovaných fibroblastů a jejich roli v biologii melanomu.

Hledání nových biomarkerů melanomu pomocí imunohistochemických metod v retrospektivně vyšetřených tkání a také v sérech pacientů s použitím proteomické analýzy. Ve třetím okruhu jsou popsány práce věnované genetickým alteracím melanomu s detekcí nových funkčních mutací a problematice stanovení PTEN genu v melanomu. Poslední okruh shrnuje přehledové práce věnované melanomu a problematice nádorového mikroprostředí. Shrnuje komplexní roli IL-6 v nádorové biologii a poukazuje například na vlastní pozorování unikátního abskopálního efektu u pacienta s generalizovaným melanomem. Celkově tato práce shrnuje komplexní problematiku melanomu včetně léčebné strategie a problematiky nádorového mikroprostředí melanomu.

Klíčová slova: melanom, cílená terapie BRAF a MEK inhibitory, *checkpoint* inhibitory, nádorové mikroprostředí, nádorově asociované fibroblasty, nádor infiltrující lymfocyty, nádorově asociované makrofágy.

Abstract:

Melanoma is the most malignant skin tumor that arises from melanocytes, the cells that make the pigment melanin. The incidence of melanoma is rising worldwide and represents a significant burden on the health care system. Unfortunately, despite the significant advances in melanoma biology and improved diagnosis and treatment, the prognosis of patients with metastatic disease remains serious and uncertain.

This study is devoted to the tumor microenvironment of melanoma. The histogenesis of melanoblasts from neural crest cells and normal melanocytes to the progression and onset of melanoma is described in this study's introduction. Furthermore, individual clinical variants of melanoma and their treatment are also described. The primary treatment is still surgical despite advances in melanoma biology. Adjuvant, neoadjuvant, and the treatment of metastatic or locally advanced melanoma are described in more detail. The primary treatment principle of metastatic melanoma is targeted therapy with BRAF and MEK inhibitors and immunotherapy with checkpoint inhibitors. The central part of the theoretical introduction is devoted to the tumor microenvironment of melanoma from the horizontal phase of spread to the vertical growth phase and individual components of the tumor stroma. The separate chapters discuss the role of cancer-associated fibroblasts, which significantly contribute to supporting the tumor microenvironment, tumor growth and spread of tumor melanocytes.

Furthermore, the role of tumor-infiltrating lymphocytes and tumor-associated macrophages, which are also significantly involved in the formation of the tumor

microenvironment, is also discussed. These components of the tumor microenvironment are responsible for generating an anti-tumor immune response. The importance of the thesis is in understanding mechanisms of resistance to targeted therapy and immunotherapy of melanoma, in which the tumor microenvironment also participates. In the last part of the theoretical introduction, biomarkers of melanoma are discussed, which can be used to diagnose, predict, and prognosis the disease.

The second part of the thesis briefly discusses the presented studies, which provide a comprehensive set devoted to melanoma and the study of its microenvironment. The individual research studies are divided into four thematic areas dedicated to the tumor microenvironment, focusing on analysing cancer-associated fibroblasts and their role in melanoma biology. The second part describes studies focused on new melanoma biomarkers using immunohistochemical methods in retrospectively examining tissues or patient sera using proteomic analysis. The third section describes the work devoted to genetic alterations of melanoma with detecting new functional mutations and determining the loss of function PTEN gene in melanoma. The last section summarizes the review works devoted to melanoma and the issue of the tumor microenvironment. It discussed the complex role of IL-6 in tumor biology and points to own observation of a unique abscopal effect in a patient with generalized melanoma. Overall, the work summarizes the complex issues of melanoma, including treatment strategy and a look at the complexity of the tumor microenvironment of melanoma.

Keywords: melanoma, targeted therapy with BRAF and MEK inhibitors, checkpoint inhibitors, tumor microenvironment, cancer-associated fibroblasts, tumor-infiltrating lymphocytes, tumor-associated macrophages.

Poděkování

Tato habilitační práce by nemohla vzniknout bez vynikajícího a příkladného vedení mých školitelů a spolupracovníků prof. MUDr. Karla Smetany, Jr., DrSc., prof. MUDr. Jiřího Štorka, CSc. a odb. as. MUDr. Lukáše Laciny, Ph.D. za což jim patří mé vřelé poděkování.

Dále bych chtěl touto formou poděkovat spolupracovníkům z Anatomického ústavu 1. LF UK zejména paní RNDr. B. Dvořánkové, Ph.D. za vynikající vedení mé práce v laboratoři tkáňových kultur a jazykovou korekci celého díla. Dále bych touto formou rád poděkoval spolupracovníkům z Ústavu molekulární genetiky, AV ČR, Ing. H. Strnadovi, Ph.D. a Mgr. M. Kolářovi, Ph.D. a spolupracovníkům z Přírodovědecké fakulty UK, zejména doc. RNDr. J. Brábkovi, Ph.D. a také spolupracovníkům z Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, zejména pak prof. MUDr. J. Motlíkovi, DrSc.

Mé vřelé poděkování patří také prof. MUDr. P. Dundrovi, Ph.D. a celému jeho výzkumnému kolektivu za možnost podílet se na grantovém projektu věnovanému problematice melanomu, při kterém se podařilo propojit klinický i základní výzkum mezi jednotlivými pracovišti.

Mé poděkování patří i prim. MUDr. I. Krajsové, MBA. za vynikající vedení nejen v postgraduálním vzdělávání v oboru dermatovenerologie, ale i dermatonkologie.

Vřelé poděkování patří i laboratorním pracovníkům M. Šlajsové, M. Bucifalové a také vedoucí sálové sestře I. Bulínové a A. Marešové.

V neposlední řadě bych rád poděkoval své rodině bez jejichž zázemí a pomoci by tato práce nikdy vzniknout nemohla.

Seznam zkratk (řazeno abecedně):

ACFs – kontrolní dermální fibroblasty, Autologous Control Fibroblasts
ALC – absolutní počet lymfocytů, Absolute Lymphocyte Count
ALM – akrolentiginózní melanom, Acrolentiginous Melanoma
ANC – podíl absolutního počtu neutrofilů, Absolute Neutrophil Count
BMP – kostní morfogenický protein, Bone Morphogenetic Protein
CAFs – nádorově asociované fibroblasty, Cancer Associated Fibroblasts
CAM – chorioalantoidní membrána, chorioallantoic membrane
CCL2 – chemokinového (C-C motif) ligandu 2, Chemokine (C-C motif) Ligand 2
CI – míra spolehlivosti, Confidence Interval
CNS – centrální nervový systém, Central Nervous System
ctDNA – cirkulující nádorové DNA, circulating tumor DNA
CTC – cirkulující nádorové buňky, Circulating Tumor Cells
CXCL-1 – chemokin (C-X-Cmotif) ligand 1, Chemokine (C-X-C motif) Ligand 1
CXCR2 – receptor beta pro IL-8 , Interleukin 8 receptor beta
DC – dendritické bunky, Dendritic Cell
DFS – specifické přežití, Disease Free Survival
DM – desmoplastický melanom, Desmoplastic Melanoma
DMFS – přežití bez vzniku vzdálených metastáz, Distant Metastasis Free Survival
DMRs – rozdílně metylované genomové oblasti, Differentially Methylated Regions
dNRL – odvozené hodnoty NRL, derived NRL
DTIC – dakarbazin, Dakarbazine
ECM – Extracelulární matrix, Extracellular Matrix
EGFR – receptor pro epidermální růstový faktor, Epidermal Growth Factor Receptor
EMT – Epitelově mezenchymový přechod, Epithelial Mesenchymal Transition
FDA – Americký úřad pro kontrolu potravin a léčiv, Food and Drug Administration
FGF – fibroblastový růstový faktor, Fibroblast Growth Factor
FGFR – receptor pro fibroblastový růstový faktor, Fibroblast Growth Factor Receptor
FSP-1 – fibroblastový specifický protein-1, Fibroblast Specific Protein-1
GM-CSF – granulocyt-makrofágové kolonie stimulující faktor, Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
H&E – barvení hematoxylin eozin, Hematoxylin and Eosin stain
HF – normální dermální fibroblasty, Human Fibroblasts
HGF – hepatocytární růstový faktor, Hepatocyte Growth Factor

HILP – Hypertermická končetinová cytostatická perfuze, Hypertermic Isolated Limb Perfusion)

HPM – neonatální melanocyty, Highly Pigmented Melanocytes

HR – míra rizika, Hazard Ratio

ICAM-1 – exprese mezibuněčné adhezní molekuly 1, Intercellular Adhesion Molecule 1

ICD - imunogenní buněčná smrt, Immunogenic Cell Death

IGF-1 – inzulinu podobného růstového faktoru 1, Insuline like Growth Factor 1

IFN- γ – interferonu- γ , Interferon- γ

IL-8 – interleukin-8, Interleukin-8 (podobně tak i IL-6 etc.)

IIOBWG – mezinárodní pracovní skupina pro imunologické onkologické biomarkery, International Working Group on Immunological Oncological Biomarkers

LAG-3 – gen 3 aktivující lymfocyty, Lymphocyte-Activation Gene 3

LDH – laktát dehydrogenáza, Lactate Dehydrogenase

LFS – lokální přežití bez recidivy onemocnění, Local Free Survival

LMM – lentigo maligna melanom, Lentiginous Malignant Melanoma

LLR – poměr leukocytů k lymfocytům, Leukocyte to Lymphocyte Ratio

LRFS – přežití do lokální progrese, Local Recurens Free Survival

MAFs – fibroblasty asociované s melanomem, melanoma associated fibroblasts

MAP – mitogen aktivovaná proteinová kináza, Mitogen-Activated Protein kinase

M-CSF – makrofágové kolonie stimulující faktor, Macrophage Colony-Stimulating Factor

miRNA – mikroRNA, microRNA

MMP – matrix metaloproteináza, Matrix metalloproteinase

MSCs – cirkulující mezenchymové kmenové buňky, Mesenchymal Stem Cells

MFS – přežití do vzniku metastatického postižení, Metastatic Free Survival

MIA – inhibující aktivita melanomu, Melanoma Inhibitory Activity

MITF – mikroftalmia-asociovaný transkripční faktor, Microphthalmia-associated Transcription Factor

MSH – melanocyty stimulující hormon, Melanocyte-Stimulating Hormone

NF-1 – protein-1 neurofibromatózy, Neurofibromatosis type I protein

NGS – sekvenování nové generace, Next Generation Sequencing

NLR – poměru neutrofilů k lymfocytům, Neutrophil to Lymphocyte Ratio

NM – nodulární melanom, Nodular Melanoma

ORR – četnost objektivních terapeutických odpovědí, Objective Response Rate

OS – celkové přežití, Overall Survival

pCR – patologická kompletní odpověď, pathological Complete Response

PDGFR beta–receptor β pro destičkový růstový faktor, Platelet Derived Growth Factor Receptor beta (podobně tak i alfa receptor)

PFS – přežití bez progresu, Progression Free Survival

PGE2 – prostaglandin E2, Prostaglandin E2,

RANKL – ligand rozpustného receptorového aktivátoru nukleárního faktoru kappa-B, Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand

RAC1 – Související s Ras C3 botulotoxinový substrát 1, Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1

RB1 – retinoblastomový protein 1, Retinoblastoma protein 1

RECIST – kritéria hodnocení odpovědi u solidních nádorů, Response Evaluation Criteria in Solid Tumors

RFS – období do relapsu onemocnění, Relaps Free Survival

SA β -gal – se senescencí-asociovaná β -galaktosidáza, Senescence Associated beta galactosidase

SLN – sentinelová uzlina, Sentinel Lymph Node

SNSSM - sekundárně nodulární superficiálně se šíří melanom, Secondary Nodular Superficial Spreading Melanoma

SSM – superficiálně se šířící melanom, Superficial Spreading Melanoma.

TAA – nádorově asociované antigeny, Tumor Associated Antigens

TAMs – nádorově asociované makrofágy, Tumor Associated Macrophages

TCR – receptor T-lymfocytů, T-Cell Receptor

TGF- β – transformující růstový faktor beta, Transforming Growth Factor beta

TILs – nádor infiltrující lymfocyty, Tumor Infiltrating Lymphocytes

TIM-3 – imunoglobulin T-lymfocytů a mucinová doména 3 obsahující aktivátor lymfocytů, T-cell Immunoglobulin and Mucin-domain containing-3.

TLP – Toll-like receptory, Toll-like receptors

TMB – mutační zatížení nádoru, Tumour Mutational Burden

TSA – nádorově specifické antigeny, Tumor Specific Antigens

UV – ultrafialové záření, Ultra Violet radiation

VCAM-1 – vaskulární buněčná adhezní molekula 1, Vascular Cell Adhesion protein 1

VEGF – vaskulární endotelový růstový faktor, Vascular Endothelial Growth Factor

WGS – celogenomové sekvenování, Whole Genome Sequencing

WHO – světová zdravotnická organizace, World Health Organisation

Obsah

1. Úvod.....	1
1.1. Melanocytogeneze, od neurální lišty po melanocyt	1
1.2. Funkce melanocytů, udržování homeostázy	2
1.3. Melanomogeneze, od neurální lišty po melanom	5
2. Melanom, klinické varianty, rizikové faktory, incidence.....	7
2.1. Klinické varianty	8
2.2. Rizikové faktory	12
2.3. Incidence a mortalita.....	15
3. Terapie melanomu.....	15
3.1. Chirurgická léčba melanomu	16
3.2. Adjuvantní terapie melanomu.....	18
3.3. Neoadjuvantní terapie melanomu	22
3.4. Léčba metastazujícího a lokálně pokročilého melanomu	24
3.4.1. <i>Checkpoint</i> inhibitory	25
3.4.2. Onkolytické viry a kombinovaná terapie s <i>checkpoint</i> inhibitory.....	27
3.4.3. Cílená terapie BRAF a MEK inhibitory.....	28
3.4.4. Radioterapie.....	30
3.4.5. Hypertermická končetinová cytostatická perfuze v terapii metastazujícího melanomu	31
3.5. Budoucí směr terapie a další možnosti	32
4. Nádorové mikroprostředí melanomu	33
4.1. Horizontální (radiální) a vertikální růstová fáze melanomu	34
4.2. Vznik metastatického postižení	35
4.3. Nádorové mikroprostředí a vlastnosti nádorového stromatu	37
4.3.1. Nádorově asociované fibroblasty, CAFs.....	39
4.3.2. Nádor infiltrující lymfocyty, TILs	46
4.3.3. Nádorově asociované makrofágy, TAMs.....	53
5. Nádorová rezistence a nádorové biomarkery melanomu	57
5.1. Rezistence melanomu na cílenou léčbu BRAF a MEK inhibitory	58
5.1.1. Epigenetické změny ovlivňující mechanismy rezistence	59
5.1.2. Genetické příčiny rezistence na cílenou léčbu	61
5.1.3. Vliv nádorového mikroprostředí na vznik rezistence	62
5.1.4. Imunomodulační účinek cílené terapie.....	64
5.2. Nádorová rezistence na imunoterapii.....	65
5.2.1. Primární rezistence na <i>checkpoint</i> inhibitory	66

5.2.2.	Získaná rezistence na <i>checkpoint</i> inhibitory	69
5.2.3.	Mikrobiom	70
5.3.	Biomarkery melanomu	73
5.3.1.	Sérologické biomarkery melanomu	73
5.3.2.	Biomarkery odrážející zánětlivý stav pacienta	76
5.3.3.	Genetické biomarkery melanomu	77
6.	Cíle práce.....	79
7.	Materiál a metodika	80
8.	Dosažené výsledky	81
8.1.	Předložené publikované práce v souvislosti s tématem práce	81
8.2.	Nádorové mikroprostředí melanomu	83
8.2.1.	Fibroblasty izolované z melanomu ovlivňují fenotyp normálních lidských keratinocytů	84
8.2.2.	Fibroblasty potencují <i>in vitro</i> invazivní růst melanomových buněk vyvolaný UV ozářeními keratinocyty	85
8.2.3.	Inhibice invazivního růstu melanomových buněk indukovaná CAFs pomocí současné blokáce IL-6 a IL-8.....	86
8.2.4.	Mikroprostředím zprostředkovaná rezistence na cílenou terapii BRAF inhibitory je spojena se změnami genové metylace a exprese v distálních fibroblastech	88
8.2.5.	Xenotransplantát melanomových buněk na choriolantoidní membránu kuřecího embrya: komplexní biologický model pro studium nádorových buněk.....	90
8.3.	Nádorové biomarkery melanomu	93
8.3.1.	Expresse Glut-1 u melanomu a melanocytárních névů	93
8.3.2.	Stathmin jako potenciální terapeutický cíl, ale nikoli prognostický marker u melanomu	94
8.3.3.	Srovnání pěti různých skórovacích metod při hodnocení TILs u povrchově se šířícího a nodulárního melanomu	96
8.3.4.	Proteomická analýza sér pacientů s melanomem s imunohistochemickým profilem primárních melanomů a kultivovaných buněk.....	98
8.4.	Genetické alterace melanomu	100
8.4.1.	Komplexní hodnocení patogenních mutací v primárních kožních melanomech, včetně identifikace nových variant.....	100
8.4.2.	Komplexní analýza PTEN u primárního kožního melanomu	103
8.5.	Shrnující přehledové práce.....	106
8.5.1.	Mezibuněčné interakce v melanomu	106
8.5.2.	Ekologie/ekosystém melanomu.....	107
8.5.3.	IL-6 a jeho význam v biologii nádorů.....	109
8.5.4.	Šíření melanomu závisí na vlastnostech maligních buněk a mezibuněčných interakcí v nádorovém mikroprostředí.....	111

8.5.5.	Abkopální efekt v současné době imunoterapie melanomu <i>check-point</i> inhibitory	115
9.	Závěr a hodnocení	117
10.	Literatura:.....	119

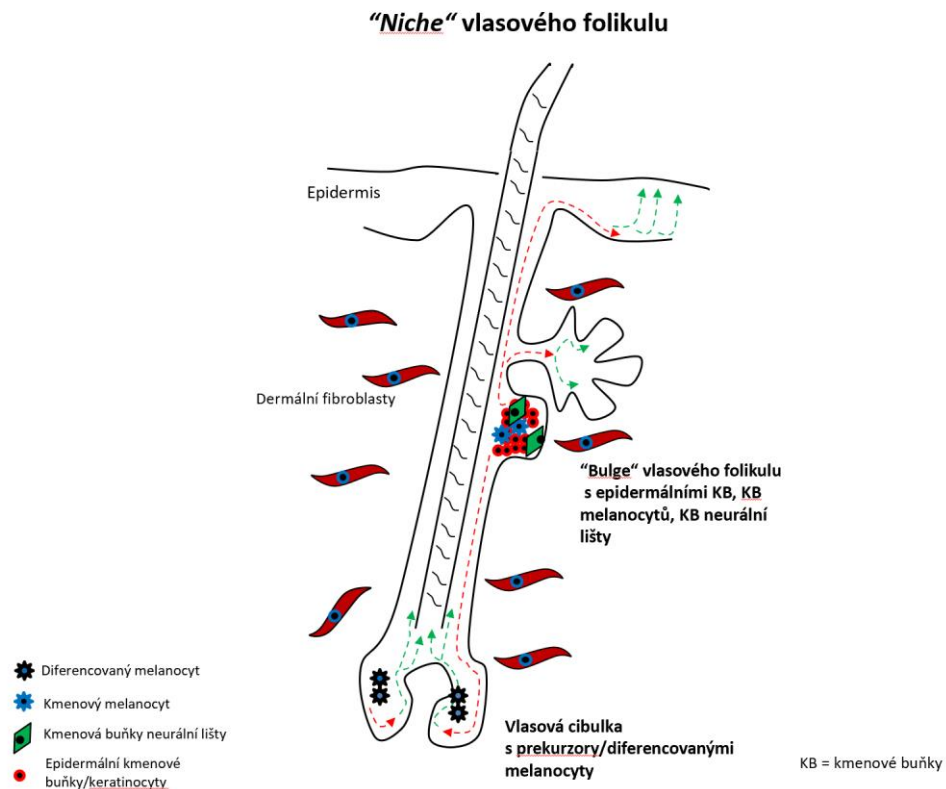
1. Úvod

1.1. Melanocytogeneze, od neurální lišty po melanocyt

Melanocyty jsou buňky pocházející vývojově z neurální lišty, které odpovídají za produkci pigmentu melaninu. Během 5. týdne embryonálního vývoje dochází při formování neurální trubice k uzávěru neurálních valů. Následně při uzávěru neurálních valů podstupují některé neuroektodermové buňky v dorzolaterální oblasti neurální trubice epitelově mezenchymový přechod (dále jako EMT, anglicky: Epithelial Mesenchymal Transition) a aktivně migrují do okolního mezodermu. Proces oddělení melanocytárních prekurzorů od neurální lišty se označuje jako delaminace. Řídícím krokem v delaminaci a následné migraci buněk pomocí EMT z neurální trubice je exprese transkripčního faktoru Snail s následnou ztrátou exprese E-cadherinů (1,2). V mezodermu delaminované prekurzorové buňky migrují dorzálním směrem a usídlují se ve formující bazální vrstvě epidermis, dermis a vyvíjejících se vlasových folikulech, kde diferencují a dávají vznik melanocytům (3–5). Poměrně zásadní roli v celém procesu hraje signalizace Wnt, která indukuje a stabilizuje delaminované prekurzory neurální lišty a spolupodílí se i na samotné delaminaci těchto prekurzorů, jejich migraci a následné diferenciaci v cílových orgánech (6).

Hlavním produktem melanocytů je pigment melanin, který významně přispívá k fotoprotekci kůže. Melanocyty primárně nacházíme v kůži, resp. v bazální vrstvě epidermis a v dermis. Dále jsou melanocyty přítomny v oblasti vlasového bulbu, kde je produkce melaninu zásadní pro barvu vlasů a ochlupení. Nachází se i v oblasti zesílení zevní epitelové vrstvy folikulu označované jako *bulge* (7). Obrázek 1. znázorňuje vlasový folikul a uložení melanocytů. Melanocyty se dále nacházejí primárně i v cévnatce a duhovce oka. Lze je prokázat i ve vnitřním uchu, kde jejich význam a přítomnost je hůře vysvětlitelná (možný vliv k ochraně struktur vnitřního ucha a sluchu před poškozením hlukem, jejich vliv na stimulace vestibulárního orgánu je obtížně prokazatelný) (8–10). Pro studium melanomu je v kontextu této práce důležitá znalost melanocytů nacházejících se v kůži a vlasovém folikulu. Vzhledem k anatomickému rozložení melanocytů ve vlasovém folikulu je zřejmé, že funkce dvou existujících populací je zcela rozdílná. Nachází se zde převážně již diferencované melanocyty v oblasti matrix vlasového bulbu, které podmiňují barevnost vlasů a ochlupení (Obr. 1) (9). Jsou zde i melanocyty (melanoblasty) s charakteristikami až kmenových buněk v oblasti *bulge*

vlasového folikulu (v oblasti zesílení zevní epitelové vrstvy při úponu *m. arrector pilorum*). Tyto prekursorové melanocyty se aktivují během anagenní fáze cyklu vlasového folikulu a slouží k obnově diferencovaných melanocytů v oblasti matrix vlasového bulbu a podílí se tak na udržování homeostázy těchto tkání (Obr. 1) (7,9,11,12).



Obr. 1.: Schéma vlasového folikulu a fyziologická lokalizace melanocytů.

1.2.Funkce melanocytů, udržování homeostázy

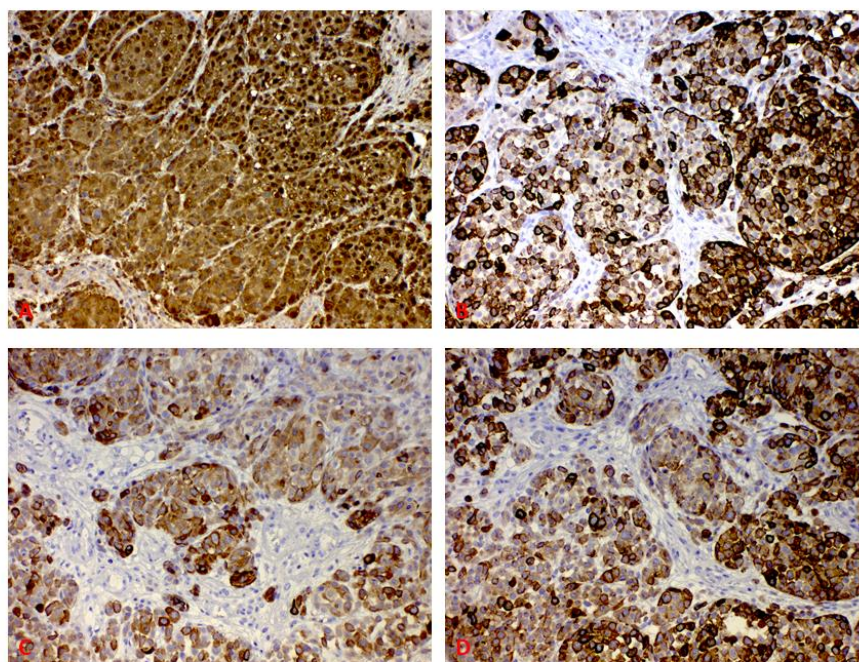
Nejlépe se melanocyty dají odlišit od okolních buněk v elektronovém mikroskopu, kde je poznáme podle velkého jádra, přítomnosti homogenních granul, resp. melanozomů v cytoplasmě a také podle typických dendritických výběžků. Melanin je syntetizován z tyrozinu pomocí enzymu tyrozinázy (13). Syntetizovaný melanin je ukládán ve specializovaných organelách melanozomech, které jsou posléze prostřednictvím dendritických výběžků transportovány mezi okolní keratinocyty v epidermis a ve vlasovém folikulu a to keratinocytům vlasového bulbu (9). Samotný mechanismus předávání melanozomů okolním keratinocytům není zcela objasněn. Jedním z možných mechanismů je proces podobný fagocytóze, kdy keratinocyty jsou schopny pohltit odlomené koncové části dendritů melanocytů s melanozomy. Jiný mechanismus popisuje příjem vypuzených melanozomů exocytózou (14,15). Melanocyt takto zásobuje

pigmentem v průměru 36 keratinocytů a tvoří tzv. epidermální melanocytární jednotku (16,17). Počet melanocytů se liší dle anatomické lokality, ale i mezi různými jedinci a rasami (v průměru asi 1200/mm²) (18). Rasové rozdíly v pigmentaci kůže neodráží jen rozdílné zastoupení melanocytů, ale i základní aktivitu v syntéze melaninu. Samotná produkce melaninu a jeho transport do keratinocytů je významným protektivním faktorem k ochraně pokožky před ultrafialovým zářením (dále jako UV záření, anglicky: Ultra Violet radiation). Produkce melaninu a samotná epidermální melanocytární jednotka hraje významnou roli v ochraně keratinocytů před epigenetickými změnami UV záření. Navzdory této klíčové roli melanocytů v ochraně kůže před UV zářením je známo o epigenetických změnách normálních melanocytů v kůži vystavené chronickému slunečnímu záření relativně málo. Některé genetické studie poukazují na řadu různých mutací v kůži chronicky poškozené UV zářením. I když je většina těchto epigeneticky vzniklých mutací lokalizována do keratinocytů, předpokládá se, že i jednotlivé nativní melanocyty mohou být zatíženy vysokým počtem mutací, aniž by to představovalo zásadní změnu pro syntézu melaninu. V kůži z akrální lokalizace byly pomocí genové amplifikace (zejména cyclin D1) detekovány v melanocytech podobné genetické mutace a změny jako v akrolentiginózních melanomech (dále jako ALM, anglicky: Acral Lentiginous Melanoma) (19). Je zajímavé, že podobné genetické mutace v benigních névech jsou shodné s těmi u melanomu, aniž by přímo vysvětlily patogenezi vzniku melanomu (20).

Melanocytární névy jsou benigní klonální proliferace melanocytů, které jsou ve stavu buněčné senescence. Jedná se o nejčastější benigní nádory v populaci a lze je klasifikovat do několika podtypů na základě jejich klinických, ale i patologických charakteristik. V základu rozlišujeme kongenitální a získané névy. Nejčastější je běžně získaný névus (junkční, smíšený a intradermální). Mezi různými podtypy névů jsou pozorovány epidemiologické i biologické rozdíly. Současná genomická data ukazují, že névy jsou trvale charakterizovány nižším mutačním zatížením než melanom (20). Nicméně řada studií s využitím celogenomového sekvenování ukazuje, že nejčastější somatické mutace v melanocytárních névech představují mutace genů BRAF V600E nebo NRAS Q61R/L, bez přítomnosti jiných somatických změn. NRAS mutace je častěji pozorována v kongenitálních névech s předpokladem vzniku při vývoji jedince *in utero*. BRAF mutace je častější v získaných névech, a to překvapivě až v 83% (20,21). Vzácnější typy névů např. névus coreuleus (modrý névus), névus Spitzové postrádají významnější chromozomální aberace. U některých névů Spitzové na horních končetinách

byly popsány mutace chromozomu 11p a HRAS mutace, což je pro melanocytární patologii spíše atypický nález (22,23). V některých případech u těchto névů jsou typičtější translokace fúzních genů ALK1, ROS1, RET, MET a NTRK. Jak je uvedeno výše, mutace BRAF a NRAS jsou typické a klíčové u řady melanomů, nicméně na rozdíl od melanomů, které získávají další řídicí patologické mutace (*driver mutation*), névy mají zachovanou tendenci k potlačení replikační aktivity a replikačního stárnutí, které je regulováno tumor-supresorovým genem CDKN₂A (Inhibitor 2A cyklin dependetní kinázy) prostřednictvím proteinu p16, ale i dalšími kontrolními buněčnými mechanismy (22).

Pro samotnou detekci melanocytů jsou vhodnější rozšířené barvicí techniky, protože jen základní technikou barvení (hematoxylin-eozin, *H&E*) se melanocyty od okolních keratinocytů odlišují obtížně. Z rozšířených histologických technik se nejvíce rutině využívá barvení podle Fontana-Massona (metodika popsána v monografii (24)). V imunohistochemickém značení lze použít nejrůznější protilátky. Nejběžněji se používá anti S-100 (S-100B) patřící mezi proteiny vážící vápník, jde ale o znak společný pro mnoho buněčných typů pocházejících z neurální lišty. Specificita tohoto znaku je tedy nízká, jakkoli je jeho výhodou vysoká senzitivita. Specifičtější protilátky jsou např. HMB-45, protilátka proti glykoproteinu PMEL 17, který je součástí membrány melanosomů, nebo Melan-A vážící se na proteiny matrix melanosomů (označován jako MART-1, melanosomal matrix proteins). K běžné detekci lze využít i protilátku proti tyrozináze, klíčovému enzymu v biosyntéze melaninu – Obr. 2 (25).



Obr. 2.: Imunohistochemické vyšetření primárního melanomu kůže zad. Muž 48 let, Breslow 1,2, Clark IV. A) vyšetření S100 – pozitivita v cytoplasmě, jádrech a jadérkách melanomových buněk; B) vyšetření HMB45 – cytoplazmatická pozitivita; C) vyšetření tyrozináza - pozitivita v cytoplasmě nádorových melanocytů; D) vyšetření Melan-A/MART-1 pozitivita v cytoplasmě nádorových melanocytů.

1.3.Melanomogeneze, od neurální lišty po melanom

V nádorové biologii lze hledat i paralelu v mechanismech a signálních molekulách, které se uplatňují ve vývojové biologii zdravých tkání. Mechanismy, které se na těchto fyziologických a patologických procesech podílejí jsou svým způsobem uniformní, liší se spíše aktivací v jednotlivých procesech a kontextem dané tkáně a stavu. Jak bylo zmíněno v předchozí kapitole, při uzavěru neurálních valů se delaminují buněčné populace melanocytárních prekursorů, které migrují dorzálním směrem podél somitů a podstupují EMT. Tento proces (EMT) lze pozorovat i při progresi nádorových buněk a dle některých autorů je to jeden z mechanismů, jak mohou vznikat i nádorově asociované fibroblasty (dále jako CAFs,anglicky: Cancer Associated Fibroblasts) (26,27). Význam embryonálního prostředí a nádorové biologie podporují práce, které studují nádorové melanocyty po jejich implantaci do oblasti neurální lišty vyvíjejícího se kuřecího či myšího embrya. Po implantaci nádorových melanocytů dochází v průběhu

dalšího vývoje embrya k migraci těchto nádorových buněk do cílových oblastí derivátů neurální lišty. V důsledku embryonálního mikroprostředí dochází k reprogramování nádorových buněk, které navíc ztrácí svůj maligní potenciál (28–30). I když tyto animální modely mají své limity, lze je využít ke studiu faktorů embryonálního mikroprostředí a jejich paralelu využít při studiu nádorových buněk a nádorového mikroprostředí.

Podobnost nádorových melanocytů s buňkami neurální lišty dokazuje i exprese znaků důležitých pro vývoj a diferenciaci buněk neurální lišty, resp. CD271 (označován i jako NGFR, anglicky: Nerve Growth Factor Receptor) u nádorových melanocytů (31). Exprese CD271 může u zdravých i nádorových melanocytů ovlivňovat podíl buněk, které procházejí buněčnou diferenciací, proliferací, senescencí a apoptózou v závislosti na okolních faktorech (32). Exprese CD271 je spojena i se znaky nádorových kmenových buněk a schopností plastických změn fenotypu vzhledem k podmínkám v nádorovém mikroprostředí melanomu (33,34). V dalších pozorováních byla prokázána i jeho zvýšená exprese u pacientů s metastatickým postižením a celkově horší prognózou (35). V experimentálním *in vitro* modelování se ukazuje, že exprese kmenových znaků jako je Oct4 a Nanog může být spojena se zvýšenou motilitou a invazivitou melanomových buněk. Tato exprese může být navozena vystavením melanomových buněk vlivu kultivačního prostředí, určeného pro buňky neurální lišty a neadhezivnímu prostředí (36,37). Další studie prokázala významnou plasticitu melanomových buněk pod vlivem kultivačního média obohaceného o kuřecí embryonální extrakt či kondiciovaného média z lidských embryonálních buněk. Tato kultivační média byla následně schopna navodit expresi melanocytárních markerů HMB-45, Melan-A a Tyrozinázy v melanomových buňkách, které za normálních podmínek tuto expresi nevykazovaly (38). Tyto experimentální práce ukazují na plasticitu nádorových melanocytů a jejich schopnost měnit expresi a tím i fenotyp v závislosti na podmínkách mikroprostředí. Tato schopnost (měnit svůj fenotyp) může napomáhat nádorovým buňkám v úniku např. před mechanismy imunitního systému.

Expresi Sox-9 se podílí na vývoji neurální trubice a jejích derivátů včetně melanocytů a je jedním z transkripčních faktorů, který řídí delaminaci melanocytárních prekurzorů při uzávěru neurálních valů. Jeho role byla dokázána i u melanomu průkazem poměrně stabilní exprese Sox-9 (cca 84 % pozitivních melanomů), a to i v nádorech, které byly pro ostatní rutinní markery negativní (S100, HMB45, Melan-A). Do běžné praxe vyšetřování melanocytární patologie bylo ale zavedeno stanovení exprese Sox-10, které má vyšší senzitivitu a specifitu (39–41). Vedle transkripčního faktoru Sox-9 je v procesu

delaminace významná signalizace Wnt/ β -kateninu a signalizace kostního morfogenického proteinu (dále jako BMP, anglicky: Bone Morphogenetic Protein), které se podílejí na indukci EMT a usnadňují delaminaci melanocytárních prekurzorů. Úloha β -kateninu je známá i u melanomu, kde se ukazuje, že signalizace Wnt/ β -katenin je analogicky důležitá pro indukci EMT a invazivního fenotypu metastatických buněk melanomu. Expresi β -kateninu lze prokázat v oblasti invazivní nádorové fronty a exprese Wnt3a koreluje s horším celkovým přežitím u pacientů s melanomem. Blokáce této signalizace je jedním z potencionálních cílů hledání nových terapeutik (42).

Problematika kmenových buněk neurální lišty zahrnuje i studium biologie vlasového folikulu, a to zejména melanocytů v jeho *bulge*. Vedle epidermálních kmenových buněk se zde nachází i prekurzory melanocytů a dle některých autorů i dospělé kmenové buňky neurální lišty, které lze po izolaci v *in vitro* modelování dále diferencovat v neuronální buňky, myofibroblasty či Schwannovy buňky (43). Vzájemné působení progenitorových buněk v oblasti *bulge* vlasového folikulu poukazuje i na vzájemné působení jednotlivých buněčných populací v nádorovém mikroprostředí (44). *In vitro* modelováním bylo navíc prokázáno, že nádorové melanocyty, stejně jako dospělé (epidermální) kmenové buňky, dovedou ovlivnit diferenciaci keratinocytů na úrovni exprese specifických keratinů (Keratin 14 a 19) a navodit v nich i EMT. Jako molekuly odpovědné za tento efekt byly identifikovány interleukin-8 (dále jako IL-8, anglicky: Interleukin-8), chemokin (C-X-Cmotif) ligand 1 (dále jako CXCL-1, anglicky: Chemokine (C-X-C motif) Ligand 1), vaskulární endotelový růstový faktor A (dále jako VEGF, anglicky: Vascular Endothelial Growth Factor) a fibroblastový růstový faktor 2 (dále jako FGF, anglicky: Fibroblast Growth Factor) (45). Tyto poznatky ukazují na podobnost kmenových buněk neurální lišty a melanomu a podporují význam studia embryonálních mechanismů při vývoji neurální trubice a jejich derivátů.

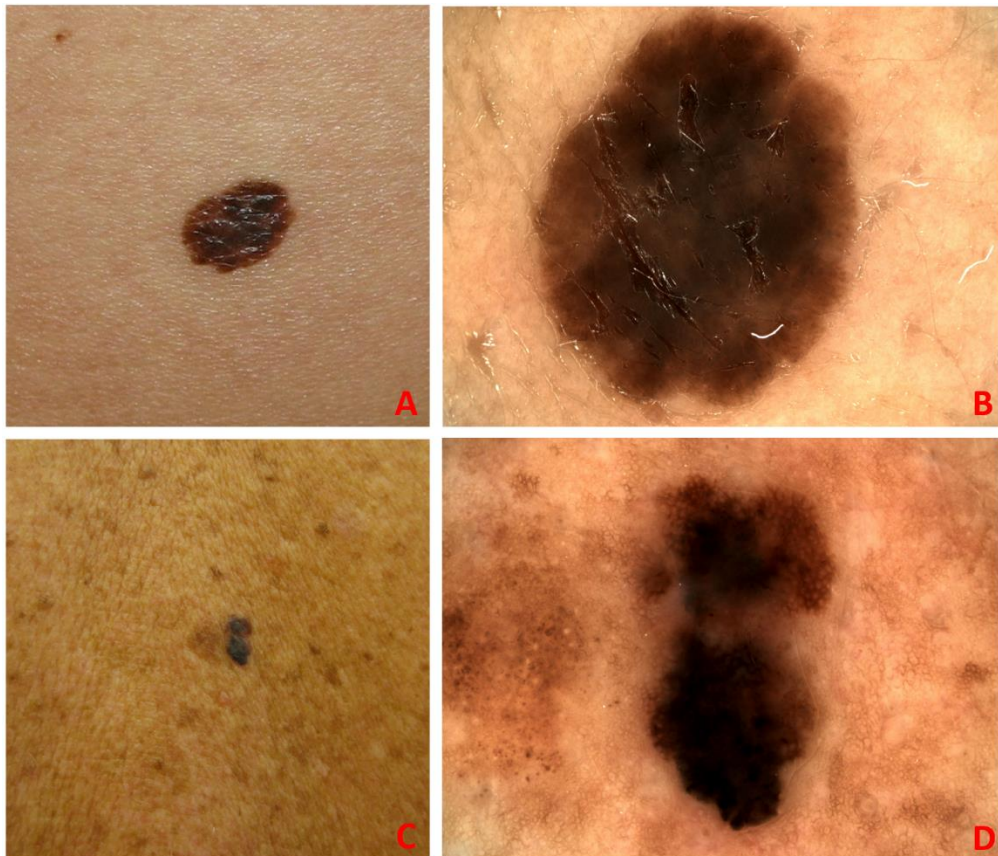
2. Melanom, klinické varianty, rizikové faktory, incidence

Melanom představuje poměrně rozmanitou skupinu klinických, ale i histopatologických variant, které sice mají stejnou histogenezi, ale vykazují výrazné rozdíly v biologickém chování a klinickém vzhledu. Již anatomická lokalita projevu na kožním povrchu představuje dvě varianty a to melanom v solární lokalizaci a bez souvislosti s chronickým solárním poškozením kůže (40,41). Samostatnou variantou,

kteřá v této práci není diskutována, je uveální melanom, který i histogeneticky představuje odlišnou variantu onemocnění. Základní klinické varianty představuje superficiálně (povrchově) se šířící melanom (dále jako SSM, anglicky: Superficial Spreading Melanoma) lentigo maligna melanom (dále jako LMM, anglicky: Lentigo Malignant Melanoma), nodulární melanom (dále jako NM, anglicky: Nodular Melanoma) a ALM (46).

2.1. Klinické varianty

Nejčastější variantou melanomu je SSM, který nacházíme až v 70 % případů a vyznačuje se horizontálním šířením nádorových melanocytů (Obr. 3). Může dosahovat velikosti od několika milimetrů až po několik centimetrů a jeho růst trvá pozvolna i několik let.



Obr. 3: Klinické makroskopické a dermatoskopické snímky SSM. A - SSM Breslow 0,8; B - dermatoskopicky patrná nehomogenní pigmentace s akcentací pigmentové sítě v horním okraji projevu. C SSM Breslow 0,6; D asymetricky pigmentovaná léze, s akcentací pigmentové sítě, která je v dolním okraji výrazně setřelá.

V některých případech nacházíme plošné léze s okrskem nodulární komponenty, ve které se nachází již vertikální šíření nádorových melanocytů. Poté lézi popisujeme dle klinického vzhledu jako sekundárně nodulární superficiálně se šíří melanom (dále jako SNSSM, anglicky: Secondary Nodular Superficial Spreading Melanoma. Obr. 4 C, D), i když tato varianta není pevně ukotvena ve WHO klasifikaci melanomu (47).



Obr. 4: A NM Breslow 4,8 zad; B dermatoskopicky patrný nodulus v jeho okraji výrazně pigmentovaný lem se setřelou pigmentovou sítí. C SNSSM Breslow 3,1 hrudníku. D dermatoskopicky patrna centrální nodulární výrazně pigmentovaná část, v okrajích světlejší lem odpovídající SSM komponentě projevu.

Obdobné změny a charakteristiky jako u SSM lze najít i u LMM, jehož predilekce se nachází typicky v solární lokalizaci obličeje, dekoltu, či na dorzech rukou u pacientů vyšší věkové kategorie (Obr. 5). Tato varianta představuje asi 10 % všech kožních

melanomů. Tyto léze zpravidla dosahují až několika centimetrů v průměru a většinou anamnesticky zjišťujeme pozvolný růst a mnohaleté trvání.



Obr. 5: LMM Breslow 0,2, pravé tváře, nepravidelná, asymetricky pigmentovaná léze s nehomogenní pigmentací.

NM představuje 20 % kožních melanomů (Obr. 4 A, B). Jedná se o rizikovější variantu kožního melanomu, která se vyznačuje již primárně vertikálním šířením nádorových melanocytů a navíc mnohdy poměrně rychlým růstem. ALM zahrnuje NM nebo SSM v akrální lokalizaci na dlaních, ploskách nebo pod nehtovým lůžkem (cca do 5 % všech melanomů, Obr. 6). Prognosticky je tento typ velice rizikový a vzhledem k atypické lokalizaci je často diagnostikován až v pokročilém stadiu onemocnění, kdy nelze vyloučit generalizaci onemocnění. Samostatnou klinickou variantou je amelanotický melanom, který může být jak plošný (makulózní, charakteru SSM), tak nodulární, necharakteristický, někdy až macerovaný, krvácející, se zánětlivým lemem okolí a bohatou diferenciální diagnózou. Tyto léze mohou imitovat zhoubné léze v podobě epitelových kožních nádorů, sarkomů, hemangiomů, nebo jen benigní epitelové léze jako je např. seborhoická keratóza. Další variantou je i desmoplastický melanom (dále jako DM, anglicky: Desmoplastic Melanoma) s typickým myxomatózním stromatem, který se nachází nejčastěji na hlavě případně na krku (Tab. 1).



Obr. 6: A - ALM s destrukcí nehtové ploténky, B - ALM v oblasti paty, C - ALM na zevní hraně paty a kotníku, D - dermatoskopický obraz (nálezu obr.6, C) s nepravidelnou pigmentací s nepravidelnou sítí v okrajích. V centru patrný nepravidelné pigmentové globule.

Tabulka 1.: Klinické podtypy melanomu, četnost, věkové rozložení a nejčastější lokalita (51).

	SSM	NM	LMM	ALM	DM
Četnost	60-70%	10-20%	5-10%	< 5%	< 5%
Lokalizace	Trup, končetiny	Kdekoliv	Obličej, horní polovina trupu, dorza rukou	Akrální lokalita	Hlava, krk
Věk (medián)	45 let (60 % případů)	50 let	Nad 60 let	40 let	60 let

Slizniční melanom představuje vzácnější variantu (1-2 %), která vzhledem k atypické lokalizaci a obtížnému vyšetření je diagnostikována často až v pozdním stádiu s nepříznivou prognózou. Jednotlivé klinické varianty se liší i přítomností somatických mutací. Pro slizniční a ALM je typická mutace v genu c-KIT, která představuje asi jen 2 - 4 % somatických mutací melanomu v bělošské populaci (10 % u Asiatů), ale u slizničních a ALM se nachází asi ve 20 % případů (19,48–50). Samostatnou klinickou i histopatologickou variantou je melanom v solární lokalizaci. Může se jednat o předchozí popsané klinické varianty (LMM, SSM, NM), ale navíc v místech kůže s chronickým UV poškozením, které je patrné při klinickém i histopatologickém vyšetření (41).

2.2. Rizikové faktory

Rizikové faktory, které se podílejí na vzniku melanomu, jsou následující: genetické, environmentální a fenotyp jedince. Odhaduje se, že asi 10 % melanomů může mít familiární výskyt s přítomnou hereditární patogenní mutací. Vzhledem ke značné genetické heterogenitě mezi různými rodinami může jít v patogenezi o zapojení většího počtu genů, které se na vzniku melanomu podílejí. Samotný termín tzv. familiárního melanomu je spojen především s autozomálně dominantní formou dědičnosti a přítomnou germinální mutací genů CDKN_{2A} nebo CDK₄ (52–54). CDKN_{2A} je tumor supresorový gen, který je lokalizovaný na chromozomu 9 (lokus 9p21). Jedná se o druhý nejčastěji mutovaný gen v nádorové biologii. Vedle melanomu lze tuto mutaci najít u některých lymfomů gastrointestinálního traktu, Burkittova lymfomu, u nádorů hlavy a krku, adenokarcinomu pankreatu, nemalobuněčného karcinomu plic a karcinomů zažívacího traktu či ovariálního karcinomu. Tento gen kóduje protein p16 a p14^{arf}, které se podílejí na regulaci buněčného cyklu (55). Gen CDK₄ kóduje serin/threoninovou kinázu, která se uplatňuje ve fázi G₁ buněčného cyklu. Aktivita této kinázy je omezena na fázi G₁-S, která je řízena regulačními podjednotkami cyklin dependentních kináz typu D a inhibitorem CDK p16^{INK4a}. Ukázalo se, že tato serin/threoninová kináza je odpovědná za fosforylaci proteinu genu retinoblastomu (Rb), jehož mutace se v biologii melanomu také uplatňuje (54). Další rizikové geny představují mutace v BAP1 genu (BRCA1 asociovaný protein 1), méně pak mutace BRCA2 genu (56). Další z popsaných mutací představuje mutace pro již zmíněný gen retinoblastom (RB1) a gen pro receptor melanocortin 1 (MC1R). Mutace v MITF (mikroftalmia-asociovaný transkripční faktor) vede k Waardenburgově

syndromu a Tietzově syndromu, u kterých jsou popsány poruchy pigmentace a ztráta vlasů, ale bylo popsáno i větší riziko vzniku melanomu (54,57). Z genetických syndromů s vysokým rizikem vzniku kožních nádorů je nutné zmínit xeroderma pigmentosum. Jedná se o skupinu onemocnění, která jsou podmíněná autosomálně recesivním typem dědičnosti. Rozlišuje se 8 genetických variant s rozdílným genetickým nálezem a místem konkrétní mutace. Postižení mají zásadně porušenou schopnost reparativních genetických funkcí a oprav mutací, obecně označované jako geny „*nucleotide excision repair gene*“ (NER) (58). Frekvence xeroderma pigmentosum v Evropě se odhaduje na 1:2 000 000. Pacienti s tímto postižením mají vysoké riziko nádorů kůže včetně kožního a konjunktiválního melanomu. U více než 22 % pacientů s xeroderma pigmentosum dochází k rozvoji melanomu již okolo 20. roku života (58,59).

Dalším, z do jisté míry geneticky podmíněným rizikovým faktorem je přítomnost melanocytárních névů. Asi v 80 % případů sice melanom vzniká *de novo* na nepostižené kůži, ale asi v 10–20 % (dle některých autorů až 33%) vzniká melanom v souvislosti s již přítomnými získanými nebo atypickými (dysplastickými) névy (20). Melanocytární névy lze rozdělit na kongenitální a získané. V obou případech mohou přinášet určité riziko maligní transformace a vzniku melanomu. Z kongenitálních névů jsou nejrizikovější velké kongenitální névy (tzv. plenkové), kde riziko případné maligní transformace během života je stanoveno až na 10 % (60,61).

Běžné získané névy se začínají objevovat od časného dětství (asi od 6. měsíce) a přibývají postupně do dospělosti (asi do 30 let), s věkem následně ubývají a jsou fibrózně přestavěny. Samotné získané névy (junkční, smíšený a intradermální névus) nepřinášejí větší riziko maligní transformace. Standardně u 30letého pacienta bělošské rasy nacházíme v průměru okolo 20–40 získaných melanocytárních névů bez většího populačního rizika vzniku melanomu. U pacienta s více než 100 melanocytárními névy je však riziko melanomu až sedminásobné (62). Riziko se odhaduje na 1 případ z 200 tis. pacientů mladších 40 let. U starších pacientů nad 60 let je riziko matematicky vyjádřeno již na 1 případ z 33 tis. pacientů (62). Tyto práce poté poukazují na další rizikový faktor, a to na věk pacienta. Vznik nového melanocytárního névu po 60. roce věku by měl být vždy vyšetřen a hodnocen s ohledem a diferenciativně diagnostickým důrazem na vznik melanomu.

Další skupinou melanocytárních névů jsou dysplastické neboli atypické névy, které mají daleko vyšší riziko vzniku melanomu. Dysplastické névy se vyskytují nejčastěji u mladších dospělých, ve třetím a čtvrtém deceniu, ale mohou se postupně

objevovat již od dětství nebo od období puberty. Přítomnost 10 a více dysplastických névů je spojena až s 12násobným rizikem vzniku melanomu. Výskyt dysplastických névů v populaci je okolo 4 %, u pacientů s melanomem se pohybuje okolo 34–59 %, což opět dokazuje význam a nutnost pečlivé dispenzarizace pacientů s těmito typy pigmentových névů (63). U dysplastických névů jsou časté i genetické abnormality a četné polymorfismy. U familiární varianty, tzv. syndromu dysplastických névů, je popsána autozomálně dominantní forma dědičnosti s mutací *CDKN2A* genu, který je současně mutován i u familiárního melanomu (64). Některé studie poukazují na další četné genetické alterace mezi získanými névy, dysplastickými névy a melanomem. Vedle přítomné somatické mutace *BRAF* genu (až v 83 % benigních melanocytárních névů) je asi v 65 % často patrná mutace/delece genu proteinu p16 a aberantní exprese p53 (20,64).

Z rizikových faktorů pro rozvoj melanomu má poměrně velký význam i fenotyp jedince. Nejvíce riziková jsou pacienti se světlým fototypem kůže (fototyp I a II), kteří se buď prakticky nikdy neopálí, nebo pigmentaci kůže po vystavené UV záření předchází výrazný erytém. Dále jsou v rámci fenotypu riziková pacienti se světlou barvou vlasů (blond či zrzavé zbarvení), jedinci s četnými *efelides* a světlou barvou očí (zelenou, modrou) (65).

Pro vznik melanomu je z environmentálních vlivů zásadní UV záření. Pobyt v zemích s větší intenzitou slunečního záření (tropy a subtropy) trvající déle než dva týdny, bez dostatečné fotoprotekce je považován jako významný rizikový faktor, který se v budoucnu může podílet na aktinickém poškození kůže se vznikem kožních nádorů. Nejvíce rizikové může být opakované spálení sluncem (*sunburn*), spálení v dětském věku (do 12 let věku), zejména pak do vzniku bolestivých puchýřů, a spálení kůže u osob s nízkým fototypem I a II. Jako jeden z nejrizikovějších faktorů je považována neodborná aplikace arteficiálních zdrojů UV záření, jako jsou např. solária. Dále pak může být riziková i terapeutická aplikace arteficiálních zdrojů UV záření (UVA, nebo v rámci tzv. PUVA terapie – fotochemoterapie, se současným podáním UVA a psoralenů) v rámci fototerapie, i když je dávka záření přesně kontrolována a je dodržována kumulativní dávka pro jedince (66).

Vzhledem k tomu, že UV záření je jedním z hlavních rizikových faktorů u melanomu, měl by tedy být největší výskyt melanomu u lidí profesně pravidelně vystavených slunečnímu záření, jako jsou např. zemědělci, dělníci či kopáči. Je ale prokázáno, že intermitentní sluneční záření (jednorázové spálení, neadekvátní sezónní opalování bez dostatečné UV ochrany) zvyšuje riziko vzniku melanomu daleko více než

kumulativní sluneční záření (četné chronické vystavení UV záření) (67). Z dalších rizikových faktorů se uvádí imunosuprese, HIV infekce, nádorová onemocnění v dětském věku s následnou aktinoterapií a nutností dlouhodobé imunosuprese (68).

2.3.Incidence a mortalita

Incidence melanomu se v České republice za posledních 40 let více jak zšestinásobila. V roce 1977 dosahovala incidence počtu 4,9 případů na 100 tis obyvatel s mortalitou 0,44/100 tis. obyvatel. V současné době je incidence melanomu v České republice poslední tři roky (2015-2017) relativně ustálena a dosahuje se na 32,26/100 tis. obyvatel (započítány i případy melanom *in situ* lézí; C.43, D.03) (ÚZIS; 2021, data z 2018). Samotná mortalita je však relativně stabilní posledních 30 let a pohybuje se okolo 4 případů na 100 tis. obyvatel (3,48 - 1990; 4,3 – 2018, UZIS; 2021, data z 2018)). Navzdory změnám v TNM klasifikaci lze usuzovat, že se zlepšenou diagnostikou, prevencí a dostupností odborné lékařské péče jsou v současné době diagnostikovány především melanomy v časnějších stádiích, s relativně příznivou prognózou a procento rizikových případů pravděpodobně výrazněji nestoupá. Dalším faktorem může být i zavedení nových léčebných možností, které navzdory zvyšující se incidenci udržují mortalitu nadále stabilní. Při srovnání světového nebo Evropského měřítka se Česká republika pohybuje na hranici první desítky s obdobnou incidencí jako v Německu nebo Velké Británii (69). Tyto statistické údaje mohou dokazovat obdobný genetický původ těchto národů a působení podobných environmentálních vlivů, jako je UV záření ve stejné zeměpisné šířce.

3. Terapie melanomu

Pro diagnostiku, terapii a následnou dispenzarizaci melanomu je zcela zásadní histopatologické vyšetření se stanovením hodnoty Breslowa a zhodnocení přítomné povrchové ulcerace melanomu (46). Hodnota dle Breslowa je histopatologická klasifikace, resp. měření invazivního růstu nádorových buněk od *stratum granulosum* epidermis do místa nejhlubší invaze nádorových melanocytů udávané v milimetrech. Tato klasifikace se používá od 70. let minulého století a představuje poměrně snadný a především poměrně přesný biomarker s možností stratifikace jednotlivých nálezů a následnou možností základní predikce onemocnění (70). Samotné stanovení Breslowa je

v současné době nenahraditelným biomarkerem „stagingu“ TNM klasifikace onemocnění, podle kterého se s dalšími nálezy odvíjí stanovení následné léčby a dispenzární péče pacienta (46,48). Další význam histopatologického stanovení hodnoty Breslowa je i pro základní léčbu melanomu a tou je, navzdory řadě pokroků v terapeutických postupech, chirurgická radikální excize (71).

3.1.Chirurgická léčba melanomu

Navzdory velkým pokrokům v léčbě metastazujícího melanomu a poznatkům v nádorové biologii melanomu je základní léčbou primárního kožního melanomu nadále chirurgická excize s dostatečným bezpečnostním lemem do zdravé tkáně. Původně doporučované vysoce radikální a často mutilující zákroky (až 10 cm do zdravé tkáně) byly nahrazeny excizemi s užším lemem zdravé tkáně. Radikalita excize odpovídá klinicky předpokládanému typu nádoru a jeho možné invazivitě. Právě stanovení hodnoty Breslowa nám poměrně jednoduchým způsobem ukazuje na míru chirurgické radikality v daném případě (Tab. 2). Některé anatomické lokality vyžadují individualizované postupy a neumožňují plnou radikalitu výkonu a dodržení dostatečného radikálního přístupu přináší poté mnohem náročnější chirurgické přístupy. Při excizích SSM na obličeji je za dostatečný považován i 0,5-1 cm široký lem. Naopak u ALM jsou relativně časté lokální recidivy, a tak jsou doporučovány lemy více radikální, ke 2 cm, u subunguálních melanomů zajišťuje radikalitu výkonu amputace prstu nebo alespoň distálního článku (72). Podezřelé, nejednoznačné léze mají být excidovány kompletně neradikálně a teprve v případě potvrzení diagnózy melanomu následuje excize jizvy s odpovídajícím lemem do zdravé tkáně, která se řídí dle histologického stanovení hodnoty Breslowa (Tab. 2). Definitivní radikální chirurgický zákrok by měl být proveden nejpозději v odstupu 4 – 6 týdnů od primární excize (51).

Tabulka 2.: Klinické stadium melanomu dle hodnoty Breslowa se zhodnocením 10 letého přežití a doporučeným chirurgickým lemem (46,51).

Klinické stadium	Hodnota Breslowa	10leté přežití	Doporučený chir.lem
I (T1a-T1b)	≤ 1 mm	98 - 96 %	5-10 mm
II (T2a-T2b)	1,01 – 2 mm	92 - 88 %	15 mm
III (T3a-T3b)	2,01 – 4 mm	88 - 81 %	20 mm
IV (T4a-T4b)	≥ 4,01 mm	83 - 75 %	20 mm

V 80. letech min. století byl do chirurgické léčby melanomu, kromě samotného odstranění primárního nádoru, zaveden vyšetřovací postup mapování a biopsie (resp. exstirpace) sentinelové uzliny (dále jako SLN, anglicky: Sentinel Lymph Node) (73). Vyšetření SLN podává další informaci ohledně *stagingu* onemocnění a doplňuje další prognostické údaje (46). Mapování (pomocí technik nukleární medicíny) a exstirpace SLN v současné době provádí většina pracovišť specializujících se na tuto problematiku u pacientů od stadia IB (T1b – melanom Breslow 0,8-1,0 bez ulcerace, melanom Breslow do 1,0 s ulcerací nebo Breslow 1,1-2,0 bez ulcerace, dle AJCC 8. vydání) (71). Mapování a následná exstirpace SLN je určena pro pacienty, kteří nemají klinické ani sonografické známky makroskopického postižení lymfatických uzlin. Dlouhodobě je význam mapování SLN diskutován a byly publikovány práce, které poukazují na limity tohoto postupu a zejména pak provádění radikálnějších výkonů. V případě zachycení metastázy v SLN byla standardně indikována radikální exenterace (disekce) spádové lymfatické oblasti, i když v tomto případě se v současné době postupuje individuálně. Výsledky studie MSLT-I a II ukázaly, že pacienti se střední tloušťkou melanomu (zde definována jako Breslow 1,2-3,5 mm), kteří podstoupili širokou excizi a mapování SLN a v případě její positivity i radikální exenteraci, neměli signifikantní prodloužení intervalu celkového přežití oproti pacientům, kteří podstoupili pouze širokou excizi primárního ložiska a teprve při klinicky manifestovaném postižení uzlin podstoupili radikální exenteraci (73,74).

Exenterace spádové lymfatické oblasti se provádí zpravidla při pozitivitě SLN, jak mikroskopické, tak primárně při makroskopicky detekovaném uzlinovém postižení. Provedení exenterace je pro pacienta poměrně značně zatěžující výkon, který je předmětem řady diskuzí, vzhledem k dostupným retrospektivním studiím. Ve studii MSLT-II byl zhodnocen prognostický význam provedené regionální (spádové) exenterace při pozitivitě SLN. Do studie bylo zařazeno 1934 pacientů se sledováním 3 let. Výsledkem studie bylo prokázané snížení možných lokálních recidiv a dosažení zlepšené kontroly nad onemocněním u pacientů, kde byla provedena radikální exenterace, ve srovnání s pouhou exstirpací SLN. Zásadním výsledkem této studie je však fakt, že nedojde k signifikantnímu ovlivnění dlouhodobého přežití pacientů, u kterých byla provedena radikální exenterace než jen exstirpace SLN (73,75,76). Konečná indikace k provedení radikální exenterace vzhledem k možným komplikacím (lymfedém, protražované hojení *per secundam*, hemoragie, tvorba seromu, reverzibilní i trvalé

poruchy čítí a motoriky) může být individualizována. Případné snížení lokálního relapsu onemocnění je nezanedbatelným faktorem pro pacienta. Chirurgický přístup je možný i u pacientů s metastatickým postižením. Pokud lze metastatické postižení řešit radikálním chirurgickým přístupem, měl by tento výkon být proveden (71,72). I v těchto případech je nutné opět myslet na možné komplikace z mnohdy obtížných a náročných chirurgických přístupů.

3.2. Adjuvantní terapie melanomu

Adjuvantní terapie je forma léčby, která zpravidla navazuje na primární radikální chirurgický výkon. Jedná se o léčbu reziduálního nádorového onemocnění a mikrometastáz, které nejsme v současné době schopni detekovat, ale pro pacienta představují možnost časně recidivy onemocnění. V případě melanomu jsou k adjuvantní léčbě indikováni pacienti s pokročilým primárním kožním melanomem od klinického stadia II. Zásadním cílem adjuvantní léčby je prodloužení jak celkového přežití (dále jako OS, anglicky: Overall Survival), tak i období do relapsu onemocnění (dále jako RFS, anglicky: Relaps Free Survival) (77). Ještě v roce 2019 byl v České republice standardě používán v adjuvantní terapii melanomu interferon alfa, který se v léčbě melanomu využíval od 80. let minulého století. V současné době již není na trhu pro tuto indikaci, navíc není ani v současných doporučeních pro adjuvantní léčbu, ale vzhledem k používání tohoto léku prakticky 40 let je vhodné zmínit nejzásadnější klinické údaje.

Interferon alfa byl schválen v roce 1995 Americkým úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (dále jako FDA, anglicky: Food and Drug Administration) v USA jako první lék pro adjuvantní terapii melanomu. Navzdory tomu že jednoznačný protinádorový účinek nebyl doposud vysvětlen, lze využít jeho schopnosti zejména imunomodulační. Protinádorový efekt moduluje zvýšenou expresí HLA molekul s tendencí uvolňovat více nádorových neoantigenů. Imunomodulační efekt působí na aktivaci makrofágů a NK buněk. Interferon alfa má i významný cytotoxický i antiproliferativní účinek. Používány byly dva typy interferonu, a to interferon-alfa-2a (IFN-alfa-2a) a interferon-alfa-2b (IFN-alfa-2b), které se prakticky nelišily účinkem ani mírou nežádoucích účinků (78,79). Při hodnocení efektu adjuvatního podání interferonu alfa byla nejzásadnější studie ECOG 1684, kde byl interferon-alfa podáván ve vysokých dávkách 20 MIU (na m²; tzv. vysokodávkové schéma). V této studii se při mediánu sledování 7,5 let prokázalo

statisticky významné prodloužení OS na 3,8 roku oproti 2,8 roku v kontrolní skupině s placebem ($p < 0,05$) (78). Tato studie znamenala doslova průlom v léčbě (minimálně adjuvantní) melanomu a odstartovala plošné využití interferonu alfa především v adjuvantní léčbě melanomu. Další studie EORTC 18952 poukázala na význam hodnocení povrchové ulcerace v primárním melanomu (hodnocení ulcerace je standardní součástí TNM klasifikace). Tato studie porovnávala aplikaci IFN-alfa-2b v dávce 10 MIU s. c. 5x týdně po dobu 4 týdnů, následované udržovací terapií 10 MIU 3x týdně po dobu jednoho roku, nebo 5 MIU 3x týdně po dobu 2 let. Obě tyto skupiny byly porovnány se skupinou pacientů jen na kontrolách bez terapie (bez podávání placeba). Statisticky významného výsledku bylo dosaženo až při dlouhodobém sledování s mediánem 11 let, kdy ve skupině s interferonem alfa po úvodní dávce s následující aplikací v dávce 5MIU 3x týdně po dobu 2 let došlo ke statisticky významnému prodloužení RFS. Zásadní bylo zhodnocení efektu adjuvantní terapie u pacientů s přítomnou povrchovou ulcerací primárního melanomu, u kterých byl efekt terapie nejlepší, navzdory tomu, že samotná ulcerace je jedním z nepříznivých prognostických faktorů (80). V tomto případě může ulcerace navodit příznivé prozánětlivé mikroprostředí melanomu a tím i celého organismu s účinnější aktivací imunitního systému při terapii interferonem alfa. Tento proces může být navíc potencován při uvolnění nádorových neoantigenů v rámci ulcerace nádoru a rozpadu nádorových buněk.

Díky zavedení biologické terapie v léčbě metastazujícího melanomu se otevřel prostor pro využití této léčby i pro potřebu adjuvantní terapie. Do adjuvantní léčby melanomu patří jak tzv. *checkpoint* inhibitory (inhibitory kontrolního bodu), které již plně nahradily terapii interferonem alfa, tak i cílená léčba pomocí BRAF a MEK inhibitorů. Jako *checkpoint* inhibitory označujeme anti-CTLA-4 protilátky a protilátky proti anti-PD-1/PD-L1. Anti-CTLA-4 (ipilimumab) je humánní IgG₁ monoklonální protilátka proti CTLA-4 receptoru T-lymfocytů, která působí na centrální proliferaci T-lymfocytů a stimuluje diverzifikaci receptorů na cirkulujících T-lymfocytech (81). Záhy byly do protinádorové terapie zavedeny protilátky anti-PD-1. Jedná se o humánní IgG₄ monoklonální protilátku nivolumab a humanizovanou IgG₄ monoklonální protilátku pembrolizumab. Receptor PD-1 je inhibičním receptorem T-lymfocytů, specificky se váže na PD-L1 s následnou anergií T-lymfocytů. Vazba PD-1 a PD-L1 vede k inhibici protinádorové imunitní reakce a její blokace může navodit cílenou protinádorovou odpověď (82,83). Předpokládá se efektorová funkce imunitní reakce, která působí na periferii v tkáních s podporou nádor infiltrujiících T-lymfocytů, které jsou odpovědné za

imunitně podmíněnou destrukci nádoru (82). Ipilimumab byl první *checkpoint* inhibitor schválený v roce 2015 FDA pro adjuvantní terapii melanomu, na základě výsledků studie EORTC 18071. Ipilimumab byl v této studii podáván v dávce 10 mg/kg ve čtyřech dávkách každé 3 týdny, následované aplikací každé 3 měsíce po tři roky ve srovnání proti skupině s placebem. V této studii při mediánu sledování 5,3 roku bylo dosaženo signifikantně prodlouženého OS, RFS ale i přežití bez vzniku vzdálených metastáz (dále jako DMFS, anglicky: Distant Metastasis Free Survival). Pro RFS byla (míra rizika [dále jako HR, anglicky: Hazard Ratio] 0,75; 95%, míra spolehlivosti (dále jako CI, anglicky Confidence Interval) 0,63-0,88; $P < 0,001$), pro DMFS (HR 0,76, CI 0,64-0,90; $P = 0,002$) a pro OS (HR 0,73, CI 0,60-0,89; $P = 0,002$). Poměrně nadějně výsledky byly dosaženy navzdory tomu, že 53,3 % pacientů muselo terapii ipilimumabem ukončit pro nežádoucí účinky, a navíc je nutné zmínit, že během studie došlo k 5 úmrtím (1%) v souvislosti s podávanou léčbou, což je u adjuvantní formy léčby vždy kontroverzní (84). Další studie se zaměřily na anti-PD-1 protilátky. Ve studii CheckMate 238, byl srovnán efekt nivolumabu 3 mg/kg oproti ipilimumabu 10 mg/kg. Při minimální délce sledování pacienta 18 měsíců od zahájení terapie bylo dosaženo lepšího RFS ve skupině s nivolumabem (70,5 %) oproti ipilimumabu (60,8 %; $p > 0,001$). Ve skupině s ipilimumabem byla hlášena dvě úmrtí (0,4 %) a toxicita stupně 3-4 byla až 45,9 % oproti nivolumabu se 14,4 % (85). Tato studie ukázala výrazně vyšší toxicitu anti-CTLA-4 než anti-PD-1 protilátek, a naopak jejich výrazně vyšší procento terapeutických odpovědí. Protilátka anti-PD-1 pembrolizumab byla hodnocena ve studii Keynote 054 (EORTC 1325). Pembrolizumab byl podáván v dávce 200 mg každé 3 týdny po dobu jednoho roku oproti placebo. Primární cíl studie RFS při mediánu sledování 15 měsíců byl 75,4 % (95 % CI, 71,3-78,9) oproti placebo 61,0 % (95 % CI, 56,5-65,1) (86). Tyto studie potvrzují imuno-onkologický trend v adjuvantní terapii melanomu. Podávání anti-PD-1 protilátek se stává v České republice standardem léčby nejen metastazujícího melanomu, ale i adjuvantní léčby. Výše zmíněné výsledky jsou poměrně slibné a výrazně překonávají předchozí adjuvantní terapii interferonem alfa. Na celkové hodnocení efektu je však nutné vyčkat na dlouhodobější sledování pacientů.

Vedle imunoterapie je jedním ze základních pilířů léčby metastazujícího melanomu i tzv. cílená terapie pomocí BRAF inhibitorů v kombinaci s MEK inhibitory. Zavedení cílené terapie do adjuvantní péče pacientů s melanomem bylo tedy jen přirozeným vyústěním léčebné strategie. BRAF inhibitory cíleně inhibují mutovaný Braf protein, který je součástí MAP kinázové (mitogen-activated protein kinase) intracelulární

signální dráhy, která odpovídá za buněčnou proliferaci a diferenciaci. Mutovaný BRAF protein tuto dráhu trvale aktivuje (87). Léčba BRAF inhibitory je limitována logicky pouze pro pacienty s přítomnou somatickou mutací genu BRAF V600E a K. V adjuvantní terapii melanomu jsou významné studie BRIM 8 a COMBI-AD. Ve studii BRIM 8 byl porovnáván efekt vemurafenibu (první BRAF inhibitor zavedený do léčby metastazujícího melanomu) proti placebo u BRAF mutovaných melanomů. V první skupině byli zahrnuti pacienti v klinickém stádiu IIC, IIIA a IIIB. Ve druhé skupině byli pacienti ve stádiu IIIC (dle TNM klasifikace 7. vydání). Ve druhé skupině, již vysoce rizikových pacientů, byl dosažen medián přežití bez recidivy onemocnění 23,1 měsíců (95%, CI; 18,6-26,5) oproti placebo s dosaženým mediánem 15,4 měsíců (11,1-35,9), (HR 0,80; 95%, CI 0,54-1,18; p = 0,26) (88). Ve druhé zmíněné studii COMBI-AD byla použita již kombinace BRAF a MEK inhibitorů, která je v současné době standardně používána pro léčbu metastazujícího melanomu, a to dabrafenibu a trametinibu u pacientů s přítomnou mutací BRAF V600E a K v klinickém stádiu III oproti podávanému placebo. Dabrafenib a trametinib byly použity ve standardním dávkování (dabrafenib 150 mg/2xd a trametinib 2 mg/den) po dobu jednoho roku. Při mediánu sledování 2,8 roku bylo dosaženo 3 letého RFS u 58% pacientů na terapii a jen 39 % u pacientů s podávaným placebem (HR pro relaps či úmrtí byl 0,47; 95% CI, 0,39 – 0,58; p < 0,001). Navíc OS v 3letém sledování bylo dosaženo u 86 % pacientů ve skupině na terapii oproti 77 % pacientů jen s placebem (HR 0,57; 95 % CI, 0,42 to 0,79; P = 0.0006) (89). Stejně jako u imunoterapie, je pro jednoznačné zhodnocení nutné vyčkat až dlouhodobého klinického sledování z těchto studií. V současné době je však dle doporučení pro adjuvantní léčbu melanomu preferována imunoterapie anti-PD-1 (71). Přehled současných studií pro adjuvantní léčbu melanomu shrnuje tabulka 3.

Tabulka 3.: Přehled studií adjuvantní terapie melanomu. IPI – ipilimumab, Pem – Pembrolizumab, Nivo – Nivolumab, HD IFN- α 2b – vysokodávkovaný interferon alfa, Vem – Vemurafenib, Dab – Dabrafenib, Tram – Trametinib, HR RFS – míra rizika období do relapsu onemocnění, HR DMFS – míra rizika přežití bez vzniku vzdálených metastáz, HR OS – míra rizika pro celkové přežití. NA – nedosaženo.

Studie	Režim podání	HR RFS	HR DMFS	HR OS
EORTC 18071	IPI 10 mg/kg vs. placebo	0,76	0,76	0,72
EORTC 1325	Pem 200 mg vs. placebo	0,57	0,53	NA
Checkmate 238	IPI 10 mg/kg vs. Nivo 3 mg/kg	0,65	0,73	NA
ECOG 1609	IPI 10 mg/kg vs. IPI 3 mg/kg vs. HD IFN- α 2b	1,0	NA	NA
BRIM 8	Vem vs placebo	0,54-0,8	NA	NA
COMBI-AD	Dab + Tram vs placebo	0,47	0,51	0,57

3.3. Neoadjuvantní terapie melanomu

Oproti jiným nádorům, jako např. karcinomu mléčné žlázy, byla neoadjuvantní terapie v případě melanomu dlouho na okraji zájmu. Až pokroky v léčbě metastatického melanomu s použitím *checkpoint* inhibitorů nabídly možnost použití této terapie v neoadjuvantním režimu. Principem této formy léčby je zmírnit regionální metastatické postižení a zlepšit tak operabilitu a klinické výsledky v průběhu chirurgického zákroku. Následná pokračující adjuvantní terapie může profitovat i z uvolněných nádorových neoantigenů během předchozí redukce nádorové tkáně touto terapií a následného chirurgického výkonu. Pro neoadjuvantní terapii jsou nejvhodnější pacienti s klinicky detekovatelným místně pokročilým melanomem klinického stádia III. U těchto pacientů je případný samotný chirurgický výkon poměrně rizikový a zatížený poměrně velkým počtem recidiv (90–92).

V současné době zatím nejsou dostupná žádná ucelená dlouhodobá klinická data a sledování z klinických studií. Nyní probíhá řada studií poukazujících na mechanismy imunologické odpovědi, které lze využít při neoadjuvantní terapii. Poměrně zásadní výhodou je, že imunologická odpověď na terapii anti-PD-1 se dle farmokinetických

analýz projevuje aktivitou T-lymfocytů již třetí týden od zahájení terapie. Navíc bylo prokázáno, že i protinádorová odpověď nastupuje poměrně rychle po aplikaci jedné dávky anti-PD-1 terapie a je charakterizována přítomností CD8⁺ T-lymfocytů. Změny byly zaznamenány i při provedení transkripční analýzy v následně exstirpovaných metastázách, kde u pacientů s terapeutickou odpovědí byl prokázáný prozánětlivý imunofenotyp. Naproti tomu pacienti s recidivou onemocnění vykazovali mechanismy rezistence, včetně potlačení imunitních mechanismů (93). První údaje ukazují velice zajímavou terapeutickou odpověď u neoadjuvantní léčby s kombinovanou terapií anti-CTLA-4 a anti-PD-1 terapie. Publikované výsledky zatím narážejí na omezený počet léčených pacientů a samotný režim podání. Zásadní budou výsledky až z velkých multicentrických klinických studií a při zhodnocení dlouhodobého terapeutického efektu (90,93).

V klinické studii fáze 2 (NCT02519322) byl hodnocen efekt kombinované terapie ipilimumabu a nivolumabu oproti nivolumabu v monoterapii u 23 pacientů klinického stádia III a IV. V kombinované terapii byla terapeutická kompletní odpověď dle RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors 1.1) kritérií pozorována až u 73 % pacientů a patologická kompletní odpověď (dále jako pCR, anglicky: pathological Complete Response) u 45 % pacientů. V monoterapii s nivolumabem byla kompletní klinická odpověď dle RECIST kritérií a kompletní patologická odpověď jen u 25 % pacientů. Významnou komplikací kombinované terapie je vyšší toxicita 3 a 4 stupně (73 % vs 8 % u anti-PD-1), která významně komplikuje následnou adjuvantní terapii navazující na radikální chirurgický výkon (92). V další navazující studii (NCT02977052) byl testován především aplikační režim kombinované imunoterapie, a navíc její případná toxicita. V této studii byl ipilimumab a nivolumab aplikován pacientům v klinickém stadiu III ve třech skupinách A, B a C (1:1:1). Ve skupině A byly podávány dva cykly ipilimumabu v dávce 3 mg/kg v kombinaci s nivolumabem 1 mg/kg každé 3 týdny, ve skupině B byl aplikován ipilimumab v dávce jen 1 mg/kg v kombinaci s nivolumabem v dávce 3 mg/kg opět v intervalu 3 týdnů a ve skupině C byly podány nejprve 2 cykly ipilimumabu v dávce 3 mg/kg ve 3týdenním intervalu následované 2 cykly nivolumabu v dávce 3 mg/kg po 2 týdnech. Celkovou terapii dokončilo 86 pacientů a nežádoucí účinky toxicity 3 a 4 stupně byly pozorovány u 40 % pacientů (12/30) ve skupině A, ve skupině B u 20 % (6/30) a ve skupině C dokonce až u 50 % pacientů (13/26). Ve skupině A navíc došlo k úmrtí jednoho pacienta na imunitně podmíněnou encefalitidu. Ve skupině A bylo dosaženo radiologické objektivní odpovědi dle RECIST kritérií u 19 pacientů

(63% (95% CI 44-80)), ve skupině B u 17 pacientů (57% (95% CI 37-75)) a ve skupině C pouze u 9 pacientů (35% (95% CI 17-56)). Patologická odpověď (pCR), která byla hodnocena nezávislými a zaslepenými patology byla dosažena ve skupině A u 24 pacientů (80% (95% CI 61-92)), ve skupině B u 23 pacientů (77% (95% CI 58-90)) a ve skupině C u 17 pacientů (65% (95% CI 44-83)) (94). Z výsledků této studie vyplývá pravděpodobně nejvhodnější terapeutická kombinace s aplikací nižší dávky ipilimumabu a vyšší dávky nivolumabu (ipilimumabu 1 mg/kg + nivolumabu 3 mg/kg) s nejnižší toxicitou a srovnatelnou klinickou a patologickou odpovědí. V dalších studiích v neoadjuvantním podání je studován efekt pouze jedné dávky anti-PD-1 s minimalizací imunitně podmíněných nežádoucích účinků, které významně komplikují další péči o pacienty. Znalosti cílené terapie pro adjuvantní terapii melanomu jsou nově aplikovány i do neoadjuvantního režimu s použitím terapie BRAF a MEK inhibitory u BRAF V600 mutovaných melanomů stadia IIIB-C (neoCOMBI) (93,95). Shrnutí neoadjuvantní terapie ukazuje tabulka 4.

Tabulka 4.: Nivo – Nivolumab, Ipi – Ipilimumab, Dab – Dabrafenib, Tram – Trametinib, pCR – patologická kompletní odpověď, RFS – přežití do relapsu onemocnění.

Studie	Forma léčby	pCR %	RFS (měsíce)	Délka sled. (měsíce)
Amaria et al. 2018	Nivo vs Ipi + Nivo	25 vs 45	nedosaženo	20,0
Rozeman et al. 2019	Ipi + Nivo	57	nedosaženo	8,3
Huang et al. 2019	Pembrolizumab	19	nedosaženo	18
Long et al. 2019	Dab + Tram	49	23,0	27,0

3.4. Léčba metastazujícího a lokálně pokročilého melanomu

Léčba metastazujícího a lokálně pokročilého melanomu stojí na dvou základních pilířích, které jsou diskutovány již v adjuvantní terapii, a to na terapii *checkpoint* inhibitory a na cílené terapii BRAF a MEK inhibitory. Chemoterapie se v současné době považuje za léčbu čistě paliativní.

3.4.1. Checkpoint inhibitory

První *checkpoint* inhibitor, anti-CTLA-4, ipilimumab byl zaveden do terapie metastazujícího melanomu již před 10 lety a zcela změnil terapeutický přístup v jeho léčbě. Jednalo se o první lék, který zaznamenal statisticky významnou účinnost v léčbě melanomu (96,97). Přestože po zavedení anti-PD-1 protilátek se využití ipilimumabu v monoterapii dostalo částečně do pozadí, je jeho průlomová role nezanedbatelná. Navíc jeho využití je nyní především v kombinované léčbě ipilimumabu s anti-PD-1 protilátkami. Další význam ipilimumabu dokazuje mechanismus centrálního imunologického účinku a vytváření paměťové imunitní odpovědi (81,98). Navzdory nízké terapeutické odpovědi, okolo 10-15 %, jsou pacienti, kteří z této terapie profitují a v současné době jsou již roky v dlouhodobém sledování po metastatickém postižení bez známek recidivy onemocnění (96). Ještě významnější zvrat do terapie melanomu i celé imunoonkologické terapie, přinesly anti-PD-1 protilátky. Nivolumab v léčbě metastazujícího melanomu prokázal svou účinnost ve studii fáze III CheckMate 066, kdy byl testován v první linii léčby ve srovnání s monoterapií dakarbazinem (DTIC). V této studii bylo zařazeno celkem 418 pacientů, nivolumab byl aplikován v dávce 3 mg/kg každé 2 týdny a chemoterapie DTIC ve standardní dávce 1000 mg/m² každé 3 týdny. OS po jednom roce léčby bylo u pacientů s nivolumabem po jednom roce léčby 72,9 % (95 % CI, 65,5 - 78,9) oproti 42,1 % u léčených chemoterapií DTIC (95 % CI, 33,0 - 50,9). Míra rizika úmrtí byla stanovena na 0,42; (99,7 % CI, 0,25 - 0,73; p<0.001) (99). V nedávné době byla publikována i data po třech letech sledování, kde celková míra OS dosáhla 51,2 % (95 % CI, 44,1 %-57,9 %) u pacientů ve skupině s podávaným nivolumabem a 21,6 % (95 % CI, 16,1 % - 27,6 %) u pacientů ve skupině s DTIC. Kompletní a parciální terapeutické odpovědi při terapii nivolumabem bylo dosaženo u 42,8 % pacientů oproti 14,4 % u terapie DTIC. Navíc toxicita stupně 3 a 4 byla dokonce nižší než při terapii DTIC, což ukazuje na relativní bezpečnost této terapie (100). V současné době se nivolumab podává v jednotné dávce a to 240 mg každé 2 týdny nebo 480 mg každé 4 týdny do progresu onemocnění nebo nezvladatelné toxicity stupně 3 a 4.

Další anti-PD-1 molekula, jak bylo zmíněno v adjuvantní terapii, je humanizovaná monoklonální protilátka pembrolizumab, která v klinických studiích potvrdila podobný účinek jako nivolumab. Klinická studie fáze III Keynote 006, srovnávala frekvenci aplikace pembrolizumabu (aplikace 10 mg/kg každé 2 a 3 týdny) oproti monoterapii ipilimumabem ve standardním dávkování a aplikačním schématu (4

aplikace v dávce 3 mg/kg každé 3 týdny). Do sledování bylo zařazeno 834 pacientů (1:1:1) s pokročilým melanomem stadia IIIB, IIIC a stadia IV. Při sledování s mediánem 22,9 měsíce medián OS nebyl v obou skupinách s pembrolizumabem dosažen, ve skupině s ipilimumabem dosahoval medián OS 16 měsíců (HR, 0,68; 95 %, CI 0,53–0,87, pro pembrolizumab každé 2 týdny proti ipilimumabu; $p=0,0009$ a HR 0,68; 0,53–0,86 pro pembrolizumab každé 3 týdny oproti ipilimumabu; $p=0,0008$). OS dvou let byl pozorován u 55 % pacientů léčených pembrolizumabem bez rozdílu intervalu podání a u 43 % pacientů léčených ipilimumabem. Tato studie tedy prokázala statisticky významné prodloužení přežití bez progrese (dále jako PFS, anglicky: Progression Free Survival), celkovou dobu přežití (OS) i četnost objektivních terapeutických odpovědí (dále jako ORR, anglicky: Objective Response Rate). Doba ORR trvala déle než 16 měsíců u až 70 % pacientů ve skupině s podávaným pembrolizumabem a je tím dokumentována schopnost *checkpoint* inhibitorů vyvolávat dlouhodobé terapeutické odpovědi (101,102). Pembrolizumab je v současné době také podáván ve dvou možných schématech a to 300 mg i.v. každé 3 týdny nebo 600 mg i.v. každých 6 týdnů.

Odlišný mechanismus cíleného působení anti-CTLA-4 a anti-PD-1 protilátek umožňuje kombinovanou imunoterapii s možným posílením synergického imunitně podmíněného protinádorového efektu (83). V tomto směru je zcela zásadní klinická studie fáze III CheckMate 067, ve které je porovnáván efekt kombinované imunoterapie nivolumabu s ipilimumabem proti monoterapii nivolumabu a ipilimumabu (řazeno do tří ramen 1:1:1) v první linii léčby u pacientů s metastazujícím melanomem. Dávkování v kombinované terapii bylo při podávání nivolumabu v dávce 1 mg/kg a ipilimumabu 3 mg/kg každé 3 týdny ve 4 dávkách, následované pokračováním v aplikaci nivolumabu v dávce 3 mg/kg každé 2 týdny. V monoterapii bylo zachováno standardní dávkování a interval pro nivolumab 3 mg/kg každé 2 týdny a pro ipilimumab 3 mg/kg ve 4 dávkách ve třítýdenním intervalu (103). Poslední zveřejněné výsledky uvádějí data při minimální délce sledování 60 měsíců, kde medián OS v kombinované terapii nebyl doposud dosažen, ve skupině pacientů s nivolumabem dosahoval 36,9 měsíce (95 % CI, 28,2 - 58,7) a v rameni studie s ipilimumabem pouze 19,9 měsíce (95 % CI, 16,8 – 24,6). Míra rizika HR pro úmrtí, nivolumab s ipilimumabem proti ipilimumabu byla 0,52 (95 % CI, 0,42 – 0,64; $P<0,001$). HR pro úmrtí při nivolumabu proti ipilimumabu byla 0,63, (95 % CI, 0,52 – 0,76; $P<0,001$). OS přežití 5 let dosáhlo v kombinované větvi studie 52 % pacientů, v rameni studie s nivolumabem v monoterapii 44 % a při podání pouze ipilimumabu 26 % pacientů (104). Dle předpokladu vyšší míra toxicity 3 a 4 stupně byla

u pacientů na kombinované terapii již v prvních letech sledování, a to až u 59 % pacientů, u 21 % pacientů ve skupině léčených pouze nivolumabem a u 28 % pacientů ve skupině léčených ipilimumabem (103). Navzdory vyšší toxicitě je tato forma kombinované terapie jedním z hlavních trendů imuno-onkologické terapie metastazujícího a pokročilého melanomu (103–105). V současné době je tato forma léčby plně hrazena i v České republice.

3.4.2. Onkolytické viry a kombinovaná terapie s *checkpoint* inhibitory

Při přítomnosti kožních metastáz se nabízí možnost poměrně snadné intralezionální aplikace léčiv, které mohou stimulovat imunitní systém pacienta. V posledních letech jsou nejvíce rozšířeny aplikace onkolytických virů. Ty navozují nekrózu nádorových buněk a uvolnění nádorových neoantigenů s indukci zánětlivé odpovědi se stimulací vlastního imunitního systému. V případě onkolytických virů je díky genetické modifikaci viru využito vlastností tzv. „preferenční infekce“ a replikace viru především v nádorových buňkách. Následně navozená cílená lýza nádorových buněk stimuluje díky uvolněným nádorovým neoantigenům vrozenou i získanou protinádorovou imunitní odpověď (106).

Talimogene laherparepvec (T-VEC) je geneticky modifikovaný virus *herpes simplex* typ 1. Jedná se o první onkolytickou virovou terapii schválenou FDA pro léčbu metastazujícího melanomu. T-VEC je modifikován delecí virových genů pro neurovirulenci, pro snížení nežádoucích účinků a potencován k výraznější imunogenitě delecí virového genu ICP47 (Infected Cell Protein 47). Imunogenicita a schopnost vyvolávat zánětlivou reakci je dále podporována expresí genu lidského GM-CSF (granulocyt-makrofágového kolonie stimulujícího faktoru), který podporuje primární odpověď T-lymfocytů (106). Navíc tato terapie umožňuje kombinaci onkologických virů s terapií *checkpoint* inhibitory. V současné době je T-VEC vakcína testována ve studiích v kombinaci i s anti-PD-1 např. v rámci studie MASTERKEY-265 s pembrolizumabem (107,108). Určitým limitem této formy léčby je zmíněná intralezionální aplikace, a tedy nutná přítomnost kožních či podkožních metastáz dostupných pro aplikaci. Dalším virem, který je testován v klinickém sledování je Cocksackie virus (CVA21 nebo CAVATAK). V současné době jsou tyto onkolytické vakcíny zkoušeny samostatně nebo v kombinaci

s pembrolizumabem u pacientů ve stadiu III a IV (CVA21 + pembrolizumab NCT02565992; CAVATAK samostatně NCT01636882) (109).

3.4.3. Cílená terapie BRAF a MEK inhibitory

BRAF inhibitory představují možnost cílené terapie nádorů s přítomnou somatickou mutací genu BRAF V600E a K. V léčbě metastazujícího melanomu se jednalo o jeden ze zlomových bodů s nezvykle velkou mírou terapeutických odpovědí. Prvotní nadějně výsledky byly ale zatíženy brzkým vznikem nádorové rezistence a nárůstem recidiv. První BRAF inhibitor, který byl zaveden do klinického testování ve studii BRIM-3 byl vemurafenib. V rámci studie byl vemurafenib hodnocen oproti monoterapii DTIC. Terapeutická odpověď byla až 53 %, což v té době byla hodnota doposud nezaznamenaná v léčbě melanomu. OS u pacientů léčených vemurafenibem bylo zaznamenáno 13,6 měsíce proti 9,7 měsícům u pacientů léčených pouze DTIC (HR: 0,70, 95% CI: 0,57–0,87, $p = 0,0008$) (110). Vznik nádorové rezistence a selhání této terapie demonstrují data u dlouhodobého sledování, kdy poměr počtu OS v prvním roce léčby byl 56 % pacientů na léčbě vemurafenibem oproti 46 % na terapii DTIC. Ve 4. roce sledování byl tento poměr OS již pouze 17 % pacientů ku 16 % pacientům na terapii DTIC (111). Poměrně záhy byla zveřejněna data klinické studie BREAK-3, ve které byl testován druhý BRAF inhibitor dabrafenib, který zaznamenal podobnou terapeutickou účinnost jako vemurafenib. V této studii však nebylo prokázáno významnější statistické prodloužení OS při terapii dabrafenibem oproti monoterapii DTIC (18,2 proti 15,6 měsíce). Signifikantní změna byla zaznamenána v hodnocení PFS, kde byl dokumentován medián PFS 5,1 měsíce na terapii dabrafenibem a jen 2,7 měsíce na terapii DTIC (HR, 0,30; 95% CI: 0,18-0,51; $p < 0,0001$) (112). Vzhledem k rychlému nástupu rezistence při terapii BRAF inhibitory (6-9 měsíců) byla hledána cesta k potencování efektu a překonání alespoň některých mechanismů rezistence (113,114). Proto byla zavedena kombinovaná terapie BRAF a MEK (MEK1/2, trametinib, cobimetinib) inhibitory s cílenou inhibicí v dalším stupni MAP kinázové signalizace (Obr. 11) (114). Trametinib a cobimetinib patří mezi selektivní reverzibilní inhibitory MEK 1/2 kináz, které jsou součástí MAP kinázové intracelulární signalizace. Jedná se o kinázový protein, který je uložený mezi proteinem BRAF a ERK kinázou (Obr. 11). První inhibitor trametinib zaznamenal významnou účinnost v kombinaci s dabrafenibem ve studii

COMBI-D. Cobimetinib byl zkoušen pouze v kombinaci s vemurafenibem ve studii COMBI-V. Obě kombinace ve studiích prokázaly statisticky významné zlepšení celkového přežití a přežití bez progresu oproti monoterapii. V dlouhodobém přežití byly výsledky obou studií spojeny (211 ve studii COMBI-D a 352 ve studii COMBI-V). Celková míra PFS byla 21 % (95 % CI, 17-24) po 4 letech a 19 % (95 % CI, 15-22) po 5 letech. Celková míra OS byla 37 % (95 % CI, 33-42) po 4 letech a 34 % (95 % CI, 30-38) po 5 letech. Kompletní terapeutická odpověď byla u 109 pacientů (19 %) a byla spojena s dlouhodobým efektem a trváním remise. U těchto pacientů byla zaznamenána dokonce míra OS 71 % (95 % CI, 62-79) po 5 letech (115). Dalším významným klinickým testováním byla studie coBRIM, resp. kombinace cobimetinibu s vemurafenibem, kde OS byl 22,3 měsíce oproti 17,4 měsíce u monoterapie jen vemurafenibem (HR: 0,70, 95 % CI: 0,55–0,90, $p = 0,005$) a medián PFS 12,3 měsíce u kombinované léčby oproti 7,2 měsíce u monoterapie (HR: 0,58, 95 % CI: 0,46–0,72, $p < 0,0001$) (116).

Třetí dvojice BRAF a MEK inhibitorů, resp. encorafenibu a binimetinibu byla testována ve studii Columbus sledující efekt zmíněných inhibitorů oproti monoterapii vemurafenibem či encorafenibem. Medián sledování pro OS byl 36,8 měsíce (95 % CI, 0,47-0,79), medián OS pro kombinaci encorafenibu s binimetinibem byl 33,6 měsíce (95 % CI, 24,4-39,2) ve srovnání s 16,9 měsíci (95 % CI, 14,0-24,5) při terapii vemurafenibem (HR 0,61; 95 %, CI 0,47-0,79; $p < 0,0001$) (117). Tato studie prokázala na zatím nejlepší dlouhodobé výsledky OS pacientů na kombinované terapii BRAF a MEK inhibitory. I když encorafenib a binimetinib byly schváleny FDA a EMA (2018) pro léčbu neresekovatelného či metastazujícího melanomu, v České republice byla jeho úhrada stanovena až v roce 2020.

Oba zmíněné pilíře soudobé léčby maligního melanomu nabízí možnost kombinované terapie, která by mohla navodit vyšší míru terapeutických odpovědí a současně prodloužit terapeutickou odpověď u pacientů s BRAF mutovaným melanomem (118). V současné době probíhají klinické studie terapie trojkombinací BRAF a MEK inhibitorů s imunoterapií anti-PD-1. Do této kombinace byla ve studii COMBI-i zavedena třetí anti-PD-1 protilátka spartalizumab. Dostupná data z klinické fáze 1 a 2, při sledování 1 rok, byl OS 85,9% (95% CI, 69-94) a kompletní remise byla pozorována dokonce u 1/3 všech pacientů (119). Tyto výsledky ukazují na poměrně zajímavé možnosti léčby, ale je nutné kriticky připomenout zatím jen krátkodobá data sledování a poměrně výraznou toxicitu plynoucí z kombinované léčby. Dokonce všichni pacienti ($n=36$) v dosavadním

sledování měli 1 nežádoucí událost spojenou s terapií, u 40% byly dokonce pozorovány více jak 3 události a u 17 % pacientů muselo dojít pro závažnou toxicitu k ukončení všech 3 léčebných modalit (119). Z posledních uveřejněných dat ale bohužel vyplývá, že kombinovaná terapie anti-PD-1 s cílenou terapií signifikantně neprodlužuje PFS oproti kombinaci placebo a cílené terapie. Medián sledování byl 27,2 měsíce a medián PFS byl v kombinaci 16,2 měsíce oproti 12,0 měsícům v kombinaci jen s placebem (HR, 0,82; 95 % CI, 0,655-1,027; p = 0,042). Očekávané PFS po 12 měsících léčby bylo 58 % oproti 50 % pacientů a po 24 měsících terapie 44 % oproti 36 % pacientů. Tyto statistické údaje nepotvrdily původním očekávání a údaje z předchozích fází klinického testování (120).

3.4.4. Radioterapie

Radioterapie je součástí komplexní terapie melanomu navzdory tomu, že melanom patří mezi nádorová onemocnění spíše radiorezistentní a role radioterapie je tedy spíše paliativní. Samotným cílem radioterapie je zmírnění nádorového růstu, snaha o omezení bolesti v postižené lokalitě anebo zmírnění krvácení. Nejčastěji je radioterapie využívána při inoperabilním uzlinovém postižení při selhání imunoterapie či cílené terapie. Obdobně lze takto využít radioterapii i na kožní či podkožní metastázy při rychlém růstu a po selhání předchozích terapeutických modalit. Zajímavá je i možnost využití radioterapie po selhání nebo i při terapii *checkpoint* inhibitory s následným postradiačním rozpadem nádorové tkáně a uvolněním řady nádorových neoantigenů, které mohou druhotně stimulovat imunitní systém a tím navozovat i mechanismy až tzv. abskopálního efektu (121–123). Abskopální efekt vychází z možného uvolnění nádorových neoantigenů po radioterapii, což následně stimuluje imunitní systém schopný napadat metastatická postižení i v místech primárně neozářených. Samotný teoretický mechanismus abskopálního efektu je v současné době již dobře pochopený, ale v praxi je pozorován spíše sporadicky. Aplikace a typ radioterapie vychází z vybavenosti a zkušeností samotného pracoviště, zevní radioterapie se podává frakcionovaně dávkou 2 Gy 5 x týdně, nebo i vyšší dávkou dosahující 4-8 Gy hypofrakcionovaně 1-2 x týdně. Celková dávka je většinou v rozmezí 32-60 Gy (124).

Poměrně velký význam má radioterapie při léčbě pacientů s mnohočetným metastatickým postižením centrálního nervového systému (dále jako CNS, anglicky: Central Nervous System), a to zejména pro antiedematózní efekt a efekt zmírňující

bolestivost (125). U solitárních metastáz CNS lze použít stereotaktické techniky ozařování označované jako radiochirurgické metody pomocí *Leksellova* gama nože nebo pomocí *Cyber knife*, které využívají cílené a vysoké dávky záření šetřící okolní nepostiženou tkáň (126,127). Tyto metody mohou napomoci stabilizovat metastatické postižení CNS a tím umožnit zahájení cílené terapie nebo imunoterapie.

3.4.5. Hypertermická končetinová cytostatická perfuze v terapii metastazujícího melanomu

Hypertermickou končetinovou cytostatickou perfuzi (dále jako HILP, anglicky: Hypertermic Isolated Limb Perfusion) lze využít u pacientů s lokalizovaným metastatickým postižením jedné končetiny. HILP je chirurgická technika, která kombinuje zahřátí postižené končetiny s aplikací chemoterapeutika do izolovaného krevního oběhu končetiny. Nejčastěji se jedná o opakovanou recidivu melanomu v jizvě či vznik mnohočetných inoperabilních satelitních či tranzientních metastáz. Podmínkou výkonu je postižení pouze v oblasti končetiny, nejlépe s dostatečným odstupem od kmenových stehenních či axilárních cév (128). Vedle terapie melanomu se používá i v léčbě sarkomů měkkých tkání, navíc lze tuto techniku kombinovat vedle aplikované chemoterapie i s podáním tumor nekrotizujícího faktoru alfa (dále jako TNF-alfa, anglicky: Tumor Necrosis Factor alfa) (129). Z kožních karcinomů lze tuto metodu použít u Merkelova karcinomu (130). Princip této techniky spočívá v oddělení cévního systému postižené končetiny, resp. vypreparování *vasa femoralia seu axillaris*, jejich napojení na mimotělní oběh, zahřátí končetiny na 39 °C a následné perfusi končetiny cytostatikem v mnohonásobně vyšší koncentraci, než která by byla možná pro systémové použití. V případě melanomu se standardně využívá chemoterapie melfalanem (alckeran) v dávce, která se počítá dle váhy pacienta a koreluje s dávkou, která se vypočte dle objemu postižené končetiny pacienta (128). Samotné provedení HILP je technicky poměrně náročné a v současné době tuto metodu provádějí jen vybraná pracoviště s letitou zkušeností a zázemím. Od roku 2006 bylo do současnosti v rámci spolupráce Dermatovenerologické kliniky a 2. chirurgické kliniky 1. LF UK a VFN provedeno celkem 42 HILP u pacientů s lokálně pokročilým melanomem.

3.5. Budoucí směr terapie a další možnosti

Další formou léčby metastazujícího melanomu, která se v současné době testuje v rámci klinických studií, je imunoterapie protilátkami anti-PD-L1. Na rozdíl od monoklonálních protilátek anti-PD-1, jsou protilátky anti-PD-L1 namířeny na blokadu tkáňové exprese PD-L1 (131). V současné době probíhají studie s podávanou monoklonální protilátkou anti-PD-L1 atelizumebem, který je testován v kombinaci s BRAF a MEK inhibitory vemurafenibem a cobimetinibem. První výsledky z klinického testování Ib ukazují na míru terapeutických odpovědí až 71,8 % (95%, CI; 55,1-85,0). Medián terapeutické odpovědi dosáhl 17,4 měsíce (95% CI, 10,6-25,3) s trvající terapeutickou odpovědí u 39,3 % pacientů po dosažení sledování prakticky 2,5 roku (132). Výsledky této studie ukazují na poměrně slibná data, nicméně je otázkou, zda budou potvrzena i ve studii fáze III, a to zejména v dlouhodobosti terapeutické odpovědi.

Jednou z dalších možností je použití agonistů Toll-like receptorů (TLR). Agonisté TLR jsou membránové glykoproteiny typu I, které patří do skupiny IL-1R receptorů. Jejich hlavní funkcí je regulace produkce cytokinů IFN- α a IL-12. Tyto cytokiny jsou následně schopné indukovat a potencovat lokální imunitní odpověď. TLR agonisté působí jako slibný adjuvans pro protinádorové vakcíny a aktivátory imunitního systému, jako jsou *checkpoint* inhibitory, přímo v nádorovém mikroprostředí. Konkrétním TLR agonistou je resiquimod (agonista TLR 7/8), který aktivuje jak myeloidní (mDC, TLR8), tak plazmocytární (pDC, TLR 7) dendritické buňky pacienta s metastazujícím melanomem (133).

Poměrně zajímavým novým odvětvím v terapii melanomu je použití adoptivních T-lymfocytů. Principem metody je podání velkého množství vlastních, antigenně stimulovaných, pro melanom specifických T lymfocytů. Protinádorový efekt je vyvolán inhibicí imunosupresivních faktorů pacienta s podanými T lymfocyty. Adoptivní T lymfocyty musí být schopny proliferace a dokončení efektorových funkcí s následnou schopností vytvářet dlouhodobou paměťovou kapacitu. V prvních, zatím nekompletních klinických studiích tato terapie vedla k úplné remisi až u 24 % pacientů s mediánem OS tři roky (134).

Nově se využívá adoptivních T lymfocytů s chimérami antigenními receptory T lymfocytů. Tyto chimérami receptory obsahují extracelulární doménu, která je schopna rozpoznávat specifický antigen (například nádorový neoantigen). Další strukturální jednotkou je transmembránová doména s intracelulární signalizací, která stimuluje T-

lymfocyty s cílenou cytotoxickou protinádorovou imunitní odpovědí. V rámci této terapie je nutné pacientům aplikovat izolované T-lymfocyty, které jsou geneticky modifikovány retrovirovým či plazmidovým vektorem. Tyto modifikované T-lymfocyty jsou schopné aktivovat imunitní systém a generovat i dceřiné buňky s chimerními receptory (135).

4. Nádorové mikroprostředí melanomu

Patogenní rysy melanomu zahrnují růst a proliferaci atypických melanocytů spojených s několika charakteristikami: soběstačná produkce růstových faktorů, necitlivost na růstovou inhibici, neomezený replikační potenciál spojený s inhibicí apoptózy, podpora nádorové neoangiogeneze, schopnost tkáňové invaze a následná tvorba metastáz. Tyto patogenní vlastnosti mohou být vyvolány aktivací specifických onkogenů nebo inaktivací nádorových supresorových genů pomocí molekulárních mechanismů, což jsou bodové mutace, delece a translokace. Dále se podílejí epigenetické mechanismy, jako je exprese mikroRNA a methylace promotoru. Při progresi melanomu se mohou uplatňovat mechanismy vedoucí ke genetické nestabilitě a selektivnímu růstu nádorových buněk s příznivým zastoupením nádor podporujících mutací. Mezi další faktory odpovědné za růst nádoru patří genetická predispozice, mutageneze a potlačení imunitní odpovědi pacienta. Mezi nejdůležitější signální dráhy zapojené do patogeneze melanomu, které budou následně diskutovány, patří dráhy MAPK, PTEN, PI3K/AKT a MITF.

Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.2., věnované rizikovým faktorům, byl v indukcii melanomu prokázán v několika epidemiologických a genomických studiích tumorigenní vliv UV záření (136). Epidemiologické studie ukazují významné regionální variace v incidenci melanomu s nejvyšším výskytem na Novém Zélandu a v Austrálii, kde je jejich vysoká incidence spojena s působením intenzivnějšího slunečního záření. Vývoj melanomu lze rozdělit na „radiální růstovou fázi“ (která zahrnuje vývoj od melanoma *in situ* a léze superficiálně se šířícího melanomu v počáteční fázi) a „vertikální růstovou fázi“ (kterou lze pozorovat u melanomů pronikajících do hlubších částí dermis a u tvorby metastáz satelitních i vzdálených) (137,138). Navzdory tomu, že tento model může chybět např. u rychle rostoucích nodulárních melanomů, je vhodné ho zmínit pro konceptualizaci mechanismů progresu onemocnění.

4.1. Horizontální (radiální) a vertikální růstová fáze melanomu

Při *in vitro* modelování nádorového mikroprostředí a nádorového šíření se ukazuje, že jedním z klíčových mechanismů kontroly růstu je kontaktní inhibice, která se u nádorových buněk ztrácí. Předpokládá se, že podobné procesy mohou ovlivňovat růst nádorových melanocytů i *in vivo* tak, aby se usnadnila radiální růstová fáze (139). Distribuce normálních melanocytů v bazální vrstvě epidermis je regulována pomocí dendritických výběžků. Ztráta kontaktní inhibice se projevuje histologicky jako lentiginózní („*back-to-back*“) růst se zmnožením melanocytů v bazální vrstvě a následně s tvorbou melanocytárních hnízd. Tyto rysy jsou v různé míře přítomny jak u benigních lézí charakteru *lentigo simplex*, tak v benigních névech. Lze je pozorovat rovněž u melanoma *in situ* a zvýrazněny jsou i v počínajících lézích SSM, kde je navíc patrné konfluentní lentiginózní šíření s tvorbou asymetrických hnízd a především typické pagetoidní šíření v epidermis s přestupem nádorových buněk přes bazální membránu epidermis (140). Melanom *in situ* je definován jako časný melanom omezený horizontálním šířením a nepřesahující epidermální bazální membránu. U řady lézí lze pozorovat poměrně řídký a jemný zánětlivý infiltrát. U pokročilejších lézí je patrný již dosti hustý lymfocytární infiltrát, což naznačuje, že imunogenita melanomu *in situ* je významně nižší než u invazivnějších forem melanomu (141). Poměrně zajímavá je studie popisující výskyt mutace promotoru TERT v *in situ* melanomech, které lze detekovat také u benigních névů s vyšším mutačním zatížením a v některých dysplastických névech, což by ukazovalo na možný zlom v přechodu benigní léze a počínajícího melanomu na genové úrovni (142,143). Další práce poukazují na vznik mutací PTEN a TP53, které lze detekovat v pokročilých melanomech. Není však zřejmé, ve které fázi zahájení vertikálního růstu se tyto mutace objevují (142,143).

Přechod z horizontální do invazivní vertikální růstové fáze melanomu představuje proces, při kterém se hromadí řada patogenních mutací v nádorových buňkách a dochází k aktivaci pro-invazivního nádorového mikroprostředí. Dysregulace nádorové proliferace aktivuje výhodné mezenchymální interakce nádorového mikroprostředí včetně schopnosti vyhýbat se imunitní kontrole organismu pacienta (144). Jednou z prvních známek invazivního růstu je popsána přítomnost žírných buněk v nádorovém stromatu melanomu, způsobená chemotaktickými faktory, jako je produkce IL-3 nádorovými melanocyty (145). Mezenchymální interakce představují úzkou spolupráci nádorových melanocytů a buněk tvořících nádorové stroma. Produkce VEGF a FGF (resp. bazického

– bFGF) podporuje mitotickou aktivitu nádorových buněk a indukcí nádorové neovaskularizace, která je dobře patrná i v dermatoskopickém obraze SSM (ale i NM). Zvýšená exprese VEGF je navíc spojena s aktivací onkogenu c-MYC a agresivnějším fenotypem melanomu u daného jedince (146). Zvýšená exprese proto-onkogenu c-MYC je zapojena do progresu řady nádorů. Patologická aktivace c-MYC vede k aberantní buněčné proliferaci, diferenciaci, buněčné apoptóze a buněčnému stárnutí. Bylo prokázáno, že aktivace c-MYC je spojena s agresivnějším chováním melanomu, vertikální růstovou fází a iniciací metastatického postižení (147,148). Zesílená exprese c-MYC je zdokumentovaná při rezistenci na BRAF a MEK inhibitory, které primárně vedou k inhibici této exprese (149). Pro progresi mnoha nádorů včetně melanomu je významná produkce řady faktorů, které produkují nádorové buňky a které vedou k potlačení tumor supresivních vlivů imunitního systému. Vedle vlivu VEGF na angiogenezi je popsán i vliv VEGF na potlačení imunitního systému (150). Mezi další imunosupresivní faktory generované nádorem patří IL-10, který snižuje účinek makrofágů a T-lymfocytů (i tumor infiltrujících lymfocytů). Navíc zvýšená exprese IL-10 koreluje s progresí melanomu a horší prognózou, což poukazuje na další faktor spojený s iniciací nádorové invaze (151). Na tomto procesu se mohou významně podílet i okolní keratinocyty, které také tvoří nádorové mikroprostředí melanomu. Keratinocyty jsou schopny produkovat matrix metaloproteinázy (dále jako MMP, anglicky: Matrix Metalloproteinase), především MMP-9, jejichž tvorba je navíc potencována i nádorovými melanocyty, a tak vzájemným působením dochází k překonání bazální membrány nádorovými melanocyty a invazivnímu nádorovému růstu melanomu (152).

4.2.Vznik metastatického postižení

Vznik metastatického postižení závisí na faktorech umožňujících průnik nádorových buněk do lymfatických a krevních cév a na faktorech, které usnadňují přežití a proliferaci nádorových buněk na vzdálených místech. Melanom je charakteristický schopností vytvářet metastatické postižení i při poměrně malém primárním nádoru, a to cestou jak lymfatickou, tak i hematogenní. Metastatické šíření je komplikovaný proces složený z mnoha kroků, jak popsal téměř před 150 lety chirurg Stephen Paget, který vytvořil hypotézu „*seed and soil* - semene a půdy“. Na tomto ději se podílí agresivita nádorových buněk, ale i procesy formující nádorové mikroprostředí včetně tkání, kde k metastatickému postižení dochází (153,154). Prvním prediktivním místem

metastatického onemocnění jsou lymfatické uzliny, což je standardně vyšetřováno u pacientů s primárním melanomem stadia IB TNM klasifikace v rámci vyšetření SLN (71,72,76,155). Samotná přítomnost melanomových buněk v lymfatické uzlině je silným prediktorem recidivy melanomu. Nemusí ovlivnit přežití pacientů s melanomem, ale má velký význam pro *staging* onemocnění a následnou dispenzarizaci (76). VEGF je opět jedním z hlavních růstových faktorů, které se na lymfogenním šíření mohou podílet, a to zejména podtyp VEGF-C, který se účastní lymfangiogeneze a podporuje zvýšenou hustotu lymfatických cév v oblasti melanomu (156).

V případě hematogenního rozsevu jsou nejčastěji postižené plíce a pleura (157). V myších modelech s metastatickým melanomem byl v plicní tkáni detekován extracelulární protein CLCA2, který interaguje s $\alpha\beta4$ -integrinem exprimovaným nádorovými buňkami a může být odpovědný za preferenční vazbu nádorových buněk v této tkáni (158). Z genetických alterací jsou častěji popisovány plicní metastázy u NRAS mutovaných melanomů (159).

Metastatické postižení centrálního nervového systému, zejména pak mozkové postižení, je spojeno s hematogenním rozsevem, velice špatnou prognózou a omezenou možností léčby. V současné době běžně zavedená cílená léčba BRAF a MEK inhibitory a imunoterapeutické možnosti léčby přinesly naději i pro tyto pacienty a dle některých prací přinášejí odpověď až u 55-58 % pacientů (160,161). Skutečný mechanismus vzniku mozkových metastáz není jasný. Na myším modelu metastazujícího melanomu lze najít některé faktory, které v tomto procesu hrají roli. Je popsána role transferinových receptorů a jejich interakcí s vlastními ligandy, které byly detekovány v mozkových metastázách melanomu (162). Další studie poukazuje na význam neurotrofinů a receptorů neurotrofinů v mozkových metastázách specifických pro nervovou tkáň (163,164). Z genetických alterací jsou mozkové metastázy spojeny s přítomností mutace BRAF i NRAS a se ztrátou exprese PTEN genu. S těmito poznatky souvisí i aktivace dráhy PI3K/AKT nebo STAT3 signalizace, podílející se na vzniku rezistence na BRAF inhibitory (165–168). V mozkových metastázách melanomu byla detekována i zvýšená exprese PLEKHA5 a MMP-2 (169). V rámci heterogenity primárního melanomu i jeho metastáz byla charakterizována subpopulace metastatických nádorových melanocytů s vysokou expresí CD271, která je spojena s migračním potenciálem a přežíváním nádorových melanocytů. Exprese CD271 tedy může propůjčovat specifické vlastnosti metastatickým melanomovým buňkám. Významným faktorem je i vliv mikroprostředí a nádorového stromatu prostřednictvím astrocytů, které napomáhají melanomovým

buňkám k zesílené expresi CCR4 a CD271. Tyto interakce přispívají k vyšší plasticitě melanomových buněk s neuronálním fenotypem, který jim pravděpodobně napomáhá unikat obranným mechanismům, včetně imunitních mechanismů (170).

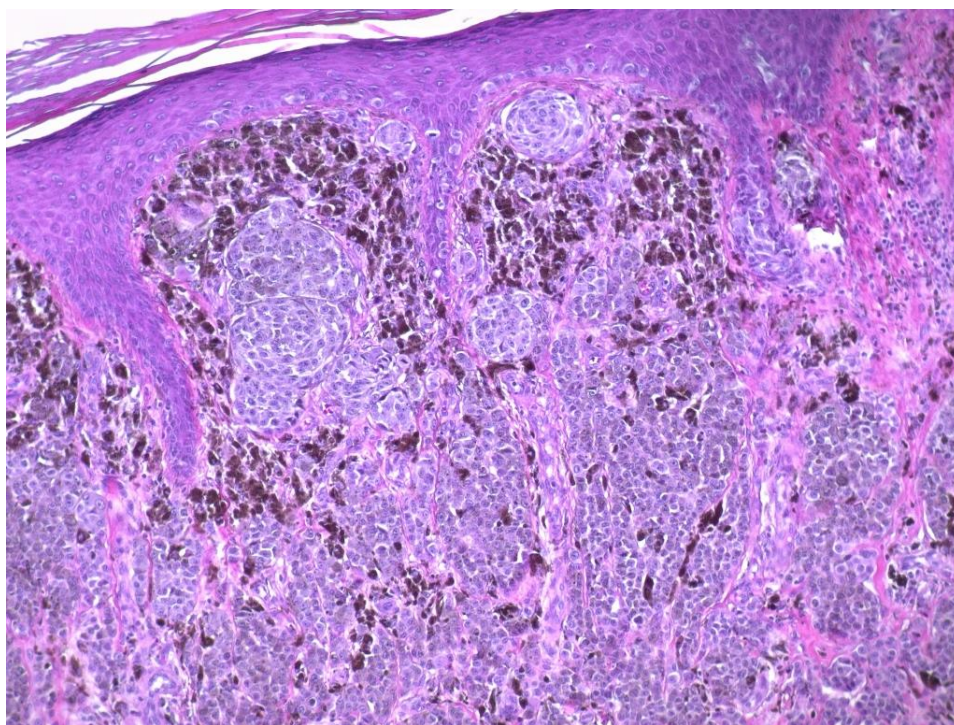
Dalším často pozorovaným metastatickým postižením jsou metastázy melanomu do jater (až 20% pacientů), do kostí (11–17%) nebo do kůže a podkožní tkáně (157). Kožní metastázy představují hematogenní šíření melanomových buněk. Specifické interakce mezi chemokiny CCR10 a CCL27 byly prokázány jako klíčové faktory při kožním postižení. CCL27 je chemokin exprimovaný v epidermis normálními keratinocyty, navíc jeho vysoká exprese v supratumorózní epidermis je spojena s delším OS (171). CCL27 pravděpodobně interaguje s receptorem CCR10, který je exprimován na melanomových buňkách, a inhibice této interakce následně vedla k potlačení kožních metastáz v myším modelu metastazujícího melanomu (172,173).

Poměrně novým odvětvím studia mechanismů progresu nádorových onemocnění je problematika exozomů. Exozomy představují rozpustné organely, které hrají roli v parakrinní intercelulární signalizaci. Exozomy stimulují metastazování prostřednictvím podpory epitelově mezenchymových interakcí, ovlivňují neovaskularizaci lymfatických uzlin a tím stimulují vznik metastatického mikroprostředí (174,175). Navíc exozomálně navozené interakce mohou vytvářet imunologicky výhodné protumorózní prostředí. Exozomy mají silný imunosupresivní účinek na mikroprostředí nádorů, kde inhibují proliferaci CD8⁺ T-lymfocytů závislých na signalizaci IL-2 (176). Dále melanomová exozomální miRNA-125b-5p indukuje přechod makrofágů na nádorově asociované s až smíšenou aktivací fenotypu M1 a M2, včetně produkce CCL22, IL-12B, IL-1p, IL-6, i-NOS a TNF- α , které podporují nádorový růst (174,177). Exozomy se mohou podílet na invazivním fenotypu nádorových melanocytů, usnadňujícím migraci a proliferaci, nadměrnou expresí GTPázy RAB27A(178). Pro budoucí směr výzkumu nových možností terapie obsahují exozomy poměrně zajímavé molekuly k vývoji personalizované onkologické léčby.

4.3.Nádorové mikroprostředí a vlastnosti nádorového stromatu

Nádorové mikroprostředí představuje vzájemnou kooperaci nádorových buněk a nenádorových buněk formujících nádorové stroma (Obr. 7). Významnou funkci v nádorovém mikroprostředí hrají i nebuněčné složky jako je extracelulární matrix (dále jako ECM, anglicky: Extracellular Matrix) a signální molekuly, které přímo odpovídají

za buněčné interakce. Žádný z typů buněk nádorového stromatu není sám o sobě maligní ve smyslu geneticky determinované mutace. Buněčné složky nádorového mikroprostředí představují nádorově asociované fibroblasty (CAFs), pericyty, endotelové buňky novotvořených cév, okolní epitelové buňky a dle některých autorů i atrahované cirkulující mezenchymové buňky (179–181). Významnou buněčnou komponentou nádorového mikroprostředí jsou buňky imunitního systému. V biologii melanomu mají v rámci imunoterapie velký význam nádor infiltrující lymfocyty (dále jako TILs, anglicky: Tumor Infiltrating Lymphocytes), které odpovídají za buněčně zprostředkovanou protinádorovou odpověď (182). Mezi významné buněčné elementy patří ještě nádorově asociované makrofágy (dále jako TAMs, anglicky: Tumor Associated Macrophages) a např. žírné buňky, které lze pozorovat v okraji melanomu při zahájení vertikální růstové fáze (145). Buňky nádorového stromatu díky vzájemným interakcím s nádorovými buňkami i vzájemnými interakcemi uvnitř nádorového stromatu získávají funkce odlišné od funkcí analogických buněk v normálních tkáních.



Obr. 7: Histologický obraz melanomu znázorňuje složení nádorového mikroprostředí, nádorové melanocyty obklopeny infiltrátem TAMs, TILs, CAFs a prostoupení i epidermálními výběžky, barvení H&E, zvětšeno 200x.

Nádorové mikroprostředí je schopné reagovat na zevní faktory a napomáhat nádorovým buňkám v další progresi, cíleně se bránit nepříznivým faktorům navozeným léčebnou strategií i vlastním obranným mechanismům pacienta (183). Ukázkou schopností modulovat nádorové melanocyty pomocí mikroprostředí dokazují experimenty s použitím embryonálního mikroprostředí, které je schopno významně snížit metastatický potenciál nádorových buněk (28–30). U experimentu, kdy jsou aplikovány nádorové melanocyty do oblasti formující se neurální trubice během vyvíjejícího se kuřecího embrya, dochází k reprogramování nádorových buněk a následně k jejich migraci do stejných lokalit jako přímé deriváty neurální trubice (29,30). K dediferenciaci nádorových buněk lze využít i kondiciovaného media (medium obohacené o faktory produkované např. embryonálními buňkami) v *in vitro* modelování nádorového mikroprostředí (38).

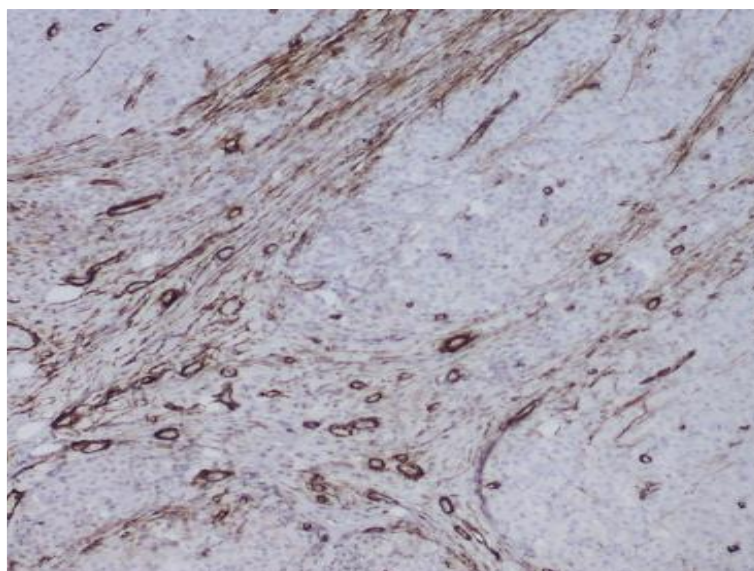
V *in vivo* myších modelech metastatického melanomu může hrát mikroprostředí roli v eliminaci nádorových buněk a zabraňuje tvorbě mikrometastáz, včetně progresu na makrometastázy, ale na druhé straně mikroprostředí může metastatické chování významně potencovat (184,185). Vedle stimulace nádorového růstu se nádorové mikroprostředí významně podílí na vzniku nádorové rezistence na cílenou terapii (186,187). K dalšímu porozumění chování nádorových onemocnění je nutné podrobněji zdokumentovat vliv jednotlivých kompartmentů nádorového mikroprostředí.

Kromě buněčných komponent se na formování nádorového mikroprostředí významně podílí i složky ECM, ke kterým se nádorové buňky i buňky nádorového stromatu váží pomocí adhezních molekul (především pomocí integrinů). Ze složek ECM jsou v nádorovém stromatu nejvíce zastoupeny proteoglykany, fibrily (tvořené kolagenem) a rozpustné adhezní glykoproteiny (např. fibronectin či tenascin) (188). ECM nemá v nádorovém mikroprostředí jen podpůrnou a mechanickou funkci, ale představuje i velice dynamickou složku, podstupující permanentní remodelaci s významnou podporou extra a intercelulárních signalizačních drah (189).

4.3.1. Nádorově asociované fibroblasty, CAFs

Nádorově asociované fibroblasty (CAF) představují významnou komponentu nádorového mikroprostředí. Lze se setkat i s termínem stromální fibroblasty či s melanomem asociované fibroblasty (dále jako MAFs, anglicky: Melanoma Associated

Fibroblasts). CAFs představují morfologicky vřetenobuněčné buňky s typickou expresí vimentinu, jako charakteristického znaku mezenchymálních buněk. Dalším typickým znakem je aktivace těchto fibroblastů s možným průkazem exprese hladko svalového aktinu (dále jako α -SMA, anglicky: alfa Smooth Muscle Actin) a CAFs lze tedy definovat i jako nádorové myofibroblasty (Obr. 8). Funkčně se CAFs podobají myofibroblastům hojící se rány, které však po dokončení hojení svou aktivaci ztrácí (190,191). I když neexistuje univerzálně akceptovaný a použitelný marker vedle α -SMA je pro CAFs typická exprese i dalších znaků jako je exprese fibroblastového specifického proteinu-1 (dále jako FSP-1, anglicky: Fibroblast Specific Protein-1) označovaného i jako S100A4, receptoru β pro destičkový růstový faktor (dále jako PDGF, anglicky: Platelet Derived Growth Factor) a fibroblasty aktivujícího proteinu (dále jako FAP, anglicky: Fibroblasts Activating Protein) (192,193).



Obr. 8: Pozitivita α -SMA ve stromatu melanomu označující CAFs, druhotně pozitivita patrna i v cévách stromatu, Imunohistochemické vyšetření α -SMA (DAKO), 100x. Obrázek použit v publikaci Kodet et al. Int J Mol Med. 2018 May;41(5):2687-2703. (186).

V minulosti byla věnována velká pozornost možnosti, že CAFs mohou do určité míry vznikat mechanismem EMT částí nádorových buněk. V takovém případě by ovšem jak nádorový parenchym, tak i CAFs, musely vykazovat alespoň v určitém rozsahu identické zásadní mutace (tzv. „*drivers mutations*“), což však u většiny nádorů včetně melanomu nebylo prokázáno (186,194–196). Tyto práce podporují nejednotné diskuse o možném původu a vzniku CAFs, které vycházejí z *in vitro* a *in vivo* modelování

nádorového mikroprostředí. V současné době převládá názor, že mechanismů vedoucích ke vzniku nádorového stromatu včetně CAFs je více a navzájem se mohou prolínat i potencovat. Pravděpodobně může jít o vliv lokálních faktorů jak primárních, tak metastatických lézí. Heterogenita a funkční diverzita CAFs komplikovaná nedostatkem univerzálních markerů, ztěžuje tyto studie. Dále se ukazuje, že i heterogenita jednotlivých nádorových populací může mít odlišné vlastnosti a funkce (27). O původu CAFs lze zmínit některé teorie:

- (i) vznik CAFs přeměnou nádorových buněk pomocí EMT
- (ii) vznik CAFs aktivací fibroblastů z lokálního mezenchymu,
- (iii) vznik CAFs migrací a aktivací buněk odvozených z kostní dřene (cirkulující kmenové mezenchymální buňky).

První možná teorie je částečně diskutována výše a vychází z pozorování, kdy jsou nádorové buňky schopny podstupovat EMT a díky tomu získávají charakteristiku invazivních buněk s migračním fenotypem. Další podklad této teorie vychází z *in vitro* modelování. CAFs jsou schopny indukovat v normálních keratinocytech současnou expresi vimentinu a keratinů a navodit tím jejich EMT s průkazem exprese transkripčního faktoru Snail, který tento proces řídí (197–200). Dalo by se tedy usuzovat, že buňky invazivní fronty, které podstoupí EMT, mohou následně vytvářet nejen metastatická vzdálená ložiska, ale přispívat i k formování CAFs (26). Již zmíněné genetické studie, ale neprokázaly identické somatické mutace v nádorových buňkách a CAFs a role EMT ve vzniku CAFs je tedy předmětem diskuze a dalšího studia (186,194,195).

Druhá teorie popisuje schopnost nádorového klonu ovlivňovat funkci okolního mezenchymu, který se již v iniciální fázi růstu nádoru dostává do těsného kontaktu nádorových buněk. Ukazuje se, že epitelově mezenchymové interakce jsou zásadní pro správný vývoj tkání během embryogeneze, ale i během udržování homeostázy při reparativních mechanismech a obnově tkání. Tyto mechanismy ale hrají klíčovou roli i v udržování a potencování nádorového klonu (201–203). Jednoznačný a uniformně akceptovaný mechanismus vzniku CAFs z lokálního mezenchymu není doposud zcela objasněn, lze předpokládat roli nádorového klonu s produkcí celé řady bioaktivních látek, které tyto změny lokálního mezenchymu mohou navodit (27). Poměrně dobře je zdokumentována role TGF- β , u kterého je experimentálně ověřena schopnost

transformovat normální fibroblasty v myofibroblasty s typickou expresí α -SMA (186,204). Synergický efekt byl pozorován i při detekci a použití galektinu-1, který je navíc sám o sobě schopen navodit transformaci fibroblastů v myofibroblasty. Expres galektinu-1 v nádorech je spojena s horší prognózou a stromatem bohatším na α -SMA pozitivní fibroblasty (205,206). Schopnost utvářet si nádorové stroma z lokálního mezenchymu dokládají i *in vivo* myší modely, kdy po aplikování nádorových buněk do imunogenních *nu/nu* myší vznikají CAFs z lokálního mezenchymu. Tento experiment dokládá exprese pouze specifického klonu myšího vimentinu ve stromatu takto implantovaných nádorů (207).

Třetí teorie poukazuje na přítomnost ektopické kostní či chrupavčité tkáně v dediferencovaných karcinomech mléčné žlázy. Tato pozorování nabízí domněnku, že na tvorbě nádorového stromatu a na původu CAFs se mohou podílet i buňky s charakterem mezenchymových kmenových buněk a schopností diferencovat se do jiných buněčných typů (208–210). V této souvislosti se uvažuje o roli cirkulujících mezenchymových kmenových buňkách (dále jako MSCs, anglicky: Mesenchymal Stem Cells), jejichž charakteristiky jsou podobné MSCs odvozených z kostní dřene, ale u zdravých jedinců existují ve velmi nízkém množství. Bylo prokázáno, že MSCs jsou schopny migrovat na místa poškození a podílet se na reparativních procesech a udržování homeostázy (211). Schopnost utvářet nádorové stroma ukazují experimentální práce s MSCs v kombinaci s nádorovými buňkami. V experimentu při implantaci směsné kultury nádorových buněk, MSCs a samotných nádorových buněk docházelo k signifikantnímu nárůstu metastatických a implantačních ložisek při použití směsné kultury (nádorových buněk a MSCs) (212). Kondiciované médium obohacené o bioaktivní látky po kultivaci různých nádorových buněk je schopné vyvolat expresi α -SMA, SDF-1 a vimentinu v MSCs. Tato práce poukazuje na plasticitu MSCs a možnou transformaci v CAFs (213).

I když je v nádorové biologii věnována pozornost CAFs poměrně dlouho (od 90. let minulého století), podobné práce věnované problematice CAFs v biologii melanomu se objevují teprve v nedávné době. Jak bylo zmíněno v úvodu této kapitoly CAFs jsou schopny indukovat v normálních keratinocytech fenotyp podobný epidermálním kmenovým buňkám a buňkám v EMT. Podobné změny byly prokázány v obdobném experimentu CAFs z melanomu při kultivaci s normálními keratinocyty, kde byla následně prokázána zvýšená exprese keratinu 14 a ko-exprese keratinů a vimentinu v keratinocytech (199). Tento experiment poukazuje na určité uniformní biologické chování CAFs, který byl dokumentován i ve studii s nádorovou linií EM-G3. Tato linie

byla izolována z invazivního duktálního karcinomu mléčné žlázy. EM-G3 linie byla vystavena v kultuře vlivu CAFs izolovaných z bazaliomu, spinocelulárního karcinomu orální sliznice a melanomu v porovnání s normálními dermálními fibroblasty a embryonálními myšími fibroblasty 3T3. Všechny tři původem rozdílné CAFs měly na linii EM-G3 významný, a navíc podobný vliv, v indukci exprese keratinu 8 a 14 i s jejich vzájemnou ko-expresí oproti kontrole. Tento poměrně jednoduchý experiment dokazuje obdobné biologické chování, které by potencionálně bylo možné cíleně blokovat (198). Další práce dokládá možnost modifikovat nádorové mikroprostředí melanomu pomocí CAFs. Tyto možnosti byly popsány v experimentu při kultivaci dediferencovaných melanomových linií, které během izolace a následné standardní kultivace ztratily expresi typických melanocytárních markerů (HMB45, Melan-A a tyrozináza). Při i krátkodobé kultivaci těchto melanomových linií s CAFs z melanomu, došlo k opětovné indukci exprese HMB45, Melan-A a tyrozinázy. Navíc se podařilo obnovit fenotyp nádorových buněk, který byl přítomen i v primárním melanomu a v jaterní metastáze melanomu u pacienta ze kterého byla linie izolována (38). Další práce poukazují na vliv CAFs na agresivitu a maligní fenotyp melanomových buněk na které se podílí expresí TRAF6 v přiléhajících CAFs u nádorových melanocytů. Expese TRAF6 i v melanomových buňkách podporuje expresi α -SMA v CAFs a jejich proliferaci. Dále byl identifikován pravděpodobně klíčový cytokin, který je za expresi TRAF6 odpovědný. Jedná se o FGF19, jehož elevaci lze detekovat i v séru pacientů s generalizovaným melanomem. Tyto výsledky poukazují na zajímavou molekulu, která je odpovědná za interakce nádorových buněk a CAFs (214). Potencionální možnosti blokování funkce CAFs popisuje i práce věnovaná roli signalizace β -kateninu. Ztráta této signalizace je schopna deaktivovat CAFs a následně snížit i sekreci parakrinních faktorů včetně produkce ECM. V této studii byla v rámci *in vitro* a *in vivo* modelování prokázána neschopnost CAFs reagovat na vliv melanomových buněk, ale i jejich opačnou podporu, při cílené ablaci β -kateninu v CAFs. Poměrně významné zjištění této studie poukázalo i na sníženou aktivitu MAP kinázové intracelulární signalizace po ztrátě exprese β -kateninu v melanomu (215). V navazující práci byl ale prokázán vliv deaktivace β -kateninu v CAFs u teprve formujícího se melanomu, kde paradoxně dochází k následnému potencování dalšího nádorového růstu. V této studii se podařilo popsat souběžnou jadernou expresi YAP (Yes-associated protein), která je ovlivněna signalizační dráhou Wnt/ β -katenin a podílí se na biologickém chování CAFs v melanomu. Tato signalizace je odpovědná za produkci ECM a proteinů, které se podílejí na její remodelaci. Cílená deaktivace proteinu YAP je

schopna snížit až blokovat tyto funkce CAFs v nádorovém mikroprostředí melanomu (216). Tyto studie poukazují na význam CAFs a jejich vliv v rámci nádorového mikroprostředí a možnosti cílené blokace funkcí CAFs při hledání nových terapeutických přístupů.

Možnost blokování biologické funkce CAFs umocňují práce popisující vliv CAFs při vzniku rezistence jak na cílenou léčbu, tak vliv na imunitní vlastnosti nádorového mikroprostředí a rezistenci na *checkpoint* inhibitory. Bylo zdokumentováno, že nádorové melanocyty pod vlivem cílené terapie BRAF inhibitory produkují ve zvýšené míře TGF- β , který je schopen ovlivnit diferenciaci fibroblastů v myofibroblasty (186,205). Tyto aktivované fibroblasty mají zvýšenou expresi neuregulinu 1 (NRG1) a fibronektinu. Fibronektin zvyšuje mezibuněčnou interakci nádorových melanocytů prostřednictvím integrinu P1 a P3. Zvýšená exprese fibronektinu stimuluje vazbu na receptorech EGFR a ERBB3. Takto zprostředkovaná vazba aktivuje signalizační dráhu PI3K/AKT/mTOR, která je schopna obejít MAP kinázovou signalizaci cíleně inhibovanou BRAF a MEK inhibitory (217–219). TGF- β stimulované fibroblasty jsou schopny produkce hepatocytárního růstového faktoru (dále jako HGF, anglicky: Hepatocyte Growth Factor), který se může vázat na receptor MET a opět tak aktivovat alternativní cestu v MAP kinázové signalizaci. Navíc byl prokázán vliv BRAF inhibitorů s aktivací MAP kinázové signalizace i v CAFs, což může přispívat k obraným buněčným mechanismům (220). Popsaná aktivace signální dráhy Wnt/ β -katenin se ukazuje i jako slibný cíl pro blokování CAFs v rámci terapie BRAF inhibitory. V myším modelu bylo prokázáno potlačení vzniku melanomu (BRAF aktivovaného, PTEN deficientního) po cílené blokaci β -kateninu. Navíc se podařilo prokázat snížení aktivace fosforylované kinázy ERK 1/2 a AKT, které jsou aktivovány alternativní cestou při blokování MAP kinázové signalizace v rámci terapie BRAF inhibitory (221).

Rozšíření terapeutických možností pomocí *checkpoint* inhibitorů přináší klíčové otázky studia mechanismů rezistence a význam vlivu nádorového mikroprostředí včetně CAFs v imunologických pochodech melanomu. Význam CAFs při ovlivnění imunitního stavu nádorového mikroprostředí dokládá již jedna z prvních prací věnovaná problematice CAFs v melanomu. Balsamo a jeho spolupracovníci popisují schopnost CAFs ovlivnit expresi povrchových molekul NK buněk, zodpovědných za buněčnou cytotoxicitu. Tímto mechanismem může docházet k významnému snížení protinádorové imunitní odpovědi, která je při terapii *checkpoint* inhibitory klíčová (180). Základní mechanismy imunomodulačního vlivu CAFs jsou zatím zdokumentovány jen částečně, i

když je známo že CAFs produkují celou řadu prozánětlivých cytokinů a chemokinů jako je IL-6 a IL-8 či CXCL-1 (222). V další studii věnované problematice NK buněk v biologii melanomu je popsán vliv CAFs na sníženou lýzu nádorových melanocytů zprostředkovanou aktivací MMP. Tato sekrece snižuje expresi dvou NKG2D ligandů a to, MICA a MICB na povrchu melanomových buněk a následně dochází ke snížení NKG2D-dependentní cytotoxické aktivity NK buněk (223).

Pro terapeutickou odpověď na anti-PD-1 *checkpoint* inhibitory je u řady nádorů (např. karcinom plic) nezbytná dostatečná míra exprese PD-L1 v nádorových buňkách (224). V případě melanomu není pro terapeutickou odpověď na *checkpoint* inhibitory tolik zásadní míra exprese PD-L1, ale při vyšší expresi lze očekávat i lepší terapeutický efekt, i když se nejedná o jediný určující biomarker terapeutické odpovědi (225,226). Vzhledem k výše popsaným studiím, kde CAFs spíše snižují imunitní vlastnosti nádoru jsou poměrně zajímavé práce popisující vliv CAFs na expresi PD-L1 v melanomových buňkách. Ve studii Li a jeho spolupracovníků byla popsána korelace přítomnosti CAFs a PD-L1 v myším modelu melanomu. Navíc byl prokázán přímý vliv CAFs na podporu exprese PD-L1 produkcí CXCL5 i s následnou inhibicí při blokování receptoru CXCR2. Samotný mechanismus indukce exprese PD-L1 pomocí CXCL5 byl zprostředkován aktivací signalizace PI3K/AKT. Imunosupresivní působení CAFs na melanomové buňky a jeho blokování představuje tak potenciální terapeutický cíl pro budoucí možnosti terapie melanomu (227).

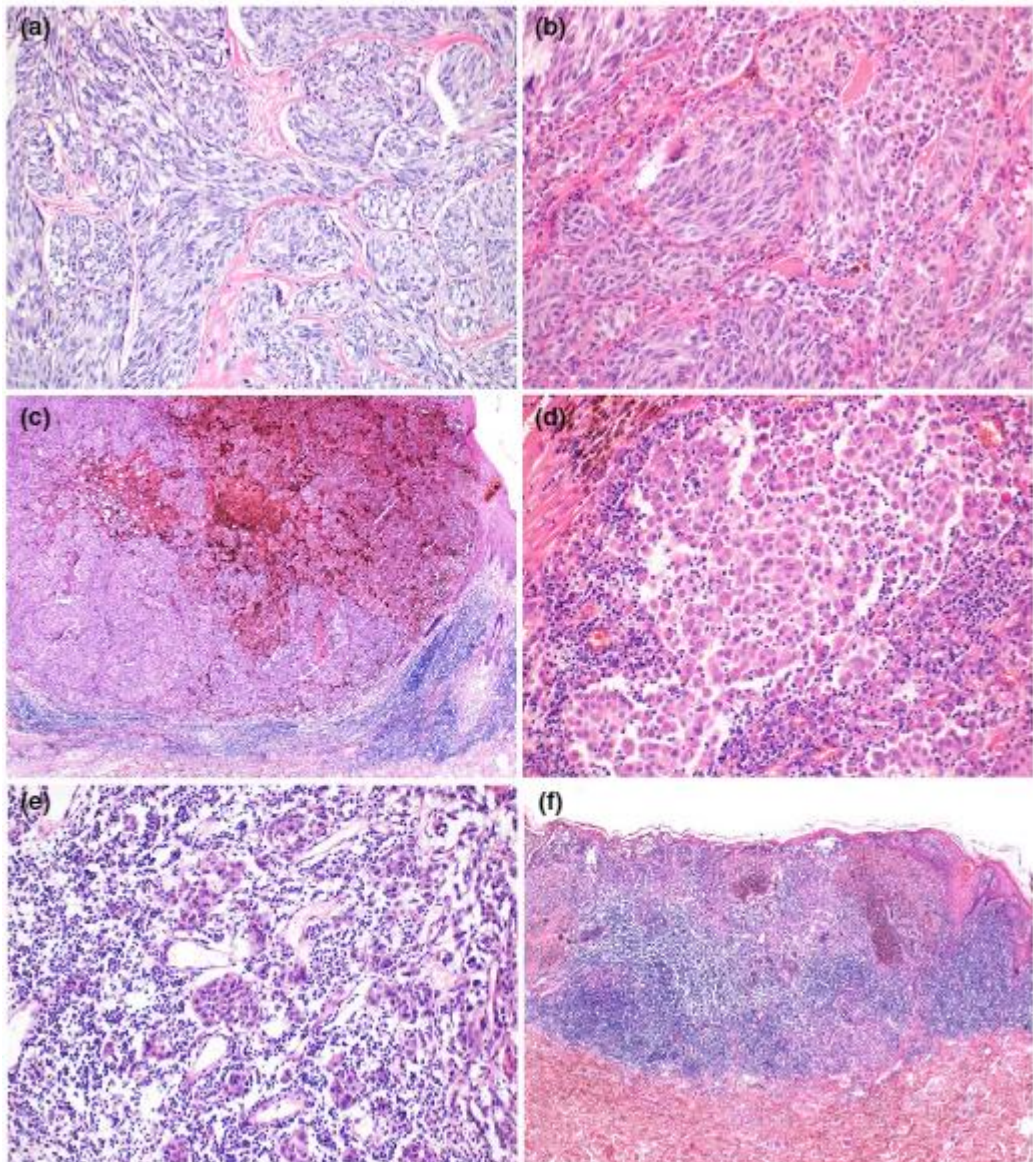
Úzké interakce mezi melanomovými buňkami a CAFs v rámci mikroprostředí melanomu představují slibné cíle pro vývoj imunoterapie melanomu. V nádorovém myším modelu včetně melanomu byl použit anti-fibrotický efekt tranilastu (lék s využitím k terapii keloidních a hypertrofických jizev) k cílené inhibici CAFs. Následná infiltrace imunitních supresorových buněk, včetně regulačních T lymfocytů a myeloidních supresorových buněk byla účinně snížena prostřednictvím exprese SDF-1, prostaglandinu E2 a TGF- β . V lymfatických uzlinách byly tyto imunitní supresorové buněčné typy významně sníženy, což vedlo k aktivaci nádorově asociovaných antigen-specifických CD8⁺ T-lymfocytů. Navíc terapie zaměřená na CAFs synergicky zvýšila cytotoxickou CD8⁺ T-buněčnou odpověď, kterou lze potencovat např. vakcínami založenými na dendritických buňkách (228).

4.3.2. Nádor infiltrující lymfocyty, TILs

Melanom je považován za jeden z nejvíce imunogenních nádorů a poměrně často lze v histologickém vyšetření prokázat velké množství imunitních buněk (různé typy T-lymfocytů, dendritických buněk, makrofágů, neutrofilů, žírných buněk, ale i B-lymfocytů). Tyto zánětlivé buňky mohou odrážet nepřetržitou komunikaci mezi pacientem a samotným nádorem. Zhodnocení samotného infiltrátu v bioptických nálezech je rutinní záležitostí při histopatologickém vyšetření.

T-lymfocyty, které lze detekovat v nádoru se obecně označují jako TILs a zahrnují podskupiny lymfocytů v různých poměrech v závislosti na samotném biologickém chování nádorových buněk a nádorového stromatu s produkcí řady cytokiny a chemoatraktivních látek. K TILs řadíme podskupiny CD8⁺ T-lymfocytů, CD4⁺ T-lymfocytů, NK buňky, ale i B-lymfocyty, a i když není zcela zřejmé, jak dochází k samotné primární infiltraci nádoru, může být přítomnost TILs zcela zásadní pro další imunologické chování melanomu. T-lymfocyty hrají hlavní roli v protinádorových imunitních reakcích a jsou dominantními prvky v mikroprostředí nádoru, a to i melanomu. V mnoha případech je velký infiltrát TILs spojený s lepší celkovou prognózou pacientů s melanomem. Pro hodnocení infiltrátu TILs existuje několik různých metodik vycházejících z rutinního histopatologického vyšetření. V současné době asi nejdiskutovanější systém hodnocení TILs byl vytvořen „mezinárodní pracovní skupinou pro imunologické onkologické biomarkery“ (IIOBWG) pro hodnocení TILs v solidních nádorech. Jedná se o systém založený na standardizované metodice hodnocení TILs původně vyvinuté pro karcinom mléčné žlázy a obecně pro solidní tumory (229). Systém hodnotí procento (hustotu) infiltrace lymfocytů samostatně ve složce stromální a v místě nádorových buněk. Vyhodnocuje se invazivní okraj a centrální část nádoru. Invazivní okraj je definován jako úsek délky 1 mm středové části nádoru od rozhraní mezi nádorovými buňkami a nepostiženou tkání. Centrální část nádoru představuje zbývající oblast nádoru. TILs bezprostředně sousedící s invazivním okrajem nádoru označujeme jako peritumorální. Následně lze TILs rozdělit do tří kategorií („gradů“). Stupeň 0 představuje zastoupení TILs 0% - 5%, stupeň 1 = 6% - 15%, stupeň 2 = více než 15% (229,230). Tento systém má však nevýhodu při použití u malých nádorů (i melanomů), kde nelze spolehlivě rozlišit invazivní a centrální část nádoru (231). Ve studii, kde bylo porovnáno 5 různých systémů hodnocení TILs (Clarkovo skóre (232), systém australského melanomového institutu (233), skórovací systém použitý ve studii Saldanha

et al. (234), skórovací systém ze studie TCGA modifikovaný dle Park a Kima (235) a výše zmíněný systém IIOBWG (229,230)) byl prokázán prognostický význam při hodnocení s onemocněním specifického přežití (dále jako DFS, Disease Free Survival), přežitím do lokální progresse (dále jako LRFS, anglicky: Local Recurrence Free Survival) a přežitím do vzniku vzdálených metastáz (dále jako MFS, anglicky: Metastatic Free Survival). Statisticky významného výsledku bylo dosaženo, pouze u tří zvolených metodik (Clarkovo skóre, australský systém a IIOBWG). V korelaci s jinými biomarkery se nepodařilo prokázat TILs, jako samostatný prognostický biomarker (231). I když prognosticky výpovědní hodnota nemusí být statisticky zcela jednoznačná, hodnocení TILs je pro klinické využití a imuno-onkologický směr léčby poměrně zásadní. V této souvislosti se v současné době setkáváme s termínem tzv. horký a studený nádor (*hot vs. cold tumor*). Jedná se o zjednodušené označení a rozlišení nádorů s bohatým a hustým infiltrátem imunitních buněk a nádorů, kde imunitní buňky nacházíme v malém nebo prakticky žádném zastoupení. Nádory, a to i melanom, s bohatším infiltrátem imunitních buněk jsou daleko více zajímavé pro imunitní systém a mají i lepší terapeutickou odpověď na terapii *checkpoint* inhibitory (Obr. 9). Samotný mechanismus u srovnatelných nádorů vysvětlující rozdílnou míru zastoupení imunitních buněk v nádoru není doposud jednoznačně pochopen, nicméně objevují se práce s cílem zvrátit nepříznivé imunologické chování nádoru z imunitně chudého stavu k bohatší imunologické infiltraci nádorů a následně lepší terapeutické odpovědi (236,237).



Obr. 9: Přehled možných forem histologických nálezů TILs v melanomu. a) Melanom bez TILs (*cold tumor*), H&E 100x; b) mírný infiltrát ve stromatu melanomu, H&E 100x; c) peritumorózní infiltrát, H&E 40x; d) výrazná infiltrace TILs stromatu s rozptýlenými TILs uvnitř hnízd nádorových melanocytů, H&E 200x; e) Masivní infiltrace TILs stromatu, jen ojedinělé TILs v okolí nádorových hnízd, H&E 100x; f) Masivní infiltrace TILs stromatu i v okolí nádorových buněk, H&E 20x. Obrázek použit z práce Němejcová et al. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 2019 May;32(3):412-423 (182).

Zcela zásadní pro aktivaci imunitního systému a infiltrace nádoru imunitním systémem je schopnost v dostatečné míře produkovat antigeny, které následně imunitní systém rozpoznává. V případě melanomu se jedná o specifické antigeny, které produkují nádorové melanocyty (nádorové buňky) tzv. nádorově specifické antigeny (dále jako

TSA, anglicky: Tumor Specific Antigens) a nádorově asociované antigeny (dále jako TAA, anglicky: Tumor Associated Antigens), které nacházíme na nádorových buňkách. TSA jsou také označovány jako neoantigeny, protože se jedná o nově vytvořené antigeny, které se nenacházejí v normálním lidském genomu (238). TSA vykazují vysokou imunogenitu, indukují a aktivují T-lymfocyty, které nejsou ovlivněny centrální imunologickou tolerancí a udržují po určitou dobu účinnou adaptivní protinádorovou aktivitu. V nádorové biologii existuje extrémně velké množství možných mutací, tedy každý nádor, ale i v rámci jednoho pacienta je unikátní, k čemuž přispívá i intratumorózní heterogenita (239). Na druhé straně se TAA vyskytují převážně v nádorových buňkách (melanocytech), ale mohou být také exprimovány normálními melanocyty. Buňky melanomu nejčastěji exprimují pouze MHC třídy I. a neexprimují molekuly MHC třídy II. TAA nejsou schopny indukovat ideální cytotoxickou reakci T-lymfocytů a neaktivují tvorbu nádorově specifických CD4⁺ T-lymfocytů a protilátek (238,239). Rozpoznání nádorových neoantigenů je zprostředkováno pomocí dendritických buněk (dále jako DC, anglicky: Dendritic Cell), které jako jedny z prvních dosahují nádoru a hrají klíčovou roli při iniciaci a regulaci vrozené i adaptivní imunity a po zpracování antigenů asociovaných s nádorem indukují specifickou protinádorovou imunitní odpověď. Nádorové antigeny jsou prezentovány na CD8⁺ T-lymfocyty molekulami MHC I. třídy a na CD4⁺ T-lymfocyty molekulami MHC II. třídy. Aby se dosáhlo silné protinádorové imunitní odpovědi T-lymfocytů, musí být prezentace antigenů účinně prováděna zralými DC, které mohou přispívat k cytotoxické imunitní reakci aktivací NK buněk (240). V nádorovém mikroprostředí jsou produkovány faktory (IL-8, IL-10, TGF-β1 a VEGF), které mohou ovlivnit vyzrávání DC ve snaze vyhnout se imunitní odpovědi (241). V ideální situaci vedou antigen prezentující buňky k aktivaci efektorových paměťových T-lymfocytů v lymfatických uzlinách, které zprostředkovávají protinádorové účinky v místě nádoru. Po rozpoznání antigenu prezentovaného antigen prezentující buňkou např. DC, je nutná plná aktivace imunitního systému několika kroky. První signál závisí na antigenu a je představován komplexem MHC I. třídy nebo II. třídy s prezentovaným peptidem, který se váže na receptor T-lymfocytů (dále jako TCR, anglicky: T-cell receptor). Nedostatečně prezentovaný antigen na antigen prezentujících buňkách nemůže aktivovat T-lymfocyty a vyvolat imunologickou cílenou odpověď. Adhezní molekuly odpovědné za mezibuněčné spoje jsou schopny udržet buněčné kontakty s podporou aktivace co největšího počtu TCR receptorů na T-lymfocytech. U metastatického melanomu byla pozorována různorodost TCR receptorů, což lze vysvětlit výběrem T-lymfocytů

namířených proti různým nádorovým antigenům nebo proti různým epitopům ze stejného antigenu (242). Druhý signál aktivace imunitního systému je na antigenu nezávislý a aktivace vyžaduje specifickou interakci mezi receptory T-lymfocytů, jejich ligandů a receptory antigen prezentujících buněk (z rodiny CD28 / B7) (243). Tyto receptory jsou dvou typů: ko-stimulační nebo ko-inhibiční. Mnoho receptorových ligandů se může vázat na více receptorů každého typu. Souhra mezi ko-stimulačními receptory a jejich ligandy zcela aktivuje T-lymfocyty a indukuje produkci nádorově specifických T-lymfocytů (244). Za normálních podmínek jsou ko-inhibiční receptory PD-1, CTLA-4, attenuátor B- a T-lymfocytů (BTLA) a receptor TIM-3, známé jako „imunitní kontrolní (*checkpoint*) molekuly“ a jejich ligandy PD-L1, PD-L2, CD80, CD86, herpesvirus vstupní mediátor (HVEM) a galektin 9. Tyto receptory a ligandy inhibují aktivitu T-lymfocytů a podílejí se na udržování imunitní tolerance, modulaci intenzity a trvání imunitní odpovědi. Aktivace *checkpoint* inhibičních receptorů a jejich ligandů nádorovými buňkami je pomáhá chránit před imunitním útokem a umožňuje jim dále proliferovat (242). Třetí možností aktivace T-lymfocytů pomocí antigen prezentujících buněk je aktivace zprostředkována také TNF a jejich receptory, prostřednictvím různorodých cytokinů produkovaných v nádorovém mikroprostředí (TGF- β , IL-1, IL-10, IL-12, IL-18) a pomocí molekul inhibujících imunitu, jako jsou metabolické enzymy, které připravují lymfocyty o nezbytné aminokyseliny (indoleamin 2,3-dioxygenáza, IDO) (150,245,246). Jedná se o molekuly představující nové terapeutické cíle imuno-onkologické terapie. Tyto práce poukazují, že imunitní systém může modifikovat interakce mezi ko-stimulačními a ko-inhibičními signály k potlačení nádorového klonu, ale potlačení zprostředkované aktivací signálu od antigenu k imunitní odpovědi však může podporovat i progresi nádoru. Neoantigeny (TSA) vytváří vysoce specifické CD8⁺ T-lymfocyty s protinádorovou odpovědí. TAA mohou indukovat nádorově specifické CD8⁺, CD4⁺ T-lymfocyty a specifické protilátky proti TAA (247). CD8⁺ efektorové T-lymfocyty (nebo cytotoxické T-lymfocyty) inhibují nádorovou proliferaci, buď přímým cytolytickým působením na nádorové buňky nebo uvolněním interferonu- γ (dále jako IFN- γ , anglicky: interferon- γ) a TNF- α , navíc vyšší hladiny IFN- γ jsou spojeny s lepší terapeutickou odpovědí na *checkpoint* inhibitory (248). Na základě rovnováhy mezi ko-stimulačními a ko-inhibičními signály z mikroprostředí mohou navíc CD8⁺ T-lymfocyty vykazovat různé funkční stavy (238). Ke stimulaci CD8⁺ T-lymfocytů napomáhají CD4⁺ T-lymfocyty, které rozlišujeme ve čtyřech hlavních typech a v různém stavu a počtu ve fyziologických, ale i patologických procesech. Rozlišujeme Th₁, Th₂,

Th₁₇ a Treg CD4⁺ T-lymfocyty. Th₁ a Th₂ lymfocyty pomáhají v protinádorové imunitní odpovědi a stimulací CD8⁺ T-lymfocytů pomocí produkce řady mediátorů jako je IFN- γ , TGF- β a IL-2 (249). Th₁ mohou účinně aktivovat i makrofágy a podílejí se na vyžrávání DC, naproti tomu Th₂ odpovídají za aktivaci eozinofilů (250). Th₁₇ lymfocyty mají dvě antagonistické formy. Vlivem nádorového mikroprostředí se mohou transformovat na Th₁ lymfocyty s protinádorovým efektem, zatímco jiné podmínky přispívají k transformaci na regulační T-lymfocyty a mohou podpořit nádorovou progresi (251). Regulační T-lymfocyty (CD25 / FoxP3 potlačující T-lymfocyty, Treg) jsou podtypem T-lymfocytů, které mají klíčovou roli v prevenci autoimunitních onemocnění a prolomení imunitní tolerance. Jejich přítomnost v mikroprostředí nádoru významně inhibuje protinádorové imunitní odpovědi. Treg lymfocyty se aktivují po rozpoznání TAA uvolněných z nekrotických nádorových buněk. Poté specificky potlačují aktivaci efektorových T-lymfocytů specificky aktivovaných TAA a účinnou destrukci nádorových buněk regulací IL-10 a TGF- β (244,252,253). Kromě toho Treg lymfocyty mohou potlačovat imunitní odpověď působením na řadu i dalších typů buněk imunitního systému. Mezi nimi jsou CD8⁺ T-lymfocyty, NK buňky, B-lymfocyty, ale i antigen prezentující buňky, které mohou mít v aktivaci protinádorové imunitní odpovědi klíčový vliv (253). Existuje jen málo studií o prognostické roli Treg v melanomu. Byla zaznamenána souvislost mezi přítomností infiltrace Treg lymfocytů s lokální recidivou onemocnění (LRS), rychlou progresí melanomu, nebo vyšší mírou metastáz v sentinelové lymfatické uzlině, ale nebyla prokázána souvislost s hodnotou Breslowa nebo OS pacientů s melanomem (254–256). Ukazuje se, že poměr mezi různými podskupinami T-lymfocytů může poskytovat přesnější informace o lokální imunitní rovnováze. Nejčastěji se používají poměry CD8⁺/FoxP3 tedy poměr (efektor/regulátor) a poměr CD8⁺/CD4⁺ (efektor/pomocník) (257). Aby nádorové buňky zabránily imunitnímu útoku, potlačují tumor specifické efektorové CD8⁺ T-lymfocyty a indukují imunosupresivní vliv Treg lymfocytů, čímž snižují poměry CD8⁺/Treg. U pacientů léčených kombinací *checkpoint* inhibitory se poměr CD8⁺/Treg může v důsledku terapie zvýšit a přispět k terapeutické odpovědi, ale i ke zlepšení OS u pacientů s melanomem (258).

Další významnou komponentou jsou NK buňky. Řadíme je mezi efektorové buňky vrozeného imunitního systému a hrají zásadní roli v imunitním dohledu proti nádorovým buňkám. Nádorové buňky pomáhají likvidovat, ale neaktivují imunitní dohled pomocí molekul MHC tříd. NK buňky se také účastní regulace adaptivní imunitní reakce interakcemi s DC, které aktivují NK buňky a určují cytotoxickou imunitní

odpověď proti nádorovým buňkám. Nádorové buňky mohou překonat imunitní odpověď zprostředkovanou NK buňkami, zvýšenou expresí TGF- β , nízkou expresí TSA a TAA a zvýšenou expresí MHC molekul I. třídy (238,241). Prognostická role infiltrace NK buněk v melanomu nebyla hodnocena, zdá se však, že může hrát roli v omezení rozvoje hematogenních metastáz (259).

B-lymfocyty představují 15–20 % všech TILs, jejich přesná role v nádorovém mikroprostředí a v protinádorové imunitní odpovědi není přesně objasněna. Výraznější zastoupení B-lymfocytů bylo pozorováno u melanomů s vyšší hodnotou Breslowa a bylo spojeno i se sníženým rizikem tvorby vzdálených metastáz a delším přežitím (260). Role plazmatických buněk je prostudována ještě méně, ale objevují se práce, které se této problematice věnují. Bosisio a jeho spolupracovníci nedávno zdokumentovali signifikantně horší přežití u pacientů se shluky plazmatických buněk v primárních melanomech ve srovnání s lepším výsledkem v případech infiltrátu řídkých plazmatických buněk. Většina plazmatických buněk byla polyklonální a exprimovala převážně řetězce IgG a IgA (261).

Trvalá interakce mezi nádorem a imunitním systémem může vést k eliminaci maligních buněk s navozením remise onemocnění, rovnovážnému stavu či naopak úniku maligních buněk. Tento proces se v anglosaské literatuře označuje jako *immunoediting*. Přechod mezi těmito schopnostmi imunitního systému je přímo dán stavem (ale i „nastavením“) imunitního systému a aktivitou nádorových buněk. Pokud mechanismy vrozené i adaptivní imunity úspěšně odstraní nádorové buňky, je eliminace nádorových buněk ideální a konečnou fází „*immunoeditingu*“ (262). V některých případech nelze účinně eliminovat všechny nádorové buňky, ale imunitní systém je schopen alespoň potlačit jejich proliferaci natolik, že dochází k navození rovnovážného stavu. Latentní nádorové buňky mohou zůstat v klidovém stavu po různá časová období (263). Nádorové buňky včetně buněk melanomu se mohou pasivně vyhýbat nebo aktivně potlačit protinádorovou imunitní odpověď prostřednictvím několika mechanismů:

- i) snížením tvorby (*downregulací*) TAA;
- ii) vyvoláním vyčerpání T-lymfocytů zvýšenou expozicí TSA;
- iii) nízkou expresí molekul MHC I. třídy;
- iv) snahou vyhnout se rozpoznávání NK buňkami a schopností snížit jejich cytolytickou aktivitu;
- v) zabráněním indukce apoptózy T-lymfocytů vazbou ligandů Fas-Fas;

- vi) schopností aktivace Treg lymfocytů;
- vii) produkcí inhibičních signálních molekul se schopností navodit imunologickou toleranci;
- viii) zesílenou expresí imunitních kontrolních (*checkpoint*) proteinů, které je chrání před útokem T-lymfocytů nebo makrofágů (238,263).

Výše zdokumentované postupy poukazují na komplexní schopnosti nádorových buněk unikat imunologickým mechanismům, které by vedly ke zničení nádorového klonu (dále kapitola 5.2.).

4.3.3. Nádorově asociované makrofágy, TAMs

Nádorově asociované makrofágy (TAMs) jsou heterogenní skupinou buněk se schopností prezentovat na svém povrchu antigeny a představují jednu z dominantních složek imunitního systému, která infiltruje a významně modifikuje nádorové mikroprostředí. Nacházejí se ve všech stádiích solidních nádorů včetně melanomu (264). Na základě různorodé signalizace z mikroprostředí nádoru (ale i na podkladě infekčních faktorů, či na podkladě léčebných modalit) mohou makrofágy mít antagonistické funkční vlastnosti a mohou plasticky podstupovat reprogramování do polarizovaného fenotypu (265). Makrofágy lze detekovat ve dvou fenotypových variantách, a to M₁ makrofágy, tzv. klasický typ, které mají významné antigen prezentující vlastnosti, mohou produkovat Th₁ cytokiny a působit protinádorově. Makrofágy M₂ mají nízkou schopnost prezentovat antigen, navíc inhibují aktivitu CD8⁺ T-lymfocytů a NK buněk, stimuluje přechod na Th₂ lymfocyty, podporují regulaci Treg lymfocytů a migraci nádorových buněk (174,264,266). Během růstu a progresu nádoru, vlivem jak nádorových buněk, tak i nádorového mikroprostředí, se makrofágy mění z fenotypu M₁ na M₂ (241). Falleni a jeho spolupracovníci dokumentovali zastoupení M₁ a M₂ makrofágů v 94 primárních melanomech stadia I-IV a provedli podrobnou klinicko-patologickou korelaci těchto nálezů. M₁ makrofágy byly charakterizovány ko-expresí CD68 a MRP8-14, zatímco M₂ makrofágy exprimovaly CD163 nebo CD204 markery. Již v melanomech s nižší hodnotou Breslowa byly výrazněji zastoupeny TAMs fenotypu M₂ než M₁. Navíc infiltrace melanomů M₂ makrofágy stoupala při progresi onemocnění a lze předpokládat, že mohou i cíleně podporovat progresi melanomu. Tato pozorování podporuje i statisticky doložená horší prognóza pacientů s melanomem s vyšším intratumorálním infiltrátem

M₂ makrofágů. Dalším výsledkem této studie je důkaz, že k přeměně M₁ makrofágů na M₂ dochází již v raných stádiích melanomu (266). V jiné studii byla prokázána korelace mezi hustotou infiltrace TAMs v melanomu a hodnotou Breslowa a navíc přítomnou povrchovou ulcerací. V tomto případě ale nebyla prokázána žádná významná korelace s OS u pacientů s melanomem (267).

Monocyty získané z krevního oběhu se diferencují na tkáňové makrofágy faktorem stimulujícím kolonie makrofágů (dále jako M-CSF, anglicky: Macrophage Colony-Stimulating Factor) a jsou aktivovány několika cytokiny, jako je IFN- γ , IL-4 a IL-13 a následně mění svůj fenotyp, dle impulzů z nádorového mikroprostředí, s cílem podpořit nádorový klon. U melanomových buněk B16 bylo v *in vivo* modelování prokázáno při cílené blokaci M-CSF receptoru krátkou interferující RNA anti-CSF (siCD115), že následně může docházet ke změně a modifikování komplexní funkce TILs a k potlačení růstu buněk melanomu (268). V dalším způsobu aktivace se uplatňuje produkce interferonu a to IFN typu I (IFN- α , IFN- β) a IFN typu II (IFN- γ), které významně modulují produkci chemokinů z TAMs, což naznačuje, že tyto cytokiny mohou být odpovědné za repolarizaci TAMs u melanomu (269). Nádorové stromální faktory, jako je ligand rozpustného receptorového aktivátoru nukleárního faktoru kappa-B (dále jako RANKL, anglicky: Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand) produkovaný nádorovými buňkami, je dalším možným stimulačním mechanismem, který aktivuje zralé makrofágy M₂ k produkci řady chemokinů a cytokinů. Ty následně aktivují Treg a Th₂ lymfocyty, což vede k podpoře pro-nádorového mikroprostředí (269,270).

Řada chemokinů, ale i jiných bioaktivních molekul, hraje významnou roli při určování profilů a chování TILs v mikroprostředí nádoru. Podobně tomu tak je při produkci těchto molekul TAMs, které jsou jednou z významných součástí nádorového stromatu melanomu. Nádorové melanocyty, které za určitých podmínek exprimují periostin stimulují CD163⁺ makrofágy (M₂) k produkci specifických cytokinů, jako je CCL17 a CCL22. Tyto cytokiny stimulují Treg lymfocyty a podporují nádorovou progresi. Imunomodulační vliv TAMs může být potlačen např. INF- β nebo imiquimodem, podobně i snížení a potlačení exprese CCL22 může být navozeno celou řadou léčiv, jako jsou běžná chemoterapeutika používaná v léčbě melanomu po řadu let (dakarbazin, vinkristin, cykloplatina) (269,271,272). Další studie uvádí, že řada chemokinů produkovaných TAMs (CCL17, CXCL10, CCL4 a IL-8), které mohou být přítomné nejen v nádorovém mikroprostředí, ale i např. v mozkomíšním moku, mohou potencovat tvorbu mozkových metastáz (273).

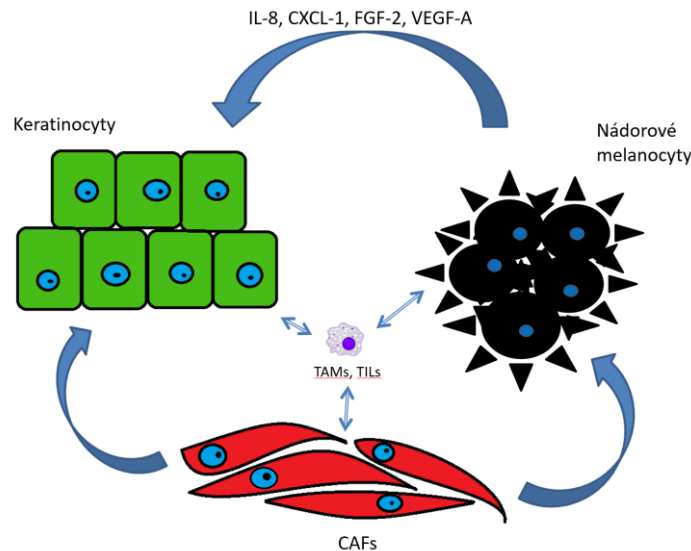
TAMs hrají významnou roli i v imunosupresivním účinku a imunologické toleranci. Tato funkce je zprostředkována především prostřednictvím exprese PD-L1, která je nezbytná pro antigen-specifickou toleranci. Exprese PD-L1 na TAMs je zvýšena autokrinní produkcí IL-10 z M₂ polarizovaných TAMs stimulovaných specifickými nádorovými antigeny, navíc pokles exprese IL-10 v prekurzorových myeloidních supresorových buňkách vedla ke snížení regulace exprese PD-L1 v myším melanomovém modelu (274,275). Tyto práce poukazují na význam exprese IL-10, který zvyšuje expresi PD-L1 na TAMs, což vyvolává obranné imunosupresivní chování v mikroprostředí melanomu. Imunomodulační efekt TAMs podporuje i práce, která dokumentuje obdobné účinky ipilimumabu (anti-CTLA-4) na granulocytové prekurzory myeloidních supresorových buněk, s následnou podporou Treg lymfocytů a posílením imunosupresivních funkcí TAMs (276). Při komplexním pohledu na nádorové mikroprostředí jsou poměrně významné práce poukazující na vliv protinádorové léčebné modalit na ovlivnění TAMs. Při cílené terapii BRAF inhibitorem dabrafenibem byl prokázán nárůst TAMs a Treg lymfocytů ve stromatu melanomu a naopak došlo k jejich poklesu přidáním MEK inhibitoru trametinibu k terapii, což podporuje možný synergický efekt v případné kombinaci *checkpoint* inhibitorů a cílené terapie (277). V další práci věnované efektu současné terapie popsal Gordon a jeho kolegové, že inhibice PD-1/PD-L1 v *in vivo* modelu potencovala fagocytózu makrofágů a navíc byl potlačen růst nádoru s podporou přežívání makrofágů (278). Samotná exprese PD-L1 v TAMs ve stromatu melanomu může být patrná dlouhodobě i 2 měsíce po podání anti-PD-1 protilátek a může korelovat s terapeutickou odpovědí na *checkpoint* inhibitory (279).

Význam TAMs v nádorovém mikroprostředí potvrzují práce popisující vliv na produkci angiogenních faktorů, jako je VEGF, PDGF a TGF- β a expresi MMP k potencování neovaskularizace (270,280). Linde a jeho spolupracovníci poukazují na korelaci exprese VEGF-A a vyššího zastoupení TAMs v nádoru díky podpoře neovaskularizace v *in vivo* nádorovém myším modelu (280). Další práce dokumentuje možnou inhibici dráhy receptoru VEGF, která inhibuje polarizaci M₂ makrofágů, což vede ke snížené hustotě cév a následnému snížení růstu nádoru u myšího modelu sarkomu (MCA205) (281). Kromě toho nedávno Yamada a jeho spolupracovníci ověřili, že exprese MGF-E8 na mezenchymálních stromálních buňkách hraje klíčovou roli při indukci polarizace makrofágů v M₂ fenotyp, což vede k potlačení růstu nádoru snížením exprese VEGF v TAMs v melanomovém B16F10 modelu (282). Tyto studie dokazují význam VEGF, produkovaného makrofágy s M₂ fenotypem, při podpoře růstu a šíření

melanomu. I samotné melanomové buňky jsou schopny aktivací osteopontinové signalizace potencovat „nábor“ makrofágů. Následná sekrece prostaglandinu E2 a MMP-9 z TAMs přispívá k angiogenezi a progresi melanomu (283). Při formování nádorového mikroprostředí TAMs produkují chemokiny, které přímo chemotakticky přitahují buňky imunitního systému do mikroprostředí nádoru. TAMs produkují ale i cytokiny, které stimulují další stromální buňky, jako jsou CAFs, k produkci chemoaktivních molekul. Jedním z cytokinů je IL-1 β , který stimuluje fibroblasty k následné produkci receptoru beta pro IL-8 (dále jako CXCR2, anglicky: Interleukin 8 receptor, beta). CXCR2 potencuje aktivaci a vyžrávání makrofágů, navíc jeho blokování (anti-CD115 protilátkou) inhibuje růst melanomových buněk a potencuje vyčerpání nezralých makrofágů (284,285).

Výše zdokumentované vlastnosti TAMs dokazují jejich významný podíl na formování komplexního nádorového mikroprostředí melanomu, ale i jiných nádorů. TAMs pravděpodobně slouží v nádorovém mikroprostředí jako určitý regulátor přirozeného imunopresivního chování nádoru, ale nejspíš mají i schopnost významně ovlivňovat komplexnost nádorového stromatu včetně podpory neoangiogeneze či funkce CAFs. Celá řada prací popisujících funkce TAMs v biologii melanomu v nich vidí možný terapeutický cíl pro blokování významné komponenty nádorového mikroprostředí (271).

Výše popsané práce v této kapitole ukazují komplexnost jednotlivých součástí nádorového mikroprostředí melanomu, následující schéma je jednoduchým znázorněním této problematiky (Obr.10).



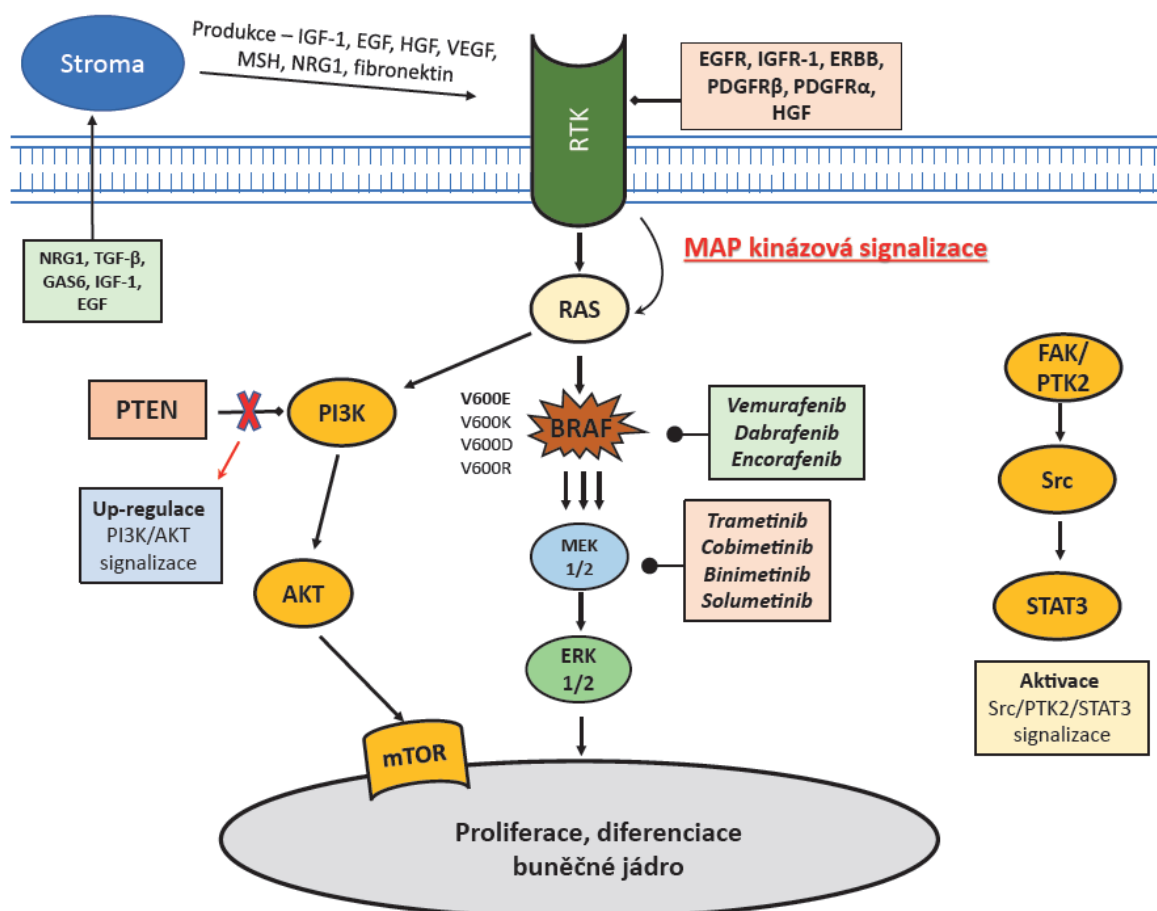
Obr. 10: Schéma znázorňuje vzájemné provázání nádorového mikroprostředí melanomu. Vliv nádorových melanocytů (resp. vliv IL-8, CXCL-1, FGF-2, VEGF-A) na okolní keratinocyty byl prokázán ve vlastním experimentu (45).

5. Nádorová rezistence a nádorové biomarkery melanomu

Soudobá léčebná schémata metastazujícího melanomu (cílená léčba BRAF a MEK inhibitory, léčba *checkpoint* inhibitory) přinesla obrovský pokrok do léčby melanomu a zlepšení PFS i OS pacientů s metastatickým postižením. Navzdory těmto pokrokům je ale řada pacientů, kteří z těchto léčebných modalit neprofitují a poměrně záhy (i přes prvotní terapeutickou odpověď) se u nich rozvíjí nádorová rezistence (získaná rezistence). U některých pacientů není dokonce terapeutická odpověď patrná vůbec, tento stav pak označujeme jako primární rezistenci, i když tento termín v biologii melanomu a hodnocení terapeutické odpovědi nebyl naplno ustálen (286). Prohlubující se znalosti z dlouhodobých klinických sledování nás přivádějí ke studiu vzniku nádorové rezistence, která představuje poměrně značnou zátěž pro pacienty a celý zdravotnický systém.

5.1. Rezistence melanomu na cílenou léčbu BRAF a MEK inhibitory

Cílená terapie BRAF a MEK inhibitory je již standardním pilířem terapie metastazujícího melanomu, která se opírá o zkušenosti s touto formou léčby z posledních deseti let. Poznatky vycházejí z několika multicentrických studií, kde byla prokázána terapeutická odpověď a signifikantní prodloužení OS a PFS jak při použití samotných BRAF inhibitorů (vemurafenib, dabrafenib, encorafenib), tak zejména v jejich kombinaci s MEK inhibitory (trametinib, cobimetinib, binimetinib, solumetinib) (110,117,287). Právě zavedením kombinované terapie BRAF a MEK inhibitory došlo k prodloužení PFS a OS a byla tak významně oddálena doba, kdy dochází ke vzniku nádorové (získané) rezistence (115,116). Na vzniku nádorové rezistence na cílenou léčbu se podílí celá řada faktorů, které lze rozdělit na faktory epigenetické, genetické a vliv nádorového mikroprostředí. Problematiku shrnuje obr. 11.



Obr. 11.: Vliv cílené terapie BRAF a MEK inhibitorů na MAP kinázovou signalizaci s vyznačením základních mechanismů vzniku nádorové rezistence na cílenou terapii, včetně alternativní signalizace PI3K/AKT/mTOR. *Obrázek modifikován dle původní publikace: Kodet O. Mechanismy rezistence na cílenou léčbu u maligního melanomu. Onkol. Revue. 2020; 7(2):1–6.*

5.1.1. Epigenetické změny ovlivňující mechanismy rezistence

Epigenetické a transkriptomické změny se podílejí až ve 40 % na vzniku rezistence při cílené terapii (288). MAP kinázová signalizační kaskáda (RAS/RAF/MEK/ERK) je aktivována různorodými ligandy vazbou na extracelulární doménu. Za fyziologických podmínek je tato signalizace řízena zpětnovazebnými mechanismy, které jsou u BRAF mutovaných nádorů významně potlačeny a tím dochází k dysregulaci této signalizace. Mechanismus zpětné vazby je zajištěn několika proteiny, jako je protein SPRY a SPRED, které souvisí s doménou EVH1. Tyto proteiny jsou aktivovány ERK1/2 kinázami, které působí jako represory RAS a RAF proteinů v MAP kinázové intracelulární signalizaci (289). V případě trvalé aktivace MAP kinázové signalizace u BRAF mutovaných melanomů jsou tyto zpětnovazebné proteiny sice také aktivovány, ale samotná regulace je významně alterována, k potlačení zpětné vazby dochází až při cílené inhibici BRAF a MEK inhibitory. Mechanismus je poměrně složitý, ale ukazuje se, že aktivace MAP kinázové signalizace u BRAF mutovaných melanomů je nezávislá na aktivaci proteinu RAS. Možná cílená terapie BRAF inhibitory inhibuje monomery RAF a zpětnou signalizaci ERK kináz, a následně tedy způsobuje i snížení zpětné vazby a reaktivaci MAP kinázové signalizace vazbou na různorodé ligandy (286). Jedním z nejvíce diskutovaných aktivátorů MAP kinázové signalizace je receptor pro epidermální růstový faktor (dále jako EGFR, anglicky: Epidermal Growth Factor Receptor) a receptor pro fibroblastový růstový faktor (dále jako FGFR, anglicky: Fibroblast Growth Factor Receptor), které jsou aktivovány právě pod vlivem BRAF inhibitorů a jsou schopny se vázat na extracelulární ligandy (290). Proteiny odpovědné za aktivaci MAP kinázy prostřednictvím EGFR signalizace (aktivace prostřednictvím RAS proteinu) se označují jako SPRED1 a SPRED2 a představují zajímavý cíl k terapeutickému překonání nádorové rezistence (87,290). Na vztah mezi expresí EGFR a cílenou terapií BRAF inhibitory poukazují studie na BRAF V600E pozitivních

kolorektálních karcinomech (5–8% všech kolorektálních karcinomů), kde exprese EGFR je odpovědná za významné snížení účinnosti nebo její selhání či neúčinnost (291). V biologii melanomu byla prokázána souvislost s expresí transkripčního faktoru SOX10 (SRY-box 10), který funguje jako negativní regulátor exprese EGFR. Melanomové buňky s nízkou expresí SOX10 (a následně vysokou expresí EGFR) vykazují zvýšenou rezistenci na BRAF inhibitory (292). Podobně jako EGFR mají významnou funkci receptory růstového faktoru odvozeného z destiček (dále jako PDGFR, anglicky: Platelet-Derived Growth Factor Receptor) A a B, které se podílí na rezistenci vůči BRAF inhibitorům interakcemi se *sonic hedgehog* (SHH) signalizací. SHH signalizace je odpovědná za buněčnou proliferaci v některých typech nádorů jako je např. bazocelulární karcinom kůže s možností cílené terapie vismodegibem (293). Signalizace SHH potencuje a aktivuje expresi proteinu Gli1, která je u BRAF V600E mutovaných melanomů potlačena. BRAF inhibitory naopak indukují expresi tohoto transkripčního faktoru Gli1 a následně aktivují SHH signalizaci a tím i buněčnou proliferaci. Transkripční faktor Gli1 podporuje i expresi PDGFR-A s další zvýšenou signalizací směrem k celé MAP kinázové dráze, navíc i s průkazem kratšího intervalu PFS (294). Tyto mechanismy rezistence podporují výsledky prací s použitím inhibitorů SHH signalizace (pomocí LDE-255) a cílenou inhibicí PDGFR-A s použitím sunitinibu (kinázový inhibitor PDGFR a VEGFR), které navozují opětovnou citlivost nádorových melanocytů na BRAF inhibitory (294–296). Uvedené studie demonstrují možné léčebné kombinace použitelné pro překonání mechanismů rezistence na terapii BRAF inhibitory.

Cílená léčba pomocí BRAF a MEK inhibitorů vede ke zvýšené aktivitě RAS kinázy, ta následně aktivuje signalační dráhu PI3K/AKT/mTOR, která je také odpovědná za buněčnou proliferaci a představuje alternativní buněčnou signalizaci vedle MAP kinázové dráhy (297,298). Významným aktivátorem PI3K/AKT/mTOR signalizace, která je přirozeným supresorem PI3K kinázy je mutace genu PTEN. Tato mutace může být spojena i s mutacemi BRAF V600E, ale nebyla popsána s mutacemi RAS genu (NRAS mutace) (298). Ztráta PTEN genu vede ke snížené apoptotické odezvě na BRAF inhibitory. Pacienti s BRAF V600E mutovaným melanomem, léčeni dabrafenibem a navíc s přítomnou mutací PTEN genu mají kratší PFS i OS a zvýšené riziko metastatického postižení CNS (299).

Další mechanismus rezistence na cílenou terapii je zaměřen na aktivitu MITF. MITF je významným faktorem při diferenciaci, proliferaci a přežívání melanocytů. Byla prokázána jeho snížená exprese v melanomových buňkách s mutací BRAF V600E a

naopak v případě vyšší exprese MITF je inhibována proliferace v těchto mutovaných melanocytech (300). Samotná exprese MITF dokazuje nádorovou plasticitu melanocytů a schopnost regulovat proliferaci a diferenciaci ve vztahu k zevním podmínkám (300). Proteiny, které mohou ovlivnit expresi MITF a tím být odpovědné za regulace diferenciaci a proliferaci, jsou např. protein CREB (cAMP response element-binding protein) vázaný na melanocyty stimulující hormon (dále jako MSH, anglicky: Melanocyte-Stimulating Hormone) nebo již diskutovaný transkripční faktor SOX10. Změny exprese těchto proteinů jsou pozorovány při vzniku rezistence na BRAF inhibitory, i když protein CREB snižuje expresi MITF a naopak SOX10 ji může zvýšit (301). Výše popsané mechanismy dokládají složitost a vzájemnou provázanost buněčných dějů, které vedou k rezistenci na cílenou léčbu a které představují soudobý problém léčby pacientů cílenou terapií BRAF a MEK inhibitory.

5.1.2. Genetické příčiny rezistence na cílenou léčbu

Genetické příčiny rezistence představují významný podíl jak primární, tak i získané rezistence. Mezi získané mechanismy patří mutace v NRAS genu, která je v melanomu přítomna asi v 8-25 % a mutace genu MAP2K (302). Díky (v předchozí kapitole 5.1.1.) popsaným mechanismům zpětné vazby, a především i pozorované toxicitě klinicky testovaných léčiv, je obtížné dosáhnout úplné farmakologické inhibice NRAS proteinu. V dosavadních studiích nebylo dosaženo klinicky tak jednoznačně účinné terapie NRAS mutovaných melanomů jako v případě melanomu s BRAF mutací (303). Jednou z možností je terapie MEK inhibitory, např. binimetinibem, která prokázala signifikantně lepší PFS oproti chemoterapii ve studii NEMO při krátkodobém sledování. V této studii byl medián PFS 2,8 měsíce (95 % CI 2,8-3,6) ve skupině s binimetinibem a 1,5 měsíce (96 % CI 1,5-1,7) ve skupině s dakarbazinem (HR 0,62 [95 % CI 0,47-0,80]; $p < 0,001$) (304).

S kinázovou aktivitou RAS je spojený C3 botulotoxinový substrát 1 (dále jako RAC1, anglicky: Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1), který se podílí na různorodých buněčných pochodech včetně buněčné diferenciaci, syntézy proteinů, migrace a buněčné adheze (305). Navíc mutace RAC1 (P29S), která byla zjištěna u 9,2 % primárních melanomů v solární lokalizaci, je spojena se zvýšenou proliferací a migrací nádorových melanocytů (306). Cílená terapie MEK inhibitory a RAC1 inhibitory by

mohla představovat možnou formu cílené léčby u pacientů s melanomem, kteří mají přítomny obě mutace (306). Na inhibici aktivace RAS signalizace se podílí i protein-1 neurofibromatózy (NF-1), jehož ztráta funkce vede k nepřetržité aktivaci RAS proteinu s následnou aktivací celé MAP kinázové signalizace, ale i PI3K/AKT/mTOR signalizací. Především alternativní aktivace PI3K/AKT/mTOR signalizace navozuje rezistenci vůči cílené terapii BRAF a MEK inhibitory (297,302).

Gen CDKN_{2A}, jehož hereditární mutace je odpovědná za familiární melanom, je zásadní pro expresi a funkci proteinu p16 a p14ARF. Protein p16 přímo inhibuje proteiny CDK₄ a CDK₆ a následně podporuje i expresi retinoblastomového proteinu (RB1). Protein p14ARF aktivuje tumor supresorový gen TP53 (307). U pacientů léčených dabrafenibem ve studii GSK byla prokázána korelace nižšího počtu kopií CDKN_{2A} a snížení PFS (P = 0,012). Další gen CCND1 kóduje protein cyklin-D1 a podílí se na přechodu buněčného cyklu z fáze G₁ do fáze S a nepřímo tak ovlivňuje buněčnou proliferaci. Vyšší počet kopií genu CCND1 byl spojen s horší prognózou PFS a OS (308). Navzdory tomu, že mechanismy působení některých genů a jejich role nejsou v rezistenci na cílenou terapii přesně známy, se předpokládá, že např. alterace v genu MAP3K8, který kóduje protein kinázu odpovědnou za aktivaci ERK 1/2 kinázy, se pravděpodobně může podílet na rezistenci na cílenou terapii. Při této mutaci dochází k přímé aktivaci ERK kináz a *de facto* zkrácení celé MAP kinázové signalizace (286).

Zdokumentované genetické alterace představují zásadní a obtížně překonatelné mechanismy rezistence. Studium těchto mechanismů je důležité k pochopení jednotlivých patogenních mutací a celé buněčné MAP kinázové signalizace. Jejich zkoumání může být i přínosem při vývoji nových léčiv (kinázových inhibitorů), která by byla schopná alespoň některé tyto mechanismy překonat.

5.1.3. Vliv nádorového mikroprostředí na vznik rezistence

Nádorové mikroprostředí, kterému je věnována v nádorové biologii velká pozornost, se může významně podílet na vzniku nádorové rezistence na cílenou terapii BRAF a MEK inhibitory. Tato problematika byla již diskutována v kapitole věnované CAFs (4.3.1.) a TILs (4.3.2.) Poměrně zásadní je skutečnost, že nádorové buňky samotné, ale i pod vlivem léčiv, mohou významně ovlivňovat a modifikovat vlastní nádorové mikroprostředí, a to jak nenádorové buňky, které tvoří nádorové stroma, tak i nebuněčné komponenty tvořící ECM. Takto modifikované nádorové mikroprostředí může významně

potencovat nádorové buňky a do jisté míry se jedná o poměrně zásadní nevyžádanou nepřímou stimulaci nádoru.

Studium nádorového mikroprostředí u BRAF V600E pozitivních melanomů poukazuje na fakt, že i když dochází k úspěšné inhibici proliferace nádorových melanocytů potlačením MAP kinázové signalizace cílenou léčbou, v ostatních nenádorových stromálních buňkách může být navozen fenotyp senescence, který představuje typicky zvýšenou expresi lysozomální tzv. se senescencí-asociované β -galaktosidázy (dále jako SA β -gal, anglicky: Senescence Associated beta galactosidase) (309). V další práci byl popsán vliv senescentních nádorových melanocytů na zvýšenou expresi MMP-2 a následnou zvýšenou proliferaci a migraci těchto melanocytů. Senescentní melanocyty vykazují i zvýšenou regulci exprese chemokinového (C-C motif) ligandu 2 (dále jako CCL2, anglicky: Chemokine (C-C motif) Ligand 2). CCL2 podporuje aktivaci PARP-1/NF- κ B signalizační dráhy, která může podporovat v nádorových melanocytech invazivní a především prometastatický fenotyp (310,311).

Jedním z dalších zdokumentovaných mechanismů jsou změny při aktivaci již zmíněné PI3K/AKT/mTOR signalizace, která je jednou z hlavních signalizačních cest obcházející MAP kinázovou dráhu. Bylo prokázáno, že vemurafenib při inhibici nádorových melanocytů snižoval expresi FRA1 (kódovaný genem FOSL1), jednoho ze členů komplexu transkripčního faktoru aktivátorového proteinu 1 a především součást efektorových cest MAP kinázové signalizace (312). Snížená exprese FRA1 v důsledku terapie BRAF inhibitory vedla k expresi inzulínu podobného růstového faktoru 1 (dále jako IGF-1, anglicky: Insuline Growth Factor 1) a EGF. Tyto růstové faktory mohou poměrně snadno aktivovat přes své receptory proteinovou kinázu RAS a následně i celou alternativní signalizaci PI3K/AKT/mTOR. Vedle zvýšené exprese IGF-1 u melanomů vystavených BRAF inhibitorům byla navíc prokázána snížená hladina IGFBP-3 (IGF vázící protein 3), který se za normálních podmínek váže na IGF-1 a tím blokuje i jeho vazbu na IGF receptor (217,218). Z pohledu práce naší laboratoře (pracovní skupina prof. Smetany, Anatomický ústav 1. LF UK) jsou zajímavé i práce popisující roli CAFs na vzniku rezistence na cílenou léčbu. Nádorové melanocyty jsou schopny pod vlivem BRAF inhibitorů produkovat v různé míře TGF- β , který podporuje diferenciaci fibroblastů v myofibroblasty. Stimulované fibroblasty a CAFs se následně podílejí na změnách nádorového mikroprostředí a vzniku nádorové rezistence (kapitola 4.3.1., 8.2.4.) (217,218). Přítomnost myofibroblastů však byla pozorována u pacienta léčeného BRAF inhibitory i v izolátu odebraném ze vzdáleného místa bez nádorového postižení. Může se

tedy jednat až o parakrinní efekt, který ovlivňuje pacienta nejen na lokální, ale i systémové úrovni (186).

5.1.4. Imunomodulační účinek cílené terapie

Poměrně zajímavý je imunomodulační efekt BRAF a MEK inhibitorů, který je popsán v některých preklinických, ale i klinických studiích, které poukazují na nízkou infiltraci T-lymfocytů u BRAF V600E mutovaných melanomů. Navíc byla prokázána i vyšší hladina imunosupresivních faktorů, které se podílejí na ochraně nádorových melanocytů před aktivitou imunitního systému (313–315). Kombinovaná terapie BRAF a MEK inhibitory může navodit změny v imunologickém chování melanomu, která v důsledku vede k překonání poměrně zásadní imunologické tolerance nádoru (316). Wilmott a jeho kolegové našli překvapivě vyšší zánětlivý infiltrát TILs v biopsiích z melanomů odebraných již po týdnu léčby BRAF inhibitory ve srovnání s původní biopsií ze stejných ložisek před zahájením terapie. Navíc byl prokázán vyšší peritumorózní infiltrát CD8⁺ T-lymfocytů, který koreloval i s redukcí nádorové tkáně při terapii BRAF inhibitory (308). Redukce nádorové tkáně při cílené terapii je spojena s apoptózou a nekrotizací nádorových buněk a následným uvolněním nádorových neoantigenů, které mohou účinně stimulovat funkce imunitního systému v protinádorové imunitní odpovědi. Vedle uvolnění antigenů jako jsou Melan-A/MART-1, glykoprotein-100 (gp100), nebo protein související s tyrozinázou 1 a 2, dochází k zvýšení sérových hladin cytokinů INF- γ , TNF- α a snížení hladiny imunosupresivních cytokinů a chemokinů IL-8 a IL-6 (316,317). Tyto poznatky vedou k úvaze ohledně použití kombinace cílené terapie a imunoterapie *checkpoint* inhibitory. Bohužel se ukazuje, že efekt stimulační imunitní systém při použití cílené terapie se s délkou léčby neprohlubuje, ale naopak snižuje. To ukazují práce srovnávající léčbu BRAF a MEK inhibitory, kde pacienti léčení kombinovanou cílenou terapií při progresi měli v biopsiích vzorcích nižší infiltrát CD8⁺ T-lymfocytů ve srovnání se vzorky pacientů léčených anti-PD-1 terapií (318). Jednoznačný mechanismus není přesně znám, ale zvažuje se role nedostatečné imunitní odpovědi v důsledku snížené exprese antigenů diferenciací melanocytů (tyrozináza, melan-A/MART-1 a CSPG4) (319). Tyto studie by mohly vést i k lepšímu načasování kombinace cílené terapie a imunoterapie s návazností na období největší imunitní aktivity. Možnost kombinace cílené terapie a terapie *checkpoint* inhibitory podporuje i

detekce vyšší exprese PD-L1 v melanomech po cílené terapii. Na druhé straně ale dochází k aktivaci signalizace c-Jun a STAT3, která se může podílet na imunitně zprostředkované rezistenci na terapii BRAF inhibitory (320).

I když se zdá, že imunoterapie *checkpoint* inhibitory je ideální formou léčby po selhání cílené terapie, jednoznačný efekt nemusí být vždy patrný, a především dostatečně predikovatelný. To je dáno horším celkovým stavem pacienta a často i vyšší mírou generalizace onemocnění po selhání jedné léčebné modalit. Tyto poznatky a hypotézy lze opřít i o poslední výsledky studie CPDR (COMBI-i) s kombinací BRAF a MEK inhibitorů a terapie anti-PD-1 spartalizumabem, kde překvapivě nebylo potvrzeno signifikantního prodloužení PFS oproti kombinaci cílené terapie s placebem (120). Kriticky je nutné dodat, že samotný spartalizumab (na rozdíl od nivolumabu a pembrolizumabu) nebyl testován v monoterapii u metastazujícího melanomu a jeho efekt je tedy jen odhadován dle zkušeností s anti-PD-1 protilátkami v terapii melanomu.

5.2.Nádorová rezistence na imunoterapii

Imunoterapie melanomu pomocí *checkpoint* inhibitorů je základním pilířem jak léčby metastazujícího melanomu, tak i léčby adjuvantní, případně v současné době se rozvíjející i léčby neoadjuvantní. Velkou výhodou imunoterapie je dlouhodobá terapeutická odpověď a možnost použití této terapie i u pacientů, kteří nevykazují nádorovou mutaci v genu BRAF. Poměrně zásadní nevýhodou je výrazně nižší počet terapeutických odpovědí než u pacientů léčených cílenou terapií BRAF a MEK inhibitory, popřípadě i pomalejší nástup efektu terapie, kdy je někdy obtížné rozhodnout o možném dalším pokračování léčby. Terapeutická odpověď se v některých případech může skrývat i za úvodní progresí onemocnění, kdy tento stav označujeme jako tzv. pseudoprogresi onemocnění. V některých případech je úvodní progrese výrazná a tento stav je nově označován jako hyperprogrese (321). I když tyto termíny nemají přesnou definici, charakterizují doposud ne zcela pochopené mechanismy terapeutické odpovědi, či jejího selhání. Podobně jako u cílené terapie můžeme rozlišit primární formu rezistence a sekundární neboli získanou formu rezistence na *checkpoint* inhibitory (322).

5.2.1. Primární rezistence na *checkpoint* inhibitory

Primární rezistence představuje skupinu pacientů, kteří na terapii *checkpoint* inhibitory neodpovídají. V případě anti-CTLA-4 se jedná o poměrně vysoké procento pacientů dosahující až 80-85 %, kteří nevykazují terapeutickou odpověď (hodnoceno dle standardizovaných RECIST kritérií) (96,97). V případě protilátek anti-PD-1 je procento pacientů bez terapeutické odpovědi okolo 50-60 % (99,102,104). Nejlepší odpovědi lze dosáhnout při kombinované terapii anti-CTLA-4 a anti-PD-1 (ipilimumab, nivolumab, okolo 65 %), i když je tato kombinovaná terapie zatížena vyšším množstvím nežádoucích účinků 3 a 4 stupně (105). V obou případech se jedná o velkou skupinu pacientů, kteří nevykazují na poměrně nákladná léčebná schémata žádnou, nebo jen minimální, terapeutickou odpověď. Bohužel neexistuje jednoznačný prediktivní biomarker, který by byl schopen stratifikovat pacienty dle potencionální terapeutické odpovědi, navíc i různorodost jednotlivých mechanismů odpovědných za nádorovou rezistenci na imunoterapii je poměrně rozmanitá. Mezi hlavní mechanismy patří:

- i) nedostatečné uvolňování, případně stimulace neoantigeny a nízká mutační zátěž;
- ii) nedostatečná nádorová infiltrace TILs;
- iii) absence T-lymfocytů s expresí PD-1 a nedostatečná infiltrace TAMs s expresí PD-L1 v biopsiích z metastáz v úvodu terapie;
- iv) přítomnost vrozeného transkripčního „podpisu“ rezistence na anti-PD-1 (IPRES, innate PD-1 RESistance);
- v) nedostatečná signalizace interferonu γ (279,323–326).

Základní princip funkce imunitního systému vychází ze schopnosti antigenní stimulace. Melanom patří mezi nádory s nejvyšším mutačním zatížením a možností stimulace imunitního systému. Některé nádory (i melanom) však nejsou schopny dostatečné prezentace antigenu imunitnímu systému, nebo neuvolňují v dostatečné míře antigeny, které lze rozpoznat jako cizorodé. Pro tyto mechanismy je zcela zásadní proces odlišení nádorových buněk od buněk zdravých tkání a klíčové rozpoznání TSA, nebo TAA T-lymfocyty. I v případě melanomu existují studie s dokumentovanou recidivou onemocnění po aplikaci protinádorové vakcíny u TAA negativních melanomů (327). Naproti tomu u pacientů s melanomem, kde dochází k dostatečnému uvolňování TAA a TSA, je pozorována lepší terapeutická odpověď na imunoterapii (328). Zásadní je

dostatečná aktivace CD8⁺ a PD-1⁺ T-lymfocytů v periferní krvi neoantigeny pacienta a následné rozpoznání „vlastní“ nádorové tkáně těmito antigenně stimulovanými T-lymfocyty (329). Jak bylo zmíněno, melanom vykazuje poměrně výrazné mutační zatížení, které koreluje i s expozicí UV zářením, a především i s lepší terapeutickou odpovědí na imunoterapii. Některé práce však poukazují na korelaci vyššího mutačního zatížení a infiltrace CD8⁺ T-lymfocytů v nádoru nebo dokonce i se zvýšenou expresí PD-L1 v nádoru. Samotná exprese PD-L1 je v některých nádorech pro následnou terapeutickou odpověď na *checkpoint* inhibitory (anti-PD-1) zcela zásadní (330). Nejvýznamnější klinické studie s *checkpoint* inhibitory ukazují také daleko lepší terapeutickou odpověď u pacientů s expresí PD-L1 v melanomech a jejich metastázách, než u pacientů s nádorem bez exprese. Ve studii s kombinací ipilimumabu a nivolumabu, ale i pouze při monoterapii nivolumabem, bylo pozorováno signifikantně lepší prodloužení PFS u pacientů s expresí PD-L1 než u pacientů bez exprese (104,105,331). Ve studii s pembrolizumabem bylo u PD-L1 pozitivních pacientů pozorováno dokonce lepší OS, PFS a míra terapeutických odpovědí, než u PD-L1 negativních (332). Z těchto klinických studií vyplývá, že exprese PD-L1 může být pro následnou terapii melanomu *checkpoint* inhibitory zásadní a jedná se tedy o spolehlivý biomarker. Bohužel celá řada pacientů s dostatečnou expresí PD-L1 nevykazuje terapeutickou odpověď na anti-PD-1 terapii a na druhé straně někteří pacienti bez exprese PD-L1 z této terapie profitují (104,105,331,333). V tomto kontextu se ukazuje, že exprese PD-L1 v melanomu je nápomocný (suboptimální) biomarker predikující terapeutickou odpověď. Pro studium rezistence na imunoterapii jsou zajímavé práce, které se zaměřují na mechanismy, jež mohou ovlivňovat expresi PD-L1. Několik studií i u jiných nádorů prokázalo korelaci mezi ztrátou PTEN genu a upregulací exprese PD-L1 přes aktivaci signalizace PI3K/AKT/mTOR (334). U melanomu a jeho modelů však ztráta PTEN genu vedla ke zmenšení a potlačení TILs infiltrátu a aktivity T-lymfocytů. Navíc v melanomovém modelu ztráta PTEN genu významně nezměnila expresi PD-L1, což naznačuje, že regulace PD-L1 nemusí být hlavním mechanismem imunitní rezistence vyplývající ze ztráty PTEN genu (335).

Aby bylo možné účinně aktivovat T-lymfocyty, musí antigen prezentující buňky (DC) podstoupit proces zvaný maturace. Při tomto procesu zvyšují DC svou schopnost stimulovat T-lymfocyty posílenou expresí kostimulačních molekul potřebných pro aktivaci T-lymfocytů, jako jsou molekuly MHC I. a II. třídy, CD80, CD86 a CD40 (336). I tento mechanismus aktivace imunitního systému může být narušen. Jedním

z mechanismů může být exprese IL-37b, který potlačuje maturaci a funkci DC snížením exprese CD80 a CD86 prostřednictvím signální dráhy ERK/S6K/NF-kB (337). Funkce DC může být potlačena při signalizaci STAT3, jejíž inhibice přispívá k infiltraci nádoru DC a TILs a významně se podílí na komunikaci mezi nádorovými melanocyty a buňkami imunitního systému. Tato komunikace vede k indukci dalších faktorů s imunosupresivním působením na maturaci DC jako je VEGF, IL-10 a TGF- β (338,339).

Nádory mohou používat řadu imunitních úhybných mechanismů včetně zabránění T-lymfocytům infiltrovat nádorovou tkáň. Problematika tzv. imunitních „hot“ a „cold“ nádorů byla již diskutována v kapitole 4.3.2. věnované TILs. Samotná infiltrace nádoru závisí na předchozí antigenní stimulaci imunitního systému a na schopnosti nádoru atrahovat nádorové buňky. V procesu infiltrace nádoru T-lymfocyty byl identifikován chemokinový receptor CXCR-3, který může být v tomto procesu významný stimulátor. V nádorovém myším modelu melanomu byl CXCR-3 silně exprimován v řadě podskupin T-lymfocytů a při následné transfekci jeho ligandem CXCL9, došlo k významnému zvýšení infiltrace CD4⁺ i CD8⁺ T-lymfocytů do melanomu (340). V melanomech s početnějším nádorovým infiltrátem CD8⁺ T-lymfocytů byla navíc prokázána exprese CXCL-9 a CXCL-10 (341). Význam v procesu infiltrace hraje i INF- γ , který zprostředkovává signalizaci mezi Treg lymfocyty, Th-lymfocyty a cytotoxickými T-lymfocyty. STAT3 signalizace inhibuje produkci CXCL-10 nádorově asociovanými myeloidními buňkami a následně dochází i ke snížení exprese INF- γ a infiltraci T-lymfocytů v melanomu. Při inhibici STAT3 dochází ke zvýšené expresi CXCR-3 a následné podpoře infiltrace CD8⁺ T-lymfocytů do nádoru (342).

Další molekulou ovlivňující nádorovou infiltraci TILs je VEGF, jehož exprese i zvýšená sérová koncentrace je spojena s progresí melanomu (343). VEGF snižuje adhezi T-lymfocytů k endotelu kapilár a nově utvořených cév potlačením exprese mezibuněčné adhezní molekuly 1 (ICAM-1) a vaskulární buněčné adhezní molekuly 1 (VCAM-1) v endotelových buňkách (344). Zvýšená exprese VEGF v nádorech byla spojena s imunosupresivními podněty, a dokonce i s nižší nádorovou infiltrací TILs. Cílená inhibice exprese VEGF byla spojena s vyšším TILs infiltrátem v melanomu a byla následována zesílenou expresí CXCL-10 a CXCL-11, které podporují prozánětlivé prostředí nádoru (345). V další studii bylo prokázáno, že VEGF zvyšuje expresi IL-10 a prostaglandinu E2 (PGE2), což vede ke zvýšené hladině Fas ligandů a následné indukci apoptózy CD8⁺ T-lymfocytů. Při cílené inhibici VEGF i v tomto modelu došlo ke zvýšené infiltraci TILs v melanomu (345). V klinických studiích s anti-CTLA-4 a anti-

PD-1 byla retrospektivně prokázána vyšší exprese VEGF u pacientů bez terapeutické odpovědi než u pacientů, kteří na terapii odpovídali (346).

Mechanismů primární rezistence je zdokumentována celá řada, některé se navíc potencují a prolínají. Z terapeutických možností se jedná o mechanismy obtížně ovlivnitelné a překonatelné, i když případně poukazují na možnosti např. kombinované terapie cílené terapie a imunoterapie, nebo i kombinace s jinými inhibitory jako jsou např. inhibitory VEGF, nebo inhibitory PI3K/AKT signalizace (150,335).

5.2.2. Získaná rezistence na *checkpoint* inhibitory

Získaná rezistence se objevuje u pacientů, u kterých dochází k relapsu onemocnění po úvodní terapeutické odpovědi. V současné době jsou mechanismy získané rezistence hůře zmapovány, ale předpokládá se, že mnohé z nich budou pravděpodobně podobné těm, které jsou základem primární rezistence. S mechanismy přirozené selekce se mohou postupně vyvinout (selektovat) nádorové buňky s epigenetickými změnami, které propůjčují schopnost odolávat imunitnímu systému (347). Příkladem takové vlastnosti je ztráta exprese β 2-mikroglobulinu, který je součástí molekul MHC I. třídy a přispívá k jejich funkční (správné) expresi. V preklinické studii pacientů s melanomem léčených imunoterapií byla ztráta β 2-mikroglobulinu v průběhu léčby spojena s nižší schopností rozpoznávat nádorové antigeny CD8⁺ T-lymfocyty a také se ztrátou exprese molekul MHC I. třídy (348,349). Dalším z možných mechanismů získané rezistence je mutace v genu JAK 1/2, která je odpovědná za sníženou citlivost nádorových buněk na signalizaci INF- γ a byla detekována u pacientů, kteří vykazovali selhání imunoterapie po úvodní dobré terapeutické odpovědi (350). Po expozici nádorových buněk INF- γ , který je produkován aktivovanými T-lymfocyty se aktivuje JAK 1/2 kináza a následně dochází k fosforylaci STAT proteinu. Tato signální dráha JAK/STAT je odpovědná za buněčnou proliferaci, diferenciaci, migraci a apoptotickou buněčnou smrt. Získaná mutace v genu JAK poté tuto signalizaci nekontrolovatelně aktivuje (350,351). INF- γ však také vede i k up-regulaci exprese PD-L1 na nádorových buňkách, čímž se podílí na senzibilizaci nádoru na terapii *checkpoint* inhibitory (248). Získaná rezistence se navíc může vyskytnout také na úrovni jednotlivé buňky, přičemž nádorové buňky mění svoji genovou expresi v reakci na signalizaci imunitních buněk z nádorového mikroprostředí (347). Příkladem těchto mechanismů je navození exprese PD-L1 v nádorových buňkách pod

vlivem signalizace INF- γ , navíc exprese PD-L1 patří mezi mechanismy jak primární, tak i získané rezistence, což ukazuje na plasticitu nádorových buněk a jejich schopnost unikat obranným mechanismům jedince a léčebné strategie (347,352).

Další markery kontrolních mechanismů imunitního systému a jejich exprese je spojena se získanou rezistencí na imunoterapii. Jedná se o gen 3 aktivující lymfocyty (dále jako LAG-3, anglicky: Lymphocyte-Activation Gene 3), imunoglobulin T-lymfocytů a mucinovou doménu 3 obsahující aktivátor lymfocytů (dále jako TIM-3, anglicky: T-cell Immunoglobulin and Mucin-domain containing-3), které byly exprimovány u pacientů, u kterých došlo k selhání terapie *checkpoint* inhibitory (353). Cílená blokáda TIM-3 v myším melanomovém modelu vede ke zlepšení přežití a expresi INF- γ s následnou proliferací a infiltrací CD8⁺ T-lymfocytů v melanomech. Exprese LAG-3 byla detekována v PD-L1 pozitivních melanomech, což může naznačovat roli AG-3 při procesech podílejících se na úniku melanomu před imunitním systémem (353,354).

Imunoterapie *checkpoint* inhibitory patří mezi revoluční mezníky terapie onkologických onemocnění a právem byla za jejich objevení v roce 2018 udělena Nobelova cena za medicínu (James P. Allison za CTLA-4 a Tasuku Hondžó za PD-1). Terapeutické odpovědi jsou u melanomu poměrně různorodé a nadále je celá řada pacientů, kteří na tato léčiva nevykazují žádnou nebo jen minimální terapeutickou odpověď. Významným problémem je ale i selhání terapie v průběhu léčby po úvodní, mnohdy i velice dobré, terapeutické odpovědi. Studium mechanismů rezistence je klíčové k nalezení nových terapeutických postupů a léčebných kombinací, které by dokázaly tuto formu terapie posílit a ještě více zefektivnit (355). Na druhé straně studium mechanismů rezistence přináší cenné znalosti, které poukazují na molekuly (biomarkery) s prediktivním potenciálem jak terapeutické odpovědi, tak i možné recidivy onemocnění (356).

5.2.3. Mikrobiom

Mikrobiom (střevní mikroflóra) je stále více uznávaným faktorem, který může ovlivnit imunologické chování jedince a v kontextu s nádorovou problematikou i terapeutickou odpověď na *checkpoint* inhibitory. Vliv mikrobiomu je hojně diskutován v celé řadě odvětví medicíny, ale v léčbě onkologických onemocnění mu byla věnována pozornost až se zavedením terapie *checkpoint* inhibitory, a především při hledání

mechanismů rezistence na tuto léčbu. Bylo zjištěno, že pacienti s terapeutickou odpovědí na *checkpoint* inhibitory mají odlišný mikrobiom od pacientů, kteří terapeutickou odpověď nevykazují. Samotné mechanismy spojující mikrobiom a imunologickou odpověď pacientů jsou zatím ne zcela jednoznačně vysvětlitelné, ale navzdory tomu se jedná o nezanedbatelný faktor, který ovlivňuje imunologické chování.

První práce upozorňující na vliv střevního mikrobiomu u pacientů s melanomem na terapeutickou odpověď na *checkpoint* inhibitory byla publikována v roce 2015, na základě studie 25 pacientů léčených ipilimumabem. V této práci byla zjištěna lepší protinádorová odpověď u pacientů s přítomnými střevními bakteriemi *Bacteroides* (*B. fragilis* a / nebo *B. thetaiotaomicron*) a *Burkholderiales cepacia* (357). V myším melanomovém modelu bylo dosaženo, po obohacení myší střevní mikroflóry cíleně o druhy *Bifidobacterium*, resp. *B. breve* a *B. longum*, zlepšené terapeutické odpovědi na anti-PD-L1 protilátku, dále došlo k výrazně vyšší infiltraci nádoru CD8⁺ T-lymfocyty (358). V následujících studiích bylo prokázáno celé spektrum bakterií, které se mohou podílet na příznivé střevní mikroflóře pro adekvátní imunologickou odpověď na *checkpoint* inhibitory (359). Poměrně revoluční jsou ale práce poukazující na možnost „transplantace stolice“ resp. přenos střevního mikrobiomu od pacientů s dobrou odpovědí na *checkpoint* inhibitory pacientům bez terapeutické odpovědi, a tak se pokusit zvrátit nepříznivé imunologické chování těchto pacientů (360). Z klinických a preklinických studií, kde byl hodnocen střevní mikrobiom, vyplývá, že např. terapie širokospektrými antibiotiky před léčbou či v úvodu terapie *checkpoint* inhibitory může výrazně nepříznivě ovlivnit jak stav mikrobiomu pacienta, tak i terapeutickou odpověď (361). Samotný mechanismus funkce a stimulace imunitního systému cestou střevního mikrobiomu je poměrně komplikovaný a zatím i nedostatečně prostudovaný. Práce doposud publikované na toto téma přinášejí poměrně zajímavé informace, které však bude nutné ověřit ve velkých multicentrických studiích. Z prvních experimentálních a preklinických studií vyplývá, že pacienti léčení anti-PD-1, kteří měli přítomné bakterie rodu *Faecalibacterium* mají větší poměr cirkulujících CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocytů. U pacientů, kteří terapeutickou odpověď nevykazovali, byly přítomné bakterie rodu *Bacteroidales* a měli vyšší hodnoty cirkulujících Treg lymfocytů s méně aktivovanou expresí zánětlivých cytokinů (362). V další práci bylo prokázáno, že skupina pacientů s terapeutickou odpovědí měla opět odlišný mikrobiom (převážně zastoupení *Faecalibacterium*) oproti pacientům bez odpovědi (převážně *Bacteroides*). Navíc pacienti s terapeutickou odpovědí měli vyšší hladinu CD25 (α řetězec receptoru pro IL-

2) a nižší zastoupení cirkulujících Treg lymfocytů a nižší zastoupení $\alpha 4\beta 7^+$ T-lymfocytů (363). V myším melanomovém modelu bylo po podání střevního mikrobiomu od pacientů s terapeutickou odpovědí na *checkpoint* inhibitory dosaženo vyšší infiltrace TILs s CD8⁺ T-lymfocyty oproti myším, kde byl podán mikrobiom od pacientů bez terapeutické odpovědi. V myších s mikrobiomem od pacientů s odpovědí bylo prokázáno vyšší zastoupení vrozených efektorových buněk (CD45⁺, CD11b⁺, Ly6G⁺) s odpovídající deplecí v myeloidních buňkách (CD11b⁺, CD11c⁺). V nádorech u myši s mikrobiomem od pacientů bez odpovědi byl vyšší počet Th (pomocných) 17 lymfocytů (362,364). Poměrně zásadní je práce Tanoue a jeho spolupracovníků, kteří studovali složení střevního mikrobiomu od zdravých jedinců a podařilo se jim identifikovat soubor 11 kmenů, (7 *Bacteroidales* a 4 druhů jiných než *Bacteroidales*), které následně naočkovali do myšího modelu. V tomto modelu poté došlo ke zvýšení CD8⁺ T-lymfocytů v epitelu tlustého střeva, ale navíc byla pozorována významná up-regulace genů regulujících INF- γ , konkrétně CXCL9 a CXCL10. Tento mikrobiom byl navíc schopen potencovat efekt anti-PD-1 a anti-CTLA-4 v myším modelu karcinomu tlustého střeva, kde byla patrná exprese INF- γ a infiltrát CD8⁺ T-lymfocytů s expresí granzymu B v nádorovém stromatu. Granzym B je efektorovou molekulou cytotoxických T-lymfocytů a dendritických buněk s vysokou expresí HLA molekul I. třídy (365). Tyto práce podporují domněnku, že specifický mikrobiom má schopnost buď imunostimulační nebo imunosupresivní a podílí se na „výchově“ a utváření vrozené i adaptabilní imunity se schopností těchto buněk následně prostupovat do mikroprostředí nádoru (365). Další předpoklad efektu vychází z domněnky, že může existovat podobnost mezi střevním mikrobiomem a nádorovými neoantigeny, kdy střevní mikroflóra stimuluje imunitní systém s podporou usnadněné infiltrace nádoru TILs (366). Jednou z možných hypotéz je i metabolický efekt střevního mikrobiomu, který může ovlivnit protinádorovou imunitní odpověď i v jiných místech než ve stěně střevní. Stimulace imunitního systému vychází z metabolitů specifické střevní mikroflóry. U pacientů s melanomem a s terapeutickou odpovědí byla detekována např. kyselina anakardová (a 82 dalších metabolitů) (367).

I když je studium problematiky střevního mikrobiomu v biologii melanomu relativně novým trendem, jedná se pravděpodobně o významný faktor, který ovlivňuje imunitní systém pacienta i případnou terapeutickou odpověď na *checkpoint* inhibitory. Zásadní může být role mikrobiomu v překonání mechanismů rezistence na imunoterapii. Z doposud publikovaných studií bude zásadní a zcela revoluční zvládnutí techniky „transplantace mikrobiomu“, který je spojený s terapeutickou odpovědí pacientům bez

terapeutické odpovědi a následnému případnému navození terapeutické odpovědi i u těchto pacientů.

5.3. Biomarkery melanomu

Termín biomarker představuje definovanou vlastnost biologického systému, kterou lze objektivně změřit či zhodnotit a použít pro potřeby monitorace stavu organismu, případně daného onemocnění. Pro tyto potřeby lze využít metody fyzikální, biochemické, molekulárně genetické, histopatologické či i metody zobrazovací (např. RECIST kritéria). Biomarkery můžeme rozdělit jako klasické a novodobé (neboli molekulární). Jako příklad klasického biomarkeru u melanomu lze připomenout hodnocení Breslowa, jehož stagingové a prognostické možnosti byly diskutovány v kapitole 3. a 3.1. Příkladem molekulárního biomarkeru je např. vyšetření BRAF mutace s následnou možností cílené terapie. Další způsob dělení, na biomarkery míry rizika, diagnostické, prognostické a prediktivní, představuje spíše praktické rozdělení dle vlastností a použití (368).

5.3.1. Sérologické biomarkery melanomu

Pro běžnou monitoraci pacienta mají velký význam sérologické biomarkery, které jsou snadno dostupné, velice dobře interpretovatelné, a navíc jsou i definované referenčními mezemi pro daný analyt. Jedním z nejběžněji používaných sérologických biomarkerů pro melanom je protein S100 (S100B), jehož zvýšená hladina byla spojena s nádorovou rezistencí a progresí onemocnění (369). Vyšetření S100B proteinu patří spíše mezi pomocné diagnostické biomarkery. V některých studiích byla pozorována jeho elevace v prvních týdnech progresu onemocnění (až 78 % pacientů ve 4. týdnu progresu) s následným snížením či stabilizací při terapeutické odpovědi (370). Vyšetření S100B je sice běžně dostupné, ale jeho nevýhodou je nižší senzitivita při diagnostice časně progresu melanomu, při monitorování onemocnění u nižších stádií melanomu a nutnost pravidelného opakování k posouzení dynamiky vývoje.

Dalším rutinním sérologickým biomarkerem je laktát dehydrogenáza (dále jako LDH, anglicky: Lactate Dehydrogenase). Jedná se o vysoce nespecifický biomarker, jehož elevace může doprovázet jakákoliv onemocnění s buněčnou destrukcí a přítomným anaerobním metabolismem. Vyšetření LDH se používá při rutinním *stagingu* melanomu

(TNM dle AJCC, 7. i 8. edice) a lze ho použít jako pomocný diagnostický či monitorační marker u pacientů s metastazujícím melanomem. Jelikož elevace LDH je spojena se závažnějším klinickým stádiem, jedná se i o prognostický marker (46,48). Vedle použití LDH jako diagnostického a prognostického markeru, lze využít LDH pro potřebu predikce terapeutické odpovědi na imunoterapii. Pacienti s nízkou, resp. normální hladinou LDH a S100B (ale např. i v kombinaci s normální hladinou CRP) mají obecně lepší terapeutickou odpověď v rámci imunoterapie *checkpoint* inhibitory. Bohužel ale někteří pacienti mohou vykazovat i opačné terapeutické výsledky (371,372).

Dalším ze sérologických markerů je protein inhibující aktivitu melanomu (dále jako MIA, anglicky: Melanoma Inhibitory Activity), který odpovídá za interakce s proteiny ECM. I když z názvu lze usuzovat, že se jedná o specifický protein pro melanocyty a melanom, jeho expresi lze detekovat i v normální tkáni např. chrupavce. V patologických procesech je zvýšená exprese vedle melanomu pozorována i v karcinomech prsu, kolorektálním karcinomu nebo glioblastomu (373). V případě melanomu je MIA sérologicky detekována v klinickém stadiu I a II pouze u 13-23 % pacientů, ale v klinickém stadiu III a IV dokonce až ve 100 %. Tyto výsledky ukazují limity vyšetření MIA u pacientů s nižším klinickým stádiem, nicméně elevace MIA může indikovat relaps onemocnění (374).

Nově se v pilotních studiích zavádí sledování VEGF, FGF, IL-8 či i IL-6. Význam VEGF, IL-8 i IL-6 v biologii melanomu byl již několikrát zmíněn i v souvislosti s aktivací imunitního systému. Navíc jejich exprese v nádorech může korelovat s přítomností v séru a s klinickým stádiem nemoci. Oproti zdravé populaci jsou u pacientů s melanomem běžně pozorovány zvýšené sérové hladiny VEGF, FGF a IL-8, navíc statisticky dobře korelují i s celkovým přežitím a přežitím do progresu onemocnění (343,375,376).

S rozvojem a standardizací molekulárně genetických metod se mezi sérologické markery dá zařadit i detekce mikroRNA molekul (dále jako miRNA, anglicky: microRNA). Jedná se o malé nekódující molekuly RNA, které se podílí na regulaci genové exprese a posttranskripční modifikaci. Tyto molekuly jsou relativně odolné vůči působení RNáz, díky tomu jsou poměrně dlouho stabilní v cirkulaci (více jak 24 hodin) a je tak možné jejich stanovení (377). V současné době jsou nejvíce diskutované molekuly miRNA-355, -222, -221, -150, -15b, -199a, -5p, -33a, -424. Tyto miRNA lze použít jak k monitorování onemocnění, tak i ke stratifikaci pacientů a stanovení míry rizika progresu onemocnění. Tyto molekuly lze využít tedy i jako prediktivní biomarkery. Navíc se

ukazuje, že miRNA mohou hrát roli jak v patogenezi, tak i v samotné progresi a iniciaci nádorových onemocnění včetně melanomu (378–380).

Pomocí molekulárně genetických metod můžeme dále stanovovat cirkulující nádorovou DNA (dále jako ctDNA, anglicky: circulating tumor DNA) a cirkulující nádorové buňky (dále jako CTC, anglicky: Circulating Tumor Cells). Tuto metodiku označujeme jako tzv. tekuté biopsie. Přestože jde o postupy poměrně dlouho používané, jejich velký rozvoj umožnily hlavně nové metody molekulární genetiky včetně tzv. sekvenování nové generace (dále jako NGS, anglicky: Next Generation Sequencing) (381). Jedná se o neinvazivní metodu detekující uvolněné nádorové buňky či molekuly DNA a RNA v séru pacientů, která je vhodná pro sledování efektu terapie a pro monitoraci případného relapsu onemocnění či reziduální nádorové nemoci (382). Ve studii u BRAF a NRAS mutovaných melanomů byla před cílenou terapií detekována ctDNA v souvislosti se signifikantně horší prognózou jak PFS, tak OS. Jako vedlejší kritérium byla použita stratifikace pacientů dle AJCC klasifikace (7. vydání) a pohlaví pacientů (HR = 4,384; 95% CI: (1,308 - 14,699)); $p = 0,017$). Bylo zajímavé, že až o třetinu hůře byla detekována ctDNA u pacientů s přítomnou NRAS mutací (383). Cirkulující nádorové buňky (CTC) jsou uvolňovány nádorem do periferní krve. Tyto buňky mají potenciál jako prognostické, prediktivní a farmakodynamické biomarkery pro léčbu nádorových onemocnění včetně melanomu. Khoja a jeho spolupracovníci popsali u 101 pacienta s melanomem ve IV stadiu, že počet CTC byl detekován mezi 0 - 36 na 7,5 ml krve, z toho 26 % pacientů mělo na začátku ≥ 2 CTC. Po následné léčbě u pacientů, kde počet CTC zůstal během léčby ≥ 2 , měli tito pacienti během léčby kratší medián OS než ti, kteří si udrželi < 2 CTC (OS 7 vs. 10 měsíců, HR 0,34, 95% CI 0,14-0,81, $p = 0,015$) (384).

Tyto biomarkery přinášejí nové poznatky pro sledování terapeutické odpovědi a hodnocení prognózy pacientů s metastatickým postižením. Nevýhodou je poměrně vysoká cena a nutná spolupráce s dostatečně molekulárně geneticky vybavenou laboratoří. Další nevýhodou je omezená stabilita zejména ctDNA (cca 2 hod) oproti např. miRNA (379,384).

5.3.2. Biomarkery odrážející zánětlivý stav pacienta

Pro potřebu efektivního použití *checkpoint* inhibitorů je nutné hledat a zavádět nové prognostické a prediktivní biomarkery, které by byly schopny lépe monitorovat efekt terapie, případně indikovat její selhání. Jedním z takových markerů je např. exprese PD-L1, který může být pro adekvátní terapeutickou odpověď poměrně významný, i když i tento marker má své limity (kapitola 5.2.1. a 5.2.2.) (104,105,331,333). Biomarker pro každodenní použití by měl být co nejnadhěji stanovitelný, dostupný a jednoduše interpretovatelný. S tímto konceptem se nabízí jako ideální biomarker hodnocení tzv. poměru neutrofilů k lymfocytům (dále jako NLR, anglicky: Neutrophil to Lymphocyte Ratio) a méně používaný poměr leukocytů k lymfocytům (dále jako LLR, anglicky: Leukocyte to Lymphocyte Ratio). Jedná se o jednoduché parametry pro snadné posouzení zánětlivého stavu pacienta, které lze využít vedle prediktivní a prognostické onkologie i u jiných patologických stavů, jako je intervenční kardiologie, hodnocení rizika pooperačních stavů či infekčních akutních komplikací. Hodnota NLR je rovna podílu absolutního počtu neutrofilů (dále jako ANC, anglicky: Absolute Neutrophil Count) a absolutního počtu lymfocytů (dále jako ALC, anglicky: Absolute Lymphocyte Count), obdobný výpočet je i u LLR. Oba parametry lze použít jak před léčbou pacienta, tak k monitoraci odpovědi či predikci případného selhání terapie. Jelikož před samotnou léčbou a v jejím průběhu provádíme pravidelná kontrolní laboratorní vyšetření včetně krevního obrazu, ze kterého hodnoty vycházejí, lze výpočet provést z rutinně dosažených hodnot. Normální hodnoty pro NLR se pohybují v rozmezí 0,78 – 3,53, hodnoty spojené s horší prognózou a nižší terapeutickou odpovědí na *checkpoint* inhibitory jsou spojené s hodnotou NLR vyšší než 5 (385). První studie zahrnující 69 pacientů léčených ipilimumabem poukázala na výrazně lepší OS i PFS u pacientů s NLR nižším než 5. U pacientů s NLR nižším než 5 byl zaznamenán medián PFS 3,6 měsíce oproti 1,9 měsícům u pacientů s NLR nad 5, navíc OS bylo dokonce 11,3 měsíce oproti 6,7 měsícům (HR = 0,26; 95% CI: 0,08–0,88, P = 0,003) (386). Obdobné výsledky byly dosaženy i ve studii s nivolumabem u 97 pacientů, kde NLR pod 5 bylo opět spojeno s lepším OS a PFS, navíc hodnota NLR pro lepší prognózu byla upřesněna do 4,7. V této studii byla ještě provedena korelace mezi výpočtem NLR a tzv. odvozené hodnoty NLR (dNLR (derived NLR); $dNLR = (ANC / (WBC - ALC))$), kde výsledky obou poměrů byly bez signifikantních rozdílů jak pro OS tak i PFS. Tato práce ukázala na opětovně zajímavé údaje k prognóze pacientů při terapii *checkpoint* inhibitory, ale je nutné zmínit, že i u pacientů s parciální

terapeutickou odpovědí (4 z 20) byla hodnota NLR více jak 5, naproti tomu u pacientů s progresí onemocnění byla hodnota $NLR \geq 5$ u 38,6% pacientů (387). Dosažené výsledky vyzdvihují význam hodnocení komplexních nálezů u pacienta s vyhodnocením všech dostupných údajů. Je nutné také zmínit, že v některých případech lze jako terapeutický úspěch hodnotit dosažení parciální terapeutické odpovědi nebo stabilizace onemocnění. Na možnost širšího použití těchto parametrů ukazují práce s použitím NLR u pacientů léčených cílenou terapií BRAF a MEK inhibitory. V práci Teterycze a jeho spolupracovníků byl popsán lepší PFS a OS u pacientů s NLR nižším než 4 a normální hodnotou LDH ($P < 0,001$, v jednoletém sledování byl PFS u 51,6 vs. 26,7 % pacientů a OS 77,3 vs. 53,1 % pacientů) (388). Tato práce dokládá význam použití kombinace více biomarkerů a jejich správnou interpretaci.

Mezi markery odrážející zánětlivý stav pacienta, resp. přímo zánětlivý stav v nádorovém prostředí patří i TILs, které jsou i součástí komplexního zhodnocení bioptického vyšetření patologem. Význam TILs pro prognózu pacientů a terapeutickou odpověď na *checkpoint* inhibitory byl diskutován v kapitole 4.3.2. a 5.2.1.

5.3.3. Genetické biomarkery melanomu

Molekulárně genetické metody přinášejí i standard vyšetření jednotlivých somatických či germinálních mutací u pacientů s melanomem. Vyšetření mutace BRAF V600 je již naprostým standardem při rozhodování o zahájení cílené terapie či imunoterapie u pacientů s metastatickým onemocněním. Vyšetření ostatních mutací (NRAS, KIT) naráží na problém případné následné účinné cílené léčby, která by byla pro pacienty s danou mutací možná, ale i na úhradové mechanismy zdravotních pojišťoven. V současné léčbě melanomu je pouze mutace BRAF V600 považována za genetický molekulární marker použitelný pro strategii při rozhodování o terapii. Několik studií s *checkpoint* inhibitory vyhodnotilo, že signifikantní korelace přítomné mutace BRAF a terapeutické odpovědi či OS byla pouze u terapie anti-PD-1 protilátkami. U protilátky anti-CTLA-4 se korelace neprokázala (389,390). Na druhé straně znalost i jiných mutací jako je detekce přítomné mutace PTEN či CDKN2A genu může indikovat rozvoj primární rezistence na cílenou terapii BRAF a MEK inhibitory (299,307). Tato vyšetření se však v současné době standardně neprovádí.

Některé sekvenační studie (The Cancer Genome Atlas) provedly sekvenování celého genomu pro mapování mutační zátěže jednotlivých nádorových onemocnění a

dané populace. Ve studii Haywarda a jeho kolegů bylo použito celogenomové sekvenování (dále jako WGS, anglicky: Whole Genome Sequencing) včetně vyšetření nekódujících sekvencí u kožních i slizničních melanomů. Výsledkem bylo zjištění, že počet mutací v nekódující oblasti byl podobný počtu mutací v kódujících oblastech. Nejběžnější mutace v nekódující oblasti byla v promotoru genu pro telomerázovou reverzní transkriptázu (TERT gen), jehož role je v nádorové biologii dobře zdokumentována (karcinom plic apod.) (391). Zavedením pojmu mutační zatížení nádoru (dále jako TMB, anglicky: Tumour Mutational Burden) usnadňují tyto práce hodnocení TMB a následné využití tohoto biomarkeru v prognostických a prediktivních studiích. Vysoké TMB koreluje s vyšším počtem neoantigenů, což umožňuje účinně stimulovat imunitní systém, a může posloužit u různých nádorů jako prediktor účinnosti terapie *checkpoint* inhibitory. U melanomu bylo zdokumentováno menší zastoupení TMB s nižší expresí PD-L1, které jsou odpovědné za signifikantně nižší OS u pacientů v klinickém stadiu III (HR = 0,28; 95% CI 0,12-0,66; P = 0,002) (392). Genetická profilování nádorů naznačují přítomnost „prozánětlivého mikroprostředí nádoru“ se zvýšenou expresí prozánětlivých chemokinů a IFN- γ , což koreluje s klinickou účinností *checkpoint* inhibitorů u pacientů s melanomem. Studie věnované této problematice odhalily molekulární mechanismy, které jsou základem nedostatečné infiltrace T-lymfocytů, která se podílí na vzniku rezistence melanomu na imunoterapii. Jednou z těchto signalizací je aktivita zprostředkovaná mutací genu PTEN, nebo mutace genu JAK 1/2 a tedy ztrátou funkce Janus kináz, které se účastní klíčové signalizace INF- γ (350,351).

Hledání nových biomarkerů ke zlepšení diagnostiky, případně zpřesnění prognózy či dokonce predikce terapeutické odpovědi, je cílem celé řady jak klinických, tak preklinických a experimentálních studií. I když zde byly zmíněny biomarkery, které se ukazují jako slibné při predikování terapeutické odpovědi, je nutné mít na paměti i jejich limity a vhodně využívat i kombinace více znaků (např. S100B a LDH, nebo LDH a NLR apod.). Při predikci terapeutické odpovědi by se nemělo jednat ani o automaticky vylučující biomarkery, zabraňující podání terapie (např. NRL \geq 5, elevace LDH apod.), jelikož u melanomu může mít celá řada pacientů dobrou terapeutickou odpověď navzdory nepříznivým nálezům a laboratorním hodnotám před zahájením léčby.

6. Cíle práce

Tato habilitační práce se zaměřuje na problematiku nádorového mikroprostředí melanomu. V kapitolách 1 – 5 jsou přehledně zpracovány dostupné znalosti o melanomu zahrnující embryonální původ a migraci melanocytů, jejich fyziologii, malignizaci, vznik melanomu a popis jeho klinických variant. Přehledně je pojednán vývoj léčby melanomu, současná léčebná schémata a mechanismy vzniku rezistence na terapii. V teoretickém úvodu je pojednáno o problematice nádorového mikroprostředí včetně funkce buněčných složek nádorového mikroprostředí melanomu, jako jsou CAFs, TILs a TAMs.

V kapitolách 7 – 8 jsou komentovány dosažené publikované výsledky. Část prací navazuje na vlastní disertační práci věnovanou studiu epitelově mezenchymových interakcí u nádorů vycházejících z dlaždicových epitelů. Druhá část publikací je úzce zaměřena na problematiku melanomu, které vychází z *in vitro* modelování nádorového mikroprostředí a z korelace experimentálních výsledků s klinickými nálezy a statistickými údaji pacientů s metastazujícím melanomem, které byli a jsou léčeni na Dermatovenerologické klinice 1. LF UK a VFN. Publikované výsledky lze rozdělit do čtyř tematických okruhů:

- 1. Nádorové mikroprostředí melanomu** – práce věnované tomuto tématu, jsou navazující práce na vlastní disertační práci. Jedná se o studie věnované nádorovému mikroprostředí, nádorovému stromatu melanomu a jeho komponentám, včetně CAFs a TILs.
- 2. Nádorové biomarkery melanomu** – tento tematický okruh vychází ze znalostí nádorového mikroprostředí a sleduje expresi molekul stanovených pomocí imunohistochemických metod *in situ* v nádoru a jejich korelaci s detekcí specifických proteinů v séru pacientů.
- 3. Genetické alterace melanomu** – práce je zaměřena na detekci nových funkčních mutací a na problematiku stanovení genu PTEN u melanomu.
- 4. Shrnující přehledové práce** – jedná se o práce shrnující dosavadní publikované výsledky, ale i vlastní výsledky věnované zejména nádorovému mikroprostředí melanomu.

7. Materiál a metodika

V této kapitole jsou shrnuty pouze hlavní metodické principy použité při řešení jednotlivých cílů této habilitační práce. Detailní popis jednotlivých studií a použitých metodik včetně materiálu je součástí příloh, resp. je uveden v jednotlivých publikačních výstupech.

Na základě dlouhodobé spolupráce Dermatovenerologické kliniky 1. LF UK a VFN a Anatomického ústavu 1. LF UK byly výzkumné práce provedeny převážně v jeho laboratořích. Jednalo se o kultivační experimenty, izolaci jednotlivých buněčných populací, zejména CAFs z kožních metastáz melanomu, a *in vitro* modelování nádorového mikroprostředí s následnou imunohistochemickou charakterizací. Vedle izolovaných buněčných populací byly použity komerčně dostupné nádorové linie melanomu A2058 (ATCC[®] CRL-11147) a G361 (ATCC[®] CRL-1424) a linie BLM, která byla získána jako kolegiální dar od L. van Kempena a H. van Kriekena (Ústav patologie, UMC St. Radoud Nijmegen, Holandsko). Jako kontrolní zdravé melanocyty byly použity linie Mel-HP a Mel-LP, které jsme získaly také jako kolegiální dar, a to od pana doc. MUDr. J. Vachtenheima, CSc. z Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky (ÚKBLD) 1. LF UK a VFN. Dále v rámci laboratoře Anatomického ústavu 1. LF UK byla prováděna izolace RNA z jednotlivých buněčných izolátů a buněčných linií k další analýze transkriptomu na celogenomové úrovni ve spolupráci s laboratoří Ústavu molekulární genetiky Akademie věd ČR (AV ČR). Vlastní izolované buněčné populace byly získány z odebraných vzorků kožních metastáz melanomů, ale i ze zdravých tkání od pacientů léčených na Dermatovenerologické klinice 1. LF UK a VFN po podepsání informovaného souhlasu a plného poučení pacientů.

Některé experimenty v rámci *in vitro* modelování nádorového mikroprostředí a migrace nádorových buněk byly provedeny i ve spolupráci s laboratoří pana doc. RNDr. J. Brábka, CSc. (Katedra buněčné biologie, Přírodovědecké fakulty UK). Při hledání vhodných sérologických markerů melanomu byly odebrány vzorky sér pacientů a zdravých dobrovolníků, u nichž byla provedena proteomická analýza a statistické vyhodnocení na spolupracujícím pracovišti v Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v. v. i. v Liběchově. Výsledky byly korelovány s imunohistochemickým vyšetřením tkání primárních melanomů těchto pacientů. Experimentální model byl porovnán s imunocytochemickým profilem kultivovaných nádorových i zdravých melanocytů a CAFs z melanomu.

Druhá navazující část práce byla provedena ve spolupráci Dermatovenerologické kliniky 1. LF UK a VFN a Ústavu patologie 1. LF UK a VFN. Tyto studie vycházejí především z retrospektivní analýzy histologických vzorků tkání melanomů a melanocytárních névů, které byly vyšetřeny základními histologickými technikami (H&E) a imunohistochemickými metodami. Vedle imunohistochemických vyšetření byly provedeny i genetické analýzy DNA a detekce celé řady mutací s ověřením jejich patogenního významu. Získaná data byla dále korelována s klinickými údaji získanými v průběhu dlouhodobé dispenzarizace pacientů s melanomem na Dermatovenerologické klinice 1. LF UK a VFN. Jednotlivé výsledky byly korelovány a statisticky zpracovány ve snaze získat prognostické a prediktivní závěry.

Publikované výsledky prohloubily dlouholetou spolupráci Dermatovenerologické kliniky 1. LF UK a VFN a Anomického ústavu 1. LF UK. V rámci těchto experimentů se podařilo navázat novou spolupráci a utvořit širší pracovní skupinu, která se věnuje studiu problematiky mikroprostředí melanomu.

8. Dosažené výsledky

8.1. Předložené publikované práce v souvislosti s tématem práce

Výsledky jednotlivých prací jsou podrobněji diskutovány v následujících kapitolách. Seznam prací je uveden chronologicky.

- 1) Kučera J, Dvořánková B, Smetana K, Szabo P, **Kodet O**. Fibroblasts isolated from the malignant melanoma influence phenotype of normal human keratinocytes. *Journal of Applied Biomedicine*. 2015, 13(3), 195-198. **IF = 1,509 (2015; PHARMACOLOGY & PHARMACY, Q4)**
- 2) Jobe NP, Rösel D, Dvořánková B, **Kodet O**, Lacina L, Mateu R, Smetana K, Brábek J. Simultaneous blocking of IL-6 and IL-8 is sufficient to fully inhibit CAF-induced human melanoma cell invasiveness. *Histochem Cell Biol*. 2016 Aug;146(2):205-17. **IF = 2,553 (2016; CELL BIOLOGY, Q3; MICROSCOPY, Q1)**
- 3) Dvořánková B, Szabo P, **Kodet O**, Strnad H, Kolář M, Lacina L, Krejčí E, Naňka O, Šedo A, Smetana K Jr. Intercellular crosstalk in human malignant melanoma. *Protoplasma*. 2017 May;254(3):1143-1150. **IF = 2,457 (2017; CELL BIOLOGY, Q3; PLANT SCIENCES, Q2)**

- 4) Lacina L, **Kodet O**, Dvořánková B, Szabo P, Smetana K Jr. Ecology of melanoma cell. *Histol Histopathol.* 2018 Mar;33(3):247-254. **IF = 1,777 (2018; CELL BIOLOGY, Q4; PATHOLOGY, Q3)**
- 5) **Kodet O**, Dvořánková B, Bendlová B, Sýkorová V, Krajsová I, Štork J, Kučera J, Szabo P, Strnad H, Kolář M, Vlček Č, Smetana K Jr, Lacina L. Microenvironment-driven resistance to B-Raf inhibition in a melanoma patient is accompanied by broad changes of gene methylation and expression in distal fibroblasts. *Int J Mol Med.* 2018 May;41(5):2687-2703. **IF = 2,928 (2018; MEDICINE, RESEARCH & EXPERIMENTAL, Q3)**
- 6) Jobe NP, Živicová V, Mifková A, Rösel D, Dvořánková B, **Kodet O**, Strnad H, Kolář M, Šedo A, Smetana K Jr, Strnadová K, Brábek J, Lacina L. Fibroblasts potentiate melanoma cells in vitro invasiveness induced by UV-irradiated keratinocytes. *Histochem Cell Biol.* 2018 May;149(5):503-516. **IF = 2,640 (2018; CELL BIOLOGY, Q3; MICROSCOPY, Q1)**
- 7) Důra M, Němejcová K, Jakša R, Bártů M, Kodet O, Tichá I, Michálková R, Dundr P. Expression of Glut-1 in Malignant Melanoma and Melanocytic Nevi: an Immunohistochemical Study of 400 Cases. *Pathol Oncol Res.* 2019 Jan;25(1):361-368. **IF = 2,230 (2019; CELL BIOLOGY Q4; PATHOLOGY, Q3)**
- 8) Lacina L, Brábek J, Král V, **Kodet O**, Smetana K Jr. Interleukin-6: a molecule with complex biological impact in cancer. *Histol Histopathol.* 2019 Feb;34(2):125-136. **IF = 1,940 (2019; CELL BIOLOGY, Q4; PATHOLOGY, Q3)**
- 9) Dundr P, Simon K, Němejcová K, Bártů M, Tichá I, Michálková R, Jakša R, Věcková Z, **Kodet O**. Stathmin is a potential therapeutic target but not a prognostic marker in melanoma: an immunohistochemical study of 323 melanocytic lesions. *Melanoma Res.* 2019 Apr;29(2):157-162. **IF = 2,750 (2019; DERMATOLOGY Q2; MEDICINE, RESEARCH & EXPERIMENTAL, Q3; ONCOLOGY, Q3)**
- 10) Němejcová K, Tichá I, Bártů M, **Kodet O**, Důra M, Jakša R, Michálková R, Dundr P. Comparison of five different scoring methods in the evaluation of inflammatory infiltration (tumor-infiltrating lymphocytes) in superficial spreading and nodular melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2019 May;32(3):412-423. **IF = 3,683 (2019; CELL BIOLOGY, Q3; DERMATOLOGY, Q1; ONCOLOGY, Q2)**
- 11) Kučera J, Strnadová K, Dvořánková B, Lacina L, Krajsová I, Štork J, Kovářová H, Skalníková HK, Vodička P, Motlík J, Dundr P, Smetana K Jr, **Kodet O**. Serum proteomic analysis of melanoma patients with immunohistochemical profiling of primary melanomas and cultured cells: Pilot study. *Oncol Rep.* 2019 Nov;42(5):1793-1804. **IF = 3,417 (2019; ONCOLOGY, Q2)**

- 12) Tichá I, Hojný J, Michalková R, **Kodet O**, Krkavcová E, Hájková N, Němejcová K, Bártů M, Jakša R, Důra M, Kanwal M, Martiniková AS, Macůrek L, Zemánková P, Kleibl Z, Dundr P. A comprehensive evaluation of pathogenic mutations in primary cutaneous melanomas, including the identification of novel loss-of-function variants. *Sci Rep.* 2019 Nov 19;9(1):17050. **IF = 3,998 (2019, MULTIDISCIPLINARY SCIENCES, Q1)**
- 13) Strnadová K, Španko M, Dvořánková B, Lacina L, **Kodet O**, Shbat A, Klepáček I, Smetana K Jr. Melanoma xenotransplant on the chicken chorioallantoic membrane: a complex biological model for the study of cancer cell behaviour. *Histochem Cell Biol.* 2020 Aug;154(2):177-188. **IF = 4,304 (2020; CELL BIOLOGY, Q3; MICROSCOPY, Q1)**
- 14) Němejcová K, Dundr P, Jakša R, Bártů M, Stružinská I, Hojný J, Hájková N, **Kodet O**. Comprehensive Analysis of PTEN in Primary Cutaneous Melanoma. *Folia Biol (Praha).* 2020;66(1):7-16. **IF = 0,906 (2020; BIOLOGY, Q4; ONCOLOGY, Q4)**
- 15) **Kodet O**, Kučera J, Strnadová K, Dvořánková B, Štork J, Lacina L, Smetana K Jr. Cutaneous melanoma dissemination is dependent on the malignant cell properties and factors of intercellular crosstalk in the cancer microenvironment (Review). *Int J Oncol.* 2020 Sep;57(3):619-630. **IF = 5,650 (2020; ONCOLOGY, Q2)**
- 16) **Kodet O**, Němejcová K, Strnadová K, Havlínová A, Dundr P, Krajsová I, Štork J, Smetana K Jr, Lacina L. The Abscopal Effect in the Era of Checkpoint Inhibitors. *Int J Mol Sci.* 2021 Jul 4;22(13):7204. **IF = 5,923 (2021; BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, Q1; CHEMISTRY, MULTIDISCIPLINARY, Q2)**

8.2. Nádorové mikroprostředí melanomu

V tomto tematickém okruhu bylo navázáno na práce, které tvořily základ vlastní disertační práce, se zaměřením již konkrétně na mikroprostředí melanomu a studium nádorového stromatu melanomu. Jednotlivé práce se věnují problematice CAFs izolovaných z kožních metastáz melanomu a jejich vlivu na okolní součásti nádorového mikroprostředí (např. keratinocyty) i na vlastní nádorové melanocyty.

8.2.1. Fibroblasty izolované z melanomu ovlivňují fenotyp normálních lidských keratinocytů

Tato práce (Kučera et. al. Fibroblasts isolated from the malignant melanoma influence phenotype of normal human keratinocytes. Journal of Applied Biomedicine. 2015, 13(3), 195-198) dokazuje, že mechanismus působení CAFs v melanomu je podobný tomu, který byl popsán i v jiných nádorech, zejména v dlaždicobuněčném karcinomu hlavy a krku a v bazocelulárním karcinomu kůže (200,393). Experiment byl založen na ko-kultivaci CAFs (v práci označováno jako MAFs) izolovaných z kožní metastázy melanomu s normálními lidskými keratinocyty a kontrolních dermálních fibroblastů od zdravého dárce za stejných podmínek. Efekt CAFs na normální keratinocyty byl demonstrován expresí keratinu 14 a ko-expresí keratinu a vimentinu v normálních keratinocytech. Keratin 14 byl při kultivaci s CAFs exprimován ve všech keratinocytech (napříč koloniemi) na rozdíl od použití dermálních fibroblastů, kde keratin 14 byl patrný pouze v okrajích kolonií keratinocytů. Vzájemná ko-exprese keratinu a vimentinu v epitelových buňkách může indikovat tendenci k EMT v keratinocytech. Exprese keratinů i vimentinu byla pozorována v drobnějších keratinocytech na okrajích kolonií, které byly v přímém kontaktu s CAFs. Tento velice jednoduchý experimentální model nádorového mikroprostředí, resp. vztahu nenádorové populace a okolních keratinocytů, ukazuje na obdobný mechanismus, kterým jsou CAFs schopny změnit diferenciaci keratinocytů (na úrovni exprese keratinů). Tato práce podporuje předchozí výsledky, kdy CAFs z různých nádorů byly schopny změnit diferenciaci linie EM-G3 izolovanou z duktálního karcinomu prsu (198).

Výsledky této práce dokazují, že biologické působení CAFs z různých typů nádorů na epitelové buňky (keratinocyty) je uniformní. Vzájemné interakce nádorových buněk s CAFs, ale i s dalšími buňkami nádorového mikroprostředí, kam patří u primárního kožního melanomu i keratinocyty, je významným faktorem sloužící k udržování „*niche*“ nádorů. Obdobné mechanismy se podílejí i na iniciaci a progresi melanomu a dalších nádorů. Studie podporující teorie o pravděpodobně uniformním vlivu CAFs v různých nádorech může být podkladem k hledání molekul k inhibici těchto mechanismů, a tak významně ovlivnit nádorový růst a progresi.

8.2.2. Fibroblasty potencují *in vitro* invazivní růst melanomových buněk vyvolaný UV ozářenými keratinocyty

Práce Jobe N.P. et al. Fibroblasts potentiate melanoma cells *in vitro* invasiveness induced by UV-irradiated keratinocytes. *Histochem Cell Biol.* 2018 May;149(5):503-516 je věnována efektu keratinocytů stimulovaných UV zářením na melanomové buňky a kombinovanému vlivu s CAFs ve srovnání s normálními dermálními fibroblasty (dále jako HF, anglicky: Human Fibroblasts).

Ultrafialové záření je jediný prokázaný zevní environmentální faktor podílející se na vzniku melanomu (66). Vedle epigenetických změn a indukci syntézy melaninu se UV záření podílí i na poškození a aktivaci keratinocytů. Samotné keratinocyty významně participují na iniciaci a progresi melanomu při zahájení vertikálního růstu pomocí produkce MMP-9 (152). Základem studie byl *in vitro* model nádorových melanocytů (linie A2058 a BLM), které byly vystaveny vlivu kondiciovaných médií obohacených o faktory kultivací normálních keratinocytů a keratinocytů vystavených UVB záření (10, 50 a 100 mJ/cm²). Součástí experimentu byla i ko-kultura linie BLM a A2058 s CAFs (tři rozdílné izoláty CAFs) z melanomu ve srovnání s HF ve 3D *in vitro* modelu, opět s použitím kondiciovaných médií z normálních a UVB ozářených keratinocytů. Kultivační experimenty byly ověřeny imunohistochemickými metodami a CAFs a HF byly porovnány na úrovni expresního profilu RNA metodou microarray (Illumina, CA, USA). Porovnání expresního profilu CAFs ukázalo rozdíl mezi CAFs a HF. Nejvýraznější rozdíl byl pozorován u CAFs v buněčné populaci ZAM (rozdíl v 1157 genech oproti HF), která současně vykazovala i vysokou expresi α -SMA. Zásadním výsledkem bylo zjištění vysoké exprese IL-6, IL-8 a CXCL-1 ve všech třech CAFs oproti kontrolním HF. Při imunohistochemické analýze, podobně jako v předchozí práci, byl porovnán efekt CAFs na keratinocyty průkazem exprese keratinů a vimentinu v keratinocytech vystavených CAFs. Ve 3D modelu, s použitím nádorových linií melanomu byl prokázán prakticky stejný efekt jak u normálních keratinocytech, tak i u těch ozářených UVB zářením. Pouze keratinocyty ozářené energií 10 mJ/cm² (nižší dávka UVB záření) vykazovaly mírně větší efekt na stimulaci melanomových linií. V další fázi byla ve 3D modelu invazivního růstu melanomových buněk použita kondiciovaná média z ozářených a neozářených keratinocytů, a navíc byl přidán i vliv CAFs (izolát ZAM) a HF. V obou případech s použitím fibroblastů došlo k indukci invazivního růstu; při použití CAFs byl invazivní růst signifikantně největší, a to jak při použití keratinocytů

ozářených 10 mJ/cm², tak i 100 mJ/cm². Ve studii byl hodnocen i vliv UV záření na poruchu integrity DNA, kde při použití 10 mJ/cm² došlo sice k poruše integrity DNA, ale změny byly krátkodobé a reverzibilní do 24 hod (p > 0,05, bez statistické významnosti). Na tyto změny nebyl pozorován případný ochranný vliv fibroblastů. Při použití 100 mJ/cm² bylo patrné větší množství letálních buněk a integrita DNA byla statisticky významně poškozena bez schopnosti obnovy do 24 hod (p < 0,001).

Hlavním výsledkem této studie je zjištění, že dokonce i jen částečným poškozením nádorového mikroprostředí (keratinocytů) UV zářením dochází ke stimulaci invazivního růstu nádorových melanocytů v *in vitro* modelu. Dokladuje vzájemnou provázanost nádorových melanocytů s buňkami mikroprostředí, včetně jejich produktů, uvolněných do kultivačního média. V práci je diskutován i vliv UV záření na indukci invazivního růstu a vliv chronického UV záření na ochranné mechanismy proti poškození DNA, o kterých je doposud známo poměrně málo (394). Významným faktorem v potencování invazivního růstu může být opět indukce exprese MMP vlivem nízkých dávek UVB záření jak v epidermis, tak i v dermis, kam UVB proniká jen částečně (395,396). Dalším významným bodem je ověření exprese IL-6, IL-8 a CXCL-1, které mohou být produkovány CAFs parakrinním způsobem. Tyto cytokiny mohou významně ovlivnit diferenciaci keratinocytů, jak dokumentují již diskutované práce (222,397). Kromě toho IL-6 a IL-8 významně potencují invazivní růst melanomových buněk v *in vitro* modelu, jak bude doloženo v popisu dalšího experimentu (398).

8.2.3. Inhibice invazivního růstu melanomových buněk indukovaná CAFs pomocí současné blokace IL-6 a IL-8

Studie Jobe N.P. et al. Simultaneous blocking of IL-6 and IL-8 is sufficient to fully inhibit CAF-induced human melanoma cell invasiveness. *Histochem Cell Biol.* 2016 Aug; 146(2): 205-17, prohloubila znalosti o indukci invazivního růstu melanomových buněk pod vlivem CAFs v *in vitro* modelu a prokázala možnost úplné inhibice těchto interakcí současnou blokací IL-6 a IL-8.

V biologii melanomu je zvýšená exprese klíčových chemokinů a cytokinů v CAFs poměrně zásadní a podílí se na utváření proinvazivního a prometastatického prostředí (399). U pacientů s melanomem lze IL-8 detekovat v séru a jeho elevace může být spojena s progresí nádoru. IL-8 je exprimován jen zřídka v normálních buňkách, ale vedle CAFs je produkován i v buňkách melanomu s možnou stimulací nádorového růstu, angiogeneze

a indukce metastatického procesu (222,400). Velký význam v biologii melanomu má i prozánětlivý cytokin IL-6, který je spojován také s progresí melanomu a může být využit jako prognostický biomarker (343,400).

Základ práce vychází z *in vitro* kultivačního experimentu a 3D modelování. Nádorové melanocyty (BLM, A2058) byly v 3D kultuře vystaveny kondiciovaným médiím z HF od zdravého pacienta a z CAFs izolovaných z kožní metastázy melanomu. Následně byl sledován invazivní růst nádorových buněk. Obdobně byl připraven model sledující proliferaci pod vlivem kondiciovaných médií z HF a CAFs a *in vitro* model hojení, který sledoval uzavírání defektu v konfluentní kultuře nádorových melanocytů, které rostly pod vlivem kondiciovaných médií z HF a CAFs. Produkce a vliv IL-6 a IL-8 byly ověřeny metodou ELISA a imunohistochemicky v nádorových melanocytech a primárních melanomech. Zásadní byl experiment s blokačními protilátkami proti IL-6 a IL-8 jak samostatně, tak v kombinaci, které byly použity v 3D *in vitro* modelu invazivního růstu melanomových buněk kultivovaných samostatně a pod vlivem kondiciovaných médií z HF a CAFs.

Výsledkem práce byl průkaz signifikantně významné indukce invazivního růstu melanomové linie BLM pod vlivem kondiciovaného média z CAFs v 3D modelu a při ko-kultivačních 2D experimentech oproti samotným nádorovým melanocytům a stejnému experimentu s HF. U linie A2058 byla pozorována signifikantní stimulace růstu i pod vlivem HF, ale v menší míře než při použití modelu s CAFs. V experimentu porovnávací vliv CAFs a kondiciovaných medií na proliferaci nebyl zjištěn významnější efekt a lze usuzovat, že invazivní růst s migrací buněk není závislý na typu stimulace proliferace (CAFs či kondiciovaná média). Metodou ELISA byla dále prokázána větší produkce IL-8 u melanomových buněk (BLM, A2058) oproti fibroblastům (CAFs a HF) a IL-6 naopak u fibroblastů (CAFs i HF) než u melanomových buněk. Produkce IL-6 byla zvýšená i při ko-kultivaci linie A2058 s CAFs, u linie BLM byla navíc zvýšena i při ko-kultivaci s HF. U IL-8 došlo k navýšení produkce pouze při ko-kultivaci s CAFs. Imunohistochemicky byl IL-6 a IL-8 navíc exprimován i v některých primárních melanomech. Nejvýznamnějším výsledkem této studie je zjištění, že použitím kombinace protilátek proti IL-6 a IL-8 v kultivačním systému lze kompletně inhibovat invazivní migraci, navozenou kondiciovaným médiem zejména z CAFs.

Tato práce významně prohlubuje znalosti o nádorovém mikroprostředí melanomu a potencování invazivního růstu a migrace pomocí CAFs a charakterizuje i vliv cytokinu IL-6 a chemokinu IL-8, které se v tomto procesu účastní. I když výsledky této práce

jednoznačně poukazují na vliv IL-6 a IL-8, nejedná se o jediné faktory, které se na těchto interakcích mohou podílet. Jejich produkce nádorovými melanocyty a CAFs nebyla zcela uniformní. Další molekulou, která se může podílet na potencování produkce IL-8, je např. IL1B (399). Stěžejním výsledkem této práce je ověření významu blokace těchto molekul, což může být nápomocné pro hledání nových cest při překonávání mechanismů rezistence na léčebná schémata melanomu. Význam těchto experimentů dokladuje práce s blokací IL-6 a anti-PD-1 s možností překonání některých mechanismů rezistence na *checkpoint* inhibitory. U některých pacientů léčených anti-PD-1 byla detekována vyšší hladina IL-6, která byla navíc spojena s horší prognózou. Současná blokace IL-6 a celé této signalizace vedla v myším modelu melanomu k navýšení exprese INF- γ produkovaného CD4⁺ T-lymfocyty a následnému posílení anti-PD-1 terapie (401). *In vitro* modelování v 3D podmínkách přináší nové poznatky o migraci a invazivním růstu nádorových buněk za definovaných podmínek a patří mezi standardní metody studia nádorového mikroprostředí (398,402).

8.2.4. Mikroprostředím zprostředkovaná rezistence na cílenou terapii BRAF inhibitory je spojena se změnami genové metylace a exprese v distálních fibroblastech

Tato studie Kodet O. et al. Microenvironment-driven resistance to B-Raf inhibition in a melanoma patient is accompanied by broad changes of gene methylation and expression in distal fibroblasts. *Int J Mol Med.* 2018 May;41(5):2687-2703, významně propojila klinické sledování pacientů léčených s melanomem se základním výzkumem na našem pracovišti.

Léčba pacientů cílenou terapií BRAF inhibitory přinesla do terapie melanomu revoluci s dosud nevídaným procentem terapeutických odpovědí (110,112). Bohužel, po úvodních úspěších v léčbě metastazujícího melanomu cílenou terapií bylo nutné hledat mechanismy, které vedou k poměrně časně rezistenci na tuto léčbu. Částečné překonání rezistence se podařilo po zavedení kombinace s MEK inhibitory (115). Velký význam je v současné době věnován i mechanismům rezistence, které jsou způsobeny interakcemi nádorových buněk s komponentami nádorového mikroprostředí.

Práce byla založena na izolaci CAFs z metastázy melanomu od pacientky s generalizovaným melanomem (primární akrolentiginózní melanom Breslow 4,0; Clark IV) před zahájení léčby BRAF inhibitem vemurafenibem. Tři měsíce od zahájení

terapie byl odebrán kontrolní vzorek z anatomicky podobné, ale zdravé kůže k izolaci kontrolních dermálních fibroblastů (dále jako ACFs, anglicky: Autologous Control Fibroblasts). K porovnání CAFs a ACFs byly použity i HF z jiného zdravého pacienta. Ze získaných fibroblastů byla izolována RNA a DNA k analýze transkriptomu a genové metylace. Fibroblasty byly dále kultivovány pro potřebu imunocytochemické detekce proteinů, zejména pak α -SMA.

V této práci se podařilo prokázat expresi α -SMA v menší míře v izolovaných CAFs, ale především v ACFs po 3 měsících léčby vemurafenibem. Pomocí imunohistochemického značení byla prokázána exprese α -SMA v metastáze melanomu, ze kterého CAFs byly izolovány. Byla prokázána i exprese TGF- β 1 v buňkách melanomu, který je za indukci myofibroblastů a tedy expresi α -SMA odpovědný. Tato pozorování byla ověřena kultivačním experimentem s HF, které byly vystaveny vlivu TGF- β 1 s následnou indukcí myofibroblastů s expresí α -SMA. Z DNA izolátu z metastázy melanomu byla stanovena BRAF mutace V600E, která nebyla detekována v izolovaných CAFs z této metastázy. Při porovnání expresního profilu RNA u CAFs, ACFs, a HF microarray metodou byly zjištěny značné rozdíly v expresi jednotlivých genů. CAFs oproti ACFs byly rozdílné v 1800 genech a oproti HF dokonce v 2701 genech. Z této analýzy se podařilo porovnat geny up-regulované a down-regulované u jednotlivých fibroblastů, navzájem a mezi skupinami (CAFs a ACFs vs HF, CAFs a HF vs ACFs apod.). Analyzované rozdílné geny odpovídají za proliferaci, angiogenezi, proliferaci endoteliálních buněk, produkci ECM účastníci se hojení, ale i geny regulující Wnt signalizaci. Byla též detekována up-regulace IL-6 a VEGF-A. Abychom byli schopni vyhodnotit, zda změny v transkripční aktivitě různě exprimovaných genů byly spojeny s epigenetickými změnami fibroblastů, byly mezi kultivovanými fibroblasty pomocí technologie microarray detekovány rozdílně metylované genomové oblasti (dále jako DMRs, anglicky: Differentially Methylated Regions). Celkem 2300 DMRs oblastí bylo detekováno při porovnání CAFs a ACFs, ve srovnání CAFs a HF bylo detekováno dokonce 2908 DMRs a při porovnání ACFs a HF 1835 DMRs. Tyto nálezy poukazují na rozdíl mezi ACFs (navzdory odebrání vzorku z nepostižené kůže) a HF ze zdravého (ale jiného) pacienta bez melanomu. CAFs vykazovaly hyper-metylace v genových oblastech spojených s SMA (ACTA2) a FGF2. ACTA2 byl navíc hypometylován v HF při srovnání CAFs a ACFs. Nejvýznamnější změny na úrovni genové metylace byly detekovány zejména u CAFs a ACFs a to ACTA1 a ACTA2, geny kódující SMA, růstové faktory FGF11, FGF22 a BMP8B, dále pak chemokiny a interleukiny CXCL12, IL6 a

IL32. V konečné analýze byly vyhodnoceny expresní profily a metylační profily spolu s vybranými geny s nejsilnějšími změnami v genové expresi, a to: aktiny ACTC1 a ACTG2; růstové faktory FGF13, BMP6 a TGFA; chemokiny a interleukiny CXCL-5, -6, -12, IL-1B, IL-6, IL-8, IL-11 a IL-24; a keratin KRT7. Ve výsledné analýze bylo pozoruhodné, že expresní profil ACFs byl bližší HF, ale metylační profil byl bližší CAFs.

Práce vedle možných mechanismů rezistence na cílenou terapii, zprostředkovanou produkcí TGF- β 1 a indukci tvorby myofibroblastů diskutuje i další faktory podílející se na nádorové rezistenci. TGF- β stimulované fibroblasty jsou schopny produkce HGF, který se může vázat na receptor MET a aktivovat alternativní cestu v MAP kinázové signalizaci. Vliv BRAF inhibitorů s aktivací MAP kinázové signalizace byl detekován i v CAFs, což může přispívat k obranným buněčným mechanismům a změnám např. v produkci ECM (217–220). Samotné CAFs v této studii nevykazovaly BRAF mutaci, proto lze usuzovat, že jejich původ pochází spíše z lokálního mezenchymu než procesem EMT z nádorových buněk. Při porovnání CAFs a HF byly pozorovány výrazné rozdíly jak na úrovni genové exprese, tak i metylace. Jedním z faktorů, které se významně podílejí na přeměně lokálních dermálních fibroblastů na CAFs je právě TGF- β 1, uvolňovaný parakrinním způsobem z buněk melanomu, který může působit i na systémové úrovni a ovlivňovat i vzdálené fibroblasty (403). Porovnání profilů exprese CAFs, ACFs a HF ukázalo, že ACFs vykazují vyšší aktivitu genů odpovědných za aktivaci fibroblastů a nádorových buněk, zejména důležitých mediátorů, jako je TGF- β , nebo v předchozích studiích diskutovaný IL-6. ACFs také prokázaly disregulaci exprese ACTG2 a dalšího genu spojeného s tvorbou hladkosvalových proteinů (aktinu), typického pro myofibroblasty nádorového mikroprostředí, ale i hojící se rány. Kriticky je nutné zmínit, že se jedná o studii pouze u jednoho pacienta a výsledky by bylo vhodné ověřit na větším souboru pacientů.

8.2.5. Xenotransplantát melanomových buněk na choriolantoidní membránu kuřecího embrya: komplexní biologický model pro studium nádorových buněk.

Tato práce (Strnadová et al. Melanoma xenotransplant on the chicken chorioallantoic membrane: a complex biological model for the study of cancer cell behaviour. *Histochem Cell Biol.* 2020 Aug;154(2):177-188) se věnovala implantaci

nádorových melanocytů na chorioalantoidní membránu kuřecích embryí s cílem definovat možný *in vivo* model pro studium nádorového mikroprostředí.

Nejčastěji používaný zvířecí model pro studium nádorů je založen na různých inbredních myších kmenech. V porovnání k *in vitro* výsledkům, založeným na laboratorních experimentech, nabízejí myší modely mnohem vyšší biologickou komplexnost, které nelze v kultivačních 2D i 3D modelech docílit. Vzhledem k rozmanitosti imunodeficientních kmenů experimentálních myší je někdy složité vybrat ten správný kmen, který odpovídá požadavkům experimentu. Navíc je nutné zmínit, že i tento model má své limity (404).

Základem experimentu byla příprava kultivovaných nádorových melanocytů, linie BLM, A2058 a G361 a kontrolních neonatálních melanocytů HPM. Dále byly izolovány embryonální kuřecí fibroblasty z chorioalantoidní membrány (dále jako CAM, anglicky: Chorioallantoic Membrane) a dospělé kuřecí fibroblasty, z obou byla připravena i kondiciovaná média. Oplodněná vejce hybridního kuřátka Ross 308 (*Gallus gallus domestica*; Xaverov, Česká republika) byla inkubována ve zvlhčené atmosféře při 37,5°C po dobu 4 dnů do fáze 22–24 podle Hamburgera a Hamiltona (405). Následně bylo do skořápky vyříznuto manipulační okénko. V definované skupině embryí bylo na povrch chorioalantoidní membrány, před aplikací nádorových melanocytů, transplantováno primordium z horní končetiny kuřecího embrya (HH 23–24) jako model hypoxického prostředí. Po dvou dnech byly na povrch CAM implantovány melanomové buňky v podobě koncentrované suspenze v koncentraci 10^6 v 10 μ l v PBS. Celkově bylo použito 45 embryí, která byla zpracována základními histologickými a imunohistochemickými metodami. Byl studován vliv kondiciovaných médií z kuřecích fibroblastů (fetálních i dospělých) na růst a metabolickou aktivitu nádorových melanocytů. Kondiciovaná média připravená z kuřecích fibroblastů byla schopna signifikantně zvýšit proliferaci nádorových melanocytů, ale pouze u linie A2058 byl statistický rozdíl mezi kondiciovaným médiem z embryonálních kuřecích fibroblastů ve srovnání s dospělými kuřecími fibroblasty ($p > 0,002$). I při měření metabolické aktivity (MTT test) byl pozorován rozdíl pouze u linie A2058 ($p > 0,001$). Všechny nádorové linie na povrchu CAM byly schopny vytvořit kolonie, které byly ověřeny expresí vimentinu (clon V9, pouze lidský), navíc migrující nádorové melanocyty byly patrné podél cév CAM (především v pozdější fázi experimentu - 6 den). Invaze nádorových buněk do stromatu CAM byl však vzácnější jev, který byl pozorován jen ve 2 případech. Invaze nádorových melanocytů byla prokázána expresí HMB-45. Při použití hypoxického

modelu s transplantovaným primordiím končetiny došlo k neovaskularizaci v místě štěpu a posílení cévního zásobení s následným růstem končetiny. Nádorové melanocyty byly poté přitahovány k místu primordia, obklopily ho a ve dvou případech byla prokázána infiltrace stromatu primordia buňkami melanomu (prokázáno imunohistochemicky expresí HMB-45). Nádorové melanocyty se nepodařilo prokázat v orgánech kuřecího embrya.

Tato studie ukazuje, že CAM kuřecího embrya nabízí atraktivní a aktivní biologický model pro *in vivo* modelování nádorového mikroprostředí. Výhodou tohoto modelu je poměrně nízká cena, nevýhodou je však poměrně náročná preparace a následné zpracování tkání pro imunohistochemické analýzy (zejména pečlivé prokrajování a hledání nádorových buněk). Kondicionovaná média z kuřecích fibroblastů představují také zajímavý pokus modelovat vliv fetálního prostředí na nádorové. Faktory, které jsou odpovědné za tyto změny, mohou být obdobné jako v přechozích experimentech, tedy IL-6, IL-8, VEGF-A, jejichž exprese u kuřecích fibroblastů může být stimulována teplem, ale např. i infekcí (406). Samotné kuřecí embryo představuje pro biologii melanomu dlouhodobě ověřený model, ve kterém buňky melanomu aplikované do kuřecího embrya ztrácí svůj maligní potenciál (28). Omezené šíření nádorových melanocytů v CAM může poukazovat na fakt, že embryonální mikroprostředí vykazuje protinádorový účinek na buňky melanomu inhibicí dráhy PI3K/AKT. Tento vliv na mikroprostředí nádoru představuje zajímavý model pro studium biologie melanomu a např. i mechanismů rezistence na cílenou terapii (407,408).

Soubor těchto prací přináší prohloubení znalostí o nádorovém mikroprostředí melanomu. Velký důraz v těchto studiích je kladen na vliv CAFs z melanomu a vzájemným interakcím nádorových melanocytů s ostatními komponentami nádorového stromatu, jako jsou keratinocyty. Poměrně zásadní jsou poznatky ohledně možné inhibice invazivního růstu a migrace nádorových melanocytů pomocí blokačních protilátek proti IL-6 a IL-8 a studium mechanismů rezistence na cílenou léčbu, která může být zprostředkována i aktivací nádorového mikroprostředí.

8.3.Nádorové biomarkery melanomu

Hledání a studium nových biomarkerů, pomocí kterých bychom dokázali lépe a rychleji diagnostikovat, nebo i predikovat nádorová onemocnění včetně melanomu, se věnuje celá řada publikací a studií. V biologii melanomu je již v klinické praxi využíváno celé spektrum prognostických a prediktivních biomarkerů (kapitola 5.3.). Bohužel žádný není zcela spolehlivý a uniformní, a proto je hledání nových molekul s možným potencionálním zavedením do klinické praxe významnou součástí studia biologie melanomu. V diagnostice melanomu jsou významné i diagnostické markery, které by pomohly rozlišit benigní melanocytární léze a melanom.

8.3.1. Exprese Glut-1 u melanomu a melanocytárních névů

V práci Důra et al. Expression of Glut-1 in Malignant Melanoma and Melanocytic Nevi: an Immunohistochemical Study of 400 Cases. Pathol Oncol Res. 2019 Jan;25(1):361-368, byla studována exprese glukózového transportéru-1 (Glut-1) v primárních kožních melanomech v porovnání s melanocytárními névy.

Glut-1 je glykoprotein buněčné membrány, který se podílí na buněčné absorpci glukózy. Zvýšená exprese Glut-1 je důležitým mechanismem adaptace buněk proti hypoxii. Zvýšenou expresi Glut-1 lze detekovat v některých typech zhoubných nádorů, kde dochází ke změně metabolismu založeného na oxidativní fosforylaci na aerobní glykolýzu. Zvýšená exprese Glut-1 byla detekována v některých nádorech, kde byla spojena s vyšším stupněm progresu nádoru a postižením lymfatických cév a uzlin (409,410). V nenádorové tkáni může být exprese Glut-1 detekována například v erytrocytech, perineuriálních buňkách, v buňkách trofoblastu, dlaždicovém epitelu, renálních tubulech a některých endoteliálních buňkách. Expresi Glut-1 lze nalézt také v některých benigních nádorech (např. perineurinomu, hemangiomu). Doposud se jen několik studií věnovalo expresi Glut-1 v melanocytárních lézích, navíc s nesourodými výsledky (411,412).

V této studii bylo imunohistochemicky retrospektivně vyšetřeno celkem 225 vzorků pacientů s primárním melanomem a 175 vzorků pacientů s melanocytárními névy. Po zavedení a ověření metodiky byla pouze membránová pozitivita hodnocena jako vypovídající a odpovídající pozitivní kontrole (H-skóre 15). Výsledky expresního profilu

pacientů s melanomem byly statisticky vyhodnoceny s hodnotou Breslowa a klinickými údaji 10letého přežití, přežití bez recidivy (RFS) a přežití bez metastatického postižení (dále jako MFS, anglicky: Metastatic Free Survival).

Výsledkem byla detekce exprese Glut-1 v 69 melanomech (z 225), která korelovala s hodnotou Breslowa a patologickým stádiem (pT1 10% pozitivních, pT2 36% pozitivních, pT3 36,4% pozitivních a v pT4 dokonce 78,8% pozitivních nálezů; $p < 0,00001$). U melanocytárních névů se membránová exprese Glut-1 nepodařila prokázat. Vedle dobré korelace hodnoty Breslowa a pT klasifikace byla prokázána i korelace s klinickými údaji. Při použití univariantní analýzy byla patrná korelace exprese Glut-1 se snížením 10letého přežití ($p=0,00734$; 24 pacientů zemřelo), 10letého RFS ($p = 0.00003$; 36 pacientů mělo lokální recidivu) a 10letého MFS ($p = 0.0005$; 41 pacientů mělo metastatické postižení).

Tato studie prokázala, že membránová exprese Glut-1 může být nápomocným prognostickým markerem, zejména u pacientů s vyšší hodnotou Breslowa a tedy i horším stupněm TNM klasifikace. Exprese v benigních melanocytárních névech je poměrně vzácná (námi neprokázaný jev), a proto může být exprese Glut-1 použita při rozlišení benigních a maligních melanocytárních lézí. I když tato práce přináší největší doposud publikovaný soubor vyšetřených pacientů s melanocytárními névy, je nutné kriticky zmínit, že navzdory dobré specifitě, při hodnocení membránové exprese je senzitivita poměrně nízká na rozdíl od jiných typů nádorů (410).

8.3.2. Stathmin jako potenciální terapeutický cíl, ale nikoli prognostický marker u melanomu

Práce Dunder et al. Stathmin is a potential therapeutic target but not a prognostic marker in melanoma: an immunohistochemical study of 323 melanocytic lesions. *Melanoma Res.* 2019 Apr;29(2):157-162 je věnovaná studiu exprese stathminu u melanomu v porovnání s klinickými údaji pacientů.

Stathmin (také známý jako Op18, p18, p19, stathmin 1 a metablastin) je cytosolový fosfoprotein podílející se na regulaci dynamiky mikrotubulů a buněčného cytoskeletu. Tento protein má čtyři fosforylační místa (Ser 16, 25, 38, 63), která v reakcích na extracelulární signály (nebo během mitózy, pomocí CDK1 a CDK2 kináz), mohou ztrácet schopnost fosforylace a následně může docházet k nedostatečné vazbě volných tubulinů (413). Mikrotubuly se podílejí vedle dělení buněk i na jejich motilitě a

intracelulárním transportu (414). V některých nádorech byla exprese stathminu spojena s horší prognózou a s rezistencí na chemoterapii. V biologii melanomu je o této molekule známo poměrně málo (415,416). V této studii byla provedena analýza exprese stathminu v melanocytárních lézích s porovnáním benigního névu a melanomu. Výsledky exprese ve vyšetřených melanomech byly statisticky porovnány s klinickými údaji a sledováním, s cílem stanovit prognostický význam exprese stathminu u melanomu.

Ve studii bylo imunohistochemicky vyšetřeno celkem 205 primárních melanomů, 60 metastáz melanomu a 58 benigních melanocytárních lézí ($n = 323$). Vzorky melanomů byly rozděleny dle TNM klasifikace do 4 skupin ($pT1 \leq 1\text{mm}$, $pT2 >1-2\text{mm}$, $pT3 >2-4\text{mm}$, and $pT4 >4\text{mm}$). Primární melanomy a melanocytární benigní léze byly rozděleny dle anatomické lokalizace do 4 skupin (hlava, trup, horní a dolní končetiny). Metastatické léze byly rozděleny také dle anatomické lokalizace (35 metastáz do lymfatických uzlin, 16 kožních a 5 do jiných orgánů, zahrnujících játra, cékum, prso, pleuru a nadledvinu). Statistická analýza byla zaměřena na porovnání výsledků s cílem vyhodnotit přežití bez onemocnění (dále jako DFS, anglicky: Disease Free Survival), lokální přežití bez recidivy onemocnění (dále jako LFS, anglicky: Local Free Survival) a MFS.

Expresce stathminu u melanomů a melanocytárních névů byla poměrně homogenní a uniformní, u vyšetřených metastáz byla exprese stathminu poměrně heterogenní bez jasně predikované lokalizace v klastrech nádorových buněk. H-skóre hodnocených lézí bylo pro melanocytární névy v průměru 146,1, pro melanom 116,7 a pro metastázy melanomu 136,8 (průměrná hodnota). Výrazně nižší úroveň exprese byla pozorována v primárních melanomech (Kruskal – Wallisův test, $H = 17,73$, $N = 323$, $P = 0,001$), a navíc zde byla zjištěna korelace s pohlavím pacientů ($p = 0,041$) a anatomickou lokalizací ($p = 0,011$). Vyšší exprese stathminu byla pozorována u žen v melanomech lokalizovaných na hlavě a dolních končetinách oproti horním končetinám a trupu. Nepodařilo se prokázat korelaci mezi věkem, typem primárního melanomu nebo TNM klasifikací. Ani při srovnání analýzy s klinickými daty, resp. DFS, LFS a MFS nebyla pozorována statistická závislost.

Stathmin je vysoce exprimován a up-regulován u několika maligních nádorů a jeho vyšší exprese koreluje s diferenciací nádoru, proliferací, invazivním růstem nádorových buněk a jejich migrací (415). Potlačení funkce stathminu může utlumit buněčný růst melanomových buněk, a proto se jedná o molekulu s terapeutickým potenciálem (416). Některé preklinické studie poukazují i na možnosti inhibice stathminu, která vede k apoptóze a inhibici růstu nádorových buněk, včetně jejich

schopnosti migrovat (417,418). I když tato studie neprokázala možnost využití exprese stathminu pro diagnostické a prognostické účely, včetně diferencially diagnostického rozlišení benigních melanocytárních lézí a melanomu, jedná se o molekulu s potenciálním využitím v léčebné strategii melanomu.

8.3.3. Srovnání pěti různých skórovacích metod při hodnocení TILs u povrchově se šířícího a nodulárního melanomu

V práci Němejcová et al. Comparison of five different scoring methods in the evaluation of inflammatory infiltration (tumor-infiltrating lymphocytes) in superficial spreading and nodular melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2019 May;32(3):412-423, se podařilo stanovit prognostický význam hodnocení TILs u melanomu pomocí pěti různých metodik. Práce je již částečně popsána v kapitole věnované TILs (kapitola 4.3.2).

T-lymfocyty, které se nacházejí ve stromatu nádorů, se označují jako TILs a řadíme k nim podskupiny CD8⁺ T-lymfocytů, CD4⁺ T-lymfocytů, NK buňky a také B-lymfocyty. TILs hrají hlavní roli v protinádorových imunitních reakcích a jsou spojovány i s lepší prognózou pacientů s melanomem (229,230). Zásadní úloha je i v léčebné strategii při použití *checkpoint* inhibitorů, kde hojný infiltrát TILs je spojený s lepší terapeutickou odpovědí, a naopak chudý (či žádný) infiltrát a nedostatečná stimulace neoantigeny mohou odpovídat za mechanismy rezistence na *checkpoint* inhibitory (279,323–325). Význam histologického hodnocení TILs má pro klinickou praxi velký význam a přináší povědomí o stavu protinádorového imunitního stavu pacienta. Pro hodnocení infiltrátu TILs existuje několik různých metodik, vycházejících z rutinního histopatologického vyšetření.

Tato studie porovnávala 5 nezávislých hodnocení na 213 primárních melanomech s korelací ke klinickým údajům a prognostickému významu. Jednotlivé metodiky zahrnují: Clarkovo skóre (232), systém australského melanomového institutu MIA (233), skórovací systém použitý ve studii Saldanha et al. (234), skórovací systém ze studie TCGA modifikovaný dle Parka a Kima (235) a systém IIOBWG (229,230). Popis jednotlivých systémů je podrobně dokumentován v samotné publikaci.

K porovnání jednotlivých nálezů byla použita statistická analýza TILs v melanomu a porovnání histologických údajů (typ melanomu, hodnota Breslowa) s klinickými nálezy (věk pacienta v době diagnózy, pohlaví, anatomická lokalizace) a

stratifikace pacientů dle TNM klasifikace. Statistická analýza byla použita k hodnocení prognostických údajů DFS, LFS a přežití bez metastatického postižení (v práci označeno jako DMFS).

Všech 213 (150 SSM a 63 NM) primárních melanomů bylo podrobena hodnocení čtyřmi metodami. Pro metodu IIOBWG bylo použito 156 primárních melanomů, v ostatních případech byla hodnota Breslowa příliš nízká, a proto tato metoda nemohla být správně použita (229). Medián hodnoty Breslowa byl 2,05 mm (průměr 2,94 mm), Přítomná regrese melanomu, která by mohla ovlivnit hodnotu Breslowa byla pozorována v 59 případech. Statisticky byly zpracovány všechny dostupné nálezy u všech pěti použitých systémů, hodnocení dle Clarka (Kappa index = 0,98; $p < 0,001$), MIA (Kappa index = 0,99; $p < 0,001$); bodovací systém použitý ve studii Saldanha et al. (Kappa index = 0,99; $p < 0,001$); bodovací systém používaný ve studii TCGA a upravený dle Park et al. (Kappa index = 0,97 nebo až 1,0 pro peritumorózní nebo intratumorózní hodnocení; $p < 0,001$); a systém IIOBWG (Kappa index = 0,88 pro hodnocení infiltrace v invazivním okraji; $p < 0,001$). Významná shoda byla pozorována pro hodnocení IIOBWG TILs v invazivní části stromatu (Kappa index = 0,76; $p < 0,001$) a v invazivní části nádoru (Kappa index = 0,69; $p < 0,001$). Všech pět skórovacích systémů bylo podrobena univariantní a multivariantní statistické analýze. Clarkovo skóre, MIA systém a IIOBWG prokázaly statisticky signifikantní nálezy pro všechny tři analyzované cíle DFS, LFS a DMFS (výraznější infiltrát byl spojený s lepší prognózou). U systému IIOBWG byl prognostický nález patrný pouze u hodnocení stromální komponenty TILs, ale už ne u hodnocení intratumorózních TILs a TILs v oblasti invazivního okraje melanomů. Pro hodnocení TILs dle metody Saldanha et al. a ze studie TCGA modifikované dle Park et al. nebyla patrna signifikantní závislost ani v jednom ze sledovaných klinických údajů (DFS, LFS a DMFS). Při použití multivariantní analýzy s kovariantami zahrnujícími hodnotu Breslowa, typ melanomu, věk, pohlaví a anatomickou lokalizaci, nebyly TILs vyhodnoceny jako pomocný prognostický marker pro DFS, LFS a DMFS.

Tato práce poukazuje na limity jednotlivých systémů pro hodnocení TILs u melanomu a především použitelnost pro prognostické účely. Z pěti použitých systémů byla statistická významnost pozorována pouze u tří systémů (Clarkovo skóre, MIA systém a IIOBWG), navíc systém IIOBWG u melanomu ukazuje své limity a prakticky nepoužitelnost pro melanomy s nižší hodnotou Breslowa. Význam TILs v biologii melanomu byl diskutován v předchozích kapitolách. Pro strategii léčby pomocí *checkpoint* inhibitorů a její případné selhání je dostatečná přítomnost TILs v nádoru

poměrně zásadní, i když řada pacientů bez TILs v melanomu může na imunoterapii dobře reagovat. Hodnocení TILs je tedy spíše pomocným biomarkerem pro melanom a mělo by být standardem při histologickém vyšetření primárních melanomů. V současné době, při možnostech již rutinního použití terapie melanomu *checkpoint* inhibitory, a to nejenom při metastatickém postižení, ale i v adjuvantním a především neoadjuvantním režimu podání (83,91), je význam TILs akcentován.

8.3.4. Proteomická analýza sér pacientů s melanomem s imunohistochemickým profilem primárních melanomů a kultivovaných buněk

V práci Kučera et al. Serum proteomic analysis of melanoma patients with immunohistochemical profiling of primary melanomas and cultured cells: Pilot study. *Oncol Rep.* 2019 Nov;42(5):1793-1804 byly detekovány bioaktivní molekuly v séru pacientů s melanomem a byla sledována jejich korelace s expresí vybraných molekul v primárních melanomech těchto pacientů a v kultivovaných buňkách. Cílem práce byla detekce molekul s prognostickým významem.

Sérologické biomarkery melanomu jsou nejběžněji používané markery k monitorování onemocnění (S100B, LDH), ale lze je využít i jako prognostické, a především i jako prediktivní biomarkery terapeutické odpovědi např. u *checkpoint* inhibitorů (S100B, LDH, CRP) (370–372,419). Poměrně velký význam mají i již diskutované molekuly jako je IL-6 a IL-8, jejichž detekce může být spojena s progresí melanomu, a navíc hrají významnou roli v samotném mikroprostředí melanomu (399,400,402,420,421). Další význam v detekci nových molekul je snaha identifikovat mechanismy rezistence na nová léčebná schémata, jako je imunoterapie a cílená terapie. Jednou z těchto molekul je diskutovaný růstový faktor HGF, který je produkován CAFs z melanomu a odpovídá za aktivaci alternativních cest MAP kinázové signalizace (219).

Tato pilotní studie byla postavena na proteomické analýze sér pacientů a jejím porovnání s expresí vybraných molekul v primárních melanomech, v kultivovaných nádorových melanocytech, neonatálních melanocytech a CAFs. Do studie bylo zařazeno celkem 12 pacientů, u kterých byla odebrána séra v době klinické diagnózy melanomu (bez známek metastatického postižení v době diagnózy), po jeho radikálním chirurgickém odstranění i s extirpací sentinelové uzliny (1 měsíc po chirurgickém výkonu) a 3 měsíce po chirurgickém výkonu. Stejným způsobem byla odebrána i séra

zdravým dobrovolníkům (n = 3). Séra byla vyšetřena pomocí Luminex analýzy, celkem 31 cytokinů, chemokinů a růstových faktorů. Výsledky a statistická zhodnocení vybraných analytů byly ověřeny pomocí imunohistochemické detekce v primárních melanomech studovaných pacientů, v kultivovaných buňkách nádorových melanocytů (A2058, BLM, MP17), neonatálních melanocytech (dále jako HPM, anglicky: Highly Pigmented Melanocytes), v CAFs (ZAM, MAM) a v dermálních fibroblastech (HF).

Samotné výsledky analýzy sér byly statisticky vyhodnoceny a porovnány s klinickými údaji pacientů. Při porovnání hodnoty Breslowa (s vyšší hodnotou) byla patrná souvislost s detekcí IL-6, IL-8, IL-13 a VEGF. Při porovnání klinického stádia dle TNM klasifikace byla patrná souvislost s detekcí IL-1RA, IL-13, IFN- α a RANTES (s vyšším stádiem). Z vybraných proteinů byla imunohistochemicky potvrzena exprese IL-6 a jeho receptoru IL-6R v primárních melanomech, podobně tomu bylo i v případě IL-8 a jeho receptoru CXCR-1. Receptor CXCR-2 byl exprimován jen velmi omezeně ve 2 případech. VEGF byl exprimován pouze v epidermis v okolí melanomů podobě jako receptor 2 (VEGF-R2). V melanomu byl exprimován jen receptor-1 pro VEGF (VEGF-R1). HGF byl přítomný zejména v CAFs, ale jeho korelace již nebyla signifikantně změněna při korelaci s hodnotou Breslowa a TNM klasifikací. Podobné výsledky exprese jednotlivých molekul byly detekovány i v kultivovaných melanomových buňkách oproti kontrolním neonatálním melanocytům. Výrazný rozdíl byl v expresi VEGF, která byla patrná ve všech nádorových liniích. Neonatální melanocyty byly kromě exprese IL-6R negativní. Expresе těchto proteinů byla zřetelná i v CAFs oproti HFP4, kde však byla, kromě exprese VEGF-R2, méně intenzivní.

Význam IL-6 a IL-8 v biologii melanomu byl hojně diskutován v předchozích pracích a i v teoretickém úvodu (399,400,402,420,421). Podobně tomu je i v případě VEGF, který hraje významnou úlohu jak při samotné iniciaci a progresi melanomu, tak se může podílet na mechanismech selhání cílené terapie, ale i imunoterapie *checkpoint* inhibitory (168,280,345,422,423). Korelace těchto nálezů s rostoucí hodnotou Breslowa a klinickým stádiem poukazuje na možnost použití těchto molekul vedle monitorace stavu onemocnění i pro prognostické účely. I když výsledky této studie jsou slibné a podporují i předchozí práce a literární znalosti, je tato práce značně limitována omezeným souborem pacientů. Výsledky bude nutné ověřit na větším souboru pacientů s melanomem a příslušných kontrolách, včetně statistického zhodnocení z dlouhodobého sledování.

Hledání nových biologických markerů má pro biologii melanomu nezpochybnitelnou hodnotu a prohlubuje znalosti jak z klinických sledování, tak experimentálních modelů. Některé tyto molekuly navíc představují potenciální cíl terapeutického zájmu. Zásadní jsou i poznatky o IL-6 a IL-8 a jejich detekce v séru pacientů s melanomem, které potvrzují předchozí výsledky získané na základě *in vitro* modelování nádorových melanocytů a CAFs.

8.4.Genetické alterace melanomu

Studium genetického pozadí představuje významnou součást bazálního výzkumu biologie melanomu a pomáhá odhalit faktory uplatňující se v patogenezi melanomu, ale i faktory, které se podílejí na řízení rezistence na cílenou terapii a imunoterapii. Studium této problematiky může poodhalit i nové směry budoucí léčby a pomáhá pochopit složité regulační mechanismy nádorových buněk. Vyšetření BRAF mutace je již zlatým standardem u pacientů s metastatickým postižením a s rozvojem adjuvantní cílené terapie bude brzy i standardem u pacientů s diagnostikou melanomu stadia III (89). Vyšetřování genů CDKN_{2A} a CDK₄ má význam u pacientů s výskytem melanomu v časném věku, a navíc s výskytem melanomu v rodinné anamnéze (odhalení familiární varianty melanomu (54)). Ostatní častější mutace se standardně nevyšetřují (NRAS, KIT), spíše ale pro nedostatek účinné léčebné strategie (včetně úhradových mechanismů), než z technických důvodů (149,304).

8.4.1. Komplexní hodnocení patogenních mutací v primárních kožních melanomech, včetně identifikace nových variant

V práci Ticha et al. A comprehensive evaluation of pathogenic mutations in primary cutaneous melanomas, including the identification of novel loss-of-function variants. Sci Rep. 2019 Nov 19;9(1):17050, byly studovány patogenní mutace v primárních melanomech.

S rostoucí incidencí melanomu a možnostmi léčby je genetická problematika existujících alterací již hojně studována. Zárůdečné mutace v řadě genů byly spojeny se zvýšeným rizikem familiárního melanomu, který představuje asi 10 % všech melanomů. Mezi germinálními mutacemi, které byly identifikovány jako rizikové pro možný výskyt

melanomu, patří CDKN₂A, CDK₄, ale i mutace v genech MITF, BAP1, TERT a POT1. Řada těchto mutací může být spojena i s familiárním výskytem jiných nádorů (např. BAP1 a karcinom mléčné žlázy) (54,56,424). Několik studií také analyzovalo spektrum somatických mutací v jednotlivých podtypech melanomů a identifikovaly tak klíčové mutace „drivers mutations“ melanomu, ke kterým patří mutace v genu BRAF, RAS (hlavně NRAS a mutace v HRAS a KRAS, které jsou vzácnější < 1 %), NF1, TP53, CDKN₂A, PTEN, IDH1, ARID2, RAC1, RB1 a PPP6C (142,143,391,425,426). Systematické analýzy genomových dat, získané z veřejně přístupných údajů *Research Network* (<https://www.cancer.gov/tcga>), identifikovaly další geny spojené buď s citlivostí, vývojem nebo progresí melanomu (427,428). Nicméně většina dříve publikovaných studií, zabývajících se identifikací často mutovaných genů u melanomu, neprováděla podrobnější popis způsobu hodnocení patogenity detekovaných mutací, zejména pokud jde o nové, neléčené varianty a varianty s jedním nukleotidem, nebo varianty s protichůdnou interpretací. Proto údaje o prevalenci patogenních a pravděpodobně patogenních mutacích a jejich role v melanomogenezi nebyla doposud systematicky analyzována.

V práci byly použity parafínové řezy k izolaci DNA od více než 200 pacientů, ale pouze u 114 pacientů se podařilo izolovat DNA v dostatečné kvalitě pro další možné zpracování. Vzorky pacientů byly rozděleny dle TNM klasifikace (7. edice) do 4 skupin (pT1 ≤1 mm, pT2 >1 - ≤2 mm, pT3 >2 - ≤4 mm, a pT4 >4 mm), dále dle věku, pohlaví a dle přítomnosti TILs. U vybraných pacientů byla navíc izolována DNA z nenádorové tkáně k ověření přítomné germinální mutace, nebo jen nádorové somatické mutace. Izolace DNA a příprava genomové knihovny je popsána v metodice samotné práce.

Díky sekvenování nové generace (NGS) primárních melanomů od 14 pacientů bylo detekováno průměrně 288 variant na vzorek, včetně všech detekovaných synonymních a nesynonymních variant s variantní frekvencí alel (VAF) > 10 %. Prioritní varianty pouze v 54 hodnocených genech byly dále zpracovány. Následně biostatistickým algoritmem ze 142 různých benigních (nebo pravděpodobně benigních) variant ve 41 genech (hlavně 33 variant neznámého významu a 109 nových *missense* variant) byly detekovány nové varianty v genech ATM, BRCA2, ESR1, KDR, PPM1D, SF3B1 a TJP1. Celkově bylo identifikováno 144 různých mutací (4. a 5. třídy) ve 42 z 54 hodnocených genů, z toho se navíc podařilo detekovat 59 nových mutací v 31 genech. Mezi těmito novými mutacemi bylo 16 protein zkracujících mutací v genech ARID1A, ARID2, ATM, CCND2, ESR1, KDR, MET, PDGFRA, PTEN a TJP1, 8 sestříhových

mutací AKT3, ARID2, HNF1B, PPM1D, RB1 a TP53, jedna „*in-frame*“ mutace (ZEB2), jedna „*frameshift*“ mutace, která vedla ke ztrátě terminačního kodonu (PARD3). Dále bylo identifikováno 33 mutací třídy missense 4. a 5. třídy ve 23 genech. Nejvíce zastoupená patogenní missense mutace byla BRAF a NRAS, které se vzájemně vylučují. Mutace genu BRAF byly přítomny v 62/114 (54,4 %) případech, z nichž 57 (91,9 %) mělo mutace v kodonu V600. Mutace NRAS byla detekována v 35/114 (30,7 %) případech a změna kodonu Q61 byla přítomna v 34 (97,1 %) případech. Jiné geny s mutacemi 4. a 5. třídy byly ARID1A, ARID2, ATM, KDR, MAP2K1, MET, PARD3, TP53 (> 5 % případů). Dále pak detekce BRCA2, ESR1, IDH1, NBN, PPP6C, PTEN, SF3B1, TJP1 a ZEB2 u 3–5 % případů. U 12 vzorků, kde nebyla prokázána BRAF nebo NRAS mutace, byly detekovány mutace 4. a 5. třídy v genech ARID1A, ARID2, AKT3, ATM, BRCA2, CCND2, CYP19A1, ESR1, ESR2, F11R, IDH1, KDR, KIT, MAP2K1, MET, MSH6, NBN, PARD3, SF3B1, TJP1, TP53 a ZEB2. U 108 vzorků pacientů (95 %) byla identifikována alespoň jedna varianta mutací 4. a 5. třídy. U tří pacientů byla identifikována dokonce zárodečná, pravděpodobně patogenní mutace. První byla u 32 letého pacienta (pT3) v genu ATM (c. 8228C> T, p. (T2743M)) detekovaná vedle somatické mutace BRAF (V600E) a CDK4 (R24H). Druhá zárodečná mutace byla v genu MLH3 (c.958T> G, p.(C320G)) nalezená společně se somatickými patogenními mutacemi v BRAF p. (G469E) genu a ZEB2 p. (V463A). Tato mutace byla identifikována u 84leté pacientky s melanomem na zádech stadia pT4. Třetí pravděpodobně patogenní mutace byla nalezena u 76letého pacienta (pT2) v genu IDH1 (c.245G> A, p. (R82K)), která se opět nacházela vedle somatických mutací v genu BRAF (V600E), ATM p. (E2014K), ESR2 p. (T299I) a ZEB2 p. (G1068D).

Význam práce byl i v porovnání jednotlivých mutací s klinicko-patologickými nálezy. Mutace ARID2 a méně i PARD3 byla asociována s vyšším věkem v době diagnózy melanomu. Mutace ARID1A byla nalezena spíše u melanomů lokalizovaných na hlavě a končetinách než na trupu. Průměrný počet patogenních a pravděpodobně patogenních mutací na příslušný vzorek byl významně spojen s konkrétními histologickými podtypy studovaných melanomů (SSM a NM). Ve studii byla provedena i analýza klinických dat přežití a recidiv melanomů s výskytem BRAF a NRAS mutací. Z vyšetřeného souboru bylo vyloučeno 9 pacientů, léčených již pro metastazující melanom. Ze zbylých 105 pacientů, 37 pacientů podstoupil adjuvantní terapii interferonem alfa (IFN- α). Statisticky však nebyl pozorován významný rozdíl při

sledování DFS, LFS a MFS v míře přežití mezi BRAF či NRAS mutovanými melanomy a melanomy bez těchto mutací.

Tato práce přináší podrobné mapování genetických alterací u melanomu ve snaze identifikovat nové varianty, které se mohou podílet na patogenezí onemocnění. V době publikace se dle dostupné literatury jednalo o první analýzu stanovující patogenitu detekovaných mutací. Dále byly funkční analýzou identifikovány dvě mutace se ztrátou funkce v genu TP53, které byly dříve klasifikovány jako varianty neznámého významu. Byly detekovány mutované geny kódující proteiny, podílející se na poškození DNA. Nově identifikované významně mutované geny zahrnovaly ATM, KDR, MET, PARD3, SF3B1 a ZEB2, které by mohly mít další klinický význam. Tato práce poukazuje na nové molekuly a genetické alterace, které mohou mít význam nejen v patogenezí melanomu, ale i v budoucím hledání nových molekul pro léčebnou strategii (427).

8.4.2. Komplexní analýza PTEN u primárního kožního melanomu

V práci Němejcová et al. Comprehensive Analysis of PTEN in Primary Cutaneous Melanoma. Folia Biol (Praha). 2020;66(1):7-16. byla provedena komplexní analýza PTEN genu a primárních kožních melanomů.

Význam PTEN genu byl již hojně diskutován v teoretickém úvodu této práce a je zřejmé, že jeho funkce je v biologii melanomu poměrně významná. Vznik mutace PTEN a TP53, lze detekovat v pokročilých melanomech a mohou být spojeny s iniciací vertikálního invazivního růstů (142,143). Navíc ztráta exprese PTEN genu s přítomnou BRAF mutací je dle některých studií spojována s rozvojem mozkových metastáz (165). Poměrně zásadní jsou práce popisující význam ztráty funkce PTEN genu u pacientů léčených BRAF a MEK inhibitory, která je spojena s aberantní aktivací signální dráhy PI3K/AKT/mTOR (298). Gen PTEN je přirozený supresor PI3K kinázy a ztráta PTEN genu vede ke snížené apoptotické odezvě na BRAF inhibitory. Pacienti s BRAF V600E mutovaným melanomem, léčení dabrafenibem a navíc s přítomnou mutací PTEN genu, mají kratší PFS i OS a zvýšené riziko metastatického postižení CNS (299). PTEN gen má význam i při imunoterapii nádorů, kdy byl prokázán vztah mezi ztrátou PTEN genu a up-regulací exprese PD-L1 přes aktivaci signalizace PI3K/AKT/mTOR (334). V případě melanomu byla v nádorovém *in vivo* modelu prokázána ztráta PTEN genu,

kteřá vedla k potlačení infiltrátu TILs a celkové aktivaci T-lymfocytů a nebyla následně pozorována ani výraznější exprese PD-L1 (335).

Tato studie byla založena na imunohistochemické detekci exprese PTEN u 112 pacientů s primárním melanomem, kteří byli rozděleni do 4 kategorií dle TNM klasifikace (pT1 \leq 1 mm, pT2 $>1 - \leq 2$ mm, pT3 $>2 - \leq 4$ mm, a pT4 >4 mm; 7. edice). Pacienti byli dále hodnoceni podle věku (průměr 62 let; 24 – 93 let), pohlaví, anatomické lokalizace, přítomnosti nádorové ulcerace a pozitivity sentinelové uzliny. Samotná imunohistochemická exprese byla hodnocena nezávisle dvěma patologi a byla použita následující kritéria: Cytoplazmatická exprese byla definována jako skupina 0 = negativní (skóre 3+ a 2+ < 10 %), skupina 1 = pozitivní (skóre 3+ and 2+ ≥ 10 %), skupina 2 = pozitivní s negativním klonem. Jaderná exprese byla definována jako: skupina 0 = negativní (< 10 %), skupina 1 = pozitivní (≥ 10 %). Detekce PTEN genu (22q12) byla ověřena metodou fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Tato metoda byla použita u 31 případů s negativní cytoplazmatickou expresí, u 10 s tzv. „clonal-like“ (heterogenní cytoplazmatická exprese) a u jednoho s cytoplazmatickou expresí a detekovanou mutací PTEN genu. Vzhledem ke špatné kvalitě izolované DNA u vzorků starších zejména 10 let se FISH metodu podařilo vyhodnotit pouze u 19 případů. Následně byla provedena i izolace DNA z příslušných tkání a vyšetřena pomocí NGS, izolovaná DNA byla použita i pro analýzu metylace DNA, která byla úspěšně provedena u 71 případů. Získané výsledky byly statisticky zpracovány a porovnány s údaji z klinických sledování k srovnání křivky přežití DFS, LFS a MFS.

Imunohistochemické hodnocení cytoplazmatického barvení odhalilo 20/112 (18 %) případů se ztrátou PTEN a 92/112 (82,1 %) případů s pozitivním nálezem. Heterogenní nálezy „clonal-like“ byly patrné v 11/112 (9,8 %) případech. Hodnocení jaderného barvení odhalilo ztrátu u 83/112 (74 %) a zachovanou expresi v 29/112 (26 %) případech, včetně 24/29 (83 %) případů s pozitivitou u 10–49 % nádorových buněk a 5/29 (17 %) s pozitivitou nad 50 % nádorových buněk. Výsledky ukázaly, že exprese PTEN byla spojena s melanomy nižšího stadia než u stadia pT3 a pT4 a dále s lokalizací na hlavě a horních končetinách ve srovnání s trupem. Statistická analýza ukázala (hraničně signifikantní výsledek) delší DFS u pacientů s pozitivní cytoplazmatickou expresí PTEN ve srovnání s případy se ztrátou cytoplazmatické exprese PTEN. Podobný trend byl pozorován i u jaderné exprese. Pro LFS nebo MFS se nepodařilo prokázat signifikantní nálezy. Analýza FISH odhalila 3/7 (43 %) expresi s klonálním charakterem genu PTEN, včetně dvou případů s odstraněním lokusu pro PTEN gen [del (10)] a jeden případ s

hemizygotní delecí genu PTEN (LOHe, u kterého byla ale patrna imunohistochemická jaderná pozitivita). U delecí (del 10) byla pozorována ztráta cytoplazmatické i jaderné imunohistochemické exprese PTEN genu (2/12; 17 %). Při analýze genové metylace nebyl v žádném ze 71 případů nalezen metylovaný promotor pro PTEN gen. Analýza NGS odhalila 4 varianty PTEN genu (klasifikované jako patogenní nebo jako sestříhové) ve 3/112 (3%) vyšetřovaných melanomů. Pouze v 27 % (30/112) případů se podařilo plně sekvenovat PTEN gen s dostatečným pokrytím ve všech kódovacích exonech (pravděpodobně v důsledku pokročilé fragmentace DNA ve většině analyzovaných vzorků staršího data), což do značné míry limituje tuto práci.

Tato studie ukázala, že ztráta cytoplazmatické exprese PTEN byla významně spojena s vyšším stadiem, lokalizací melanomu na trupu a horším DFS. Pomocí molekulárně genetických metod (FISH a NGS) bylo identifikováno celkem osm případů s aberacemi PTEN genu, ale bez prokázané metylace. I přes omezený počet případů, plně analyzovaných všemi metodami, nebyla shoda mezi imunohistochemií s přítomnou mutací nebo aberací PTEN genu adekvátní. I tak detekce ztráty exprese PTEN genu zjištěné pomocí imunohistochemie mohou být klinicky významné (statistický význam při hodnocení DFS). K ověření těchto výsledků a prohloubení klinicko-patologických korelací je potřeba studie na větším počtu pacientů, kteří například podstoupili i některou z forem cílené terapie či imunoterapie (299).

Obě práce poukazují na význam genetických studií u melanomu, které mohou přispívat ke studiu nádorové heterogenity a genetického zatížení melanomu. Význam těchto studií vyzdvihují práce, které se věnují melanomogenezi a roli genetických alterací a dále publikace studující mechanismy rezistence zejména na cílenou terapii, kde se epigenetické změny také významně uplatňují. Pomocí identifikace nových patogenních mutací přispíváme i k hledání nových molekul, které mohou být odpovědné za vznik nádorových onemocnění, ale i molekul, které by mohly být potenciálním cílem nové léčebné strategie.

8.5. Shrnující přehledové práce

Tyto přehledové práce shrnují dosavadní poznatky věnované především nádorovému mikroprostředí a mezibuněčným interakcím v melanomu. Vedle dosavadních literárních údajů o mikroprostředí melanomu práce komentují i vlastní publikované výsledky. Do odborné literatury přinášejí i nový termín ekologie nádorového mikroprostředí a ekologie nádorů. Tento termín je snahou obsahově shrnout problematiku mezibuněčných interakcí, které se podílejí na utváření unikátního nádorového mikroprostředí „*niche*“. Velká pozornost je věnována IL-6, který hraje v biologii a v nádorovém mikroprostředí melanomu, ale i jiných nádorů, významnou roli. V nedávno publikované práci je i komplexně shrnuta problematika mezibuněčných interakcí, které se podílejí na samotné progresi melanomu.

8.5.1. Mezibuněčné interakce v melanomu

Práce Dvořánková et al. Intercellular crosstalk in human malignant melanoma. *Protoplasma*. 2017 May;254(3):1143-1150. byla věnována poznatkům mezibuněčných interakcí v melanomu s důrazem na souvislosti s vývojem normálních tkání, melanocytů a faktorům embryonálního mikroprostředí.

Melanocyty vývojově pocházejí z neurální lišty a následně při delaminaci z neurální trubice migrují dorzálním směrem podél somitů do vyvíjející se kůže a do oblasti vlasového folikulu, označované jako *bulge*. Vlasový folikul je jedinečný lidský orgán, který podléhá neustále cyklické sebeobnově a vývoji a představuje tak komplexní orgán, vhodný pro studium mezibuněčných interakcí a tkáňové homeostázy. Vedle epitelově-mezenchymových interakcí zde lze pozorovat i interakce epitelových buněk a melanocytů. Obdobné interakce lze pozorovat i při studiu nádorových buněk (397). Po implantaci nádorových melanocytů do oblasti neurální trubice dochází k omezení maligního potenciálu těchto implantovaných buněk a k jejich migraci do míst, odpovídajících derivátům neurální lišty (28). Tyto poznatky potrhují význam vhodného mikroprostředí podporujícího nádorový klon a poukazují na jejich plasticitu (38). Mikroprostředí úzce souvisí s problematikou nádorových kmenových buněk, které mohou být významným faktorem rezistence nádorů na konvenční terapeutika. Právě pro udržení kmenového stavu je nezbytné adekvátní mikroprostředí označované jako „*niche*“. Vedle určitých podobností v embryonálních tkáních, lze spatřovat podobnost nádorového

mikroprostředí i s hojící se ránou, kde lze také pozorovat myofibroblasty, podobně jako v nádorovém stromatu u CAFs (429). Myofibroblasty v hojící se ráně plní kontraktilitu, podílejí se na uzavírání rány. V nádorovém mikroprostředí je patrnější spíše jejich funkce bioaktivní s plnou podporou nádorového klonu produkcí řady bioaktivních molekul včetně růstových faktorů, cytokinů a chemokinů. Podobnost nezralé tkáně, hojící se rány a nádoru zdůrazňují i práce porovnávající efekt neonatálních fibroblastů a CAFs, které vykazují biologicky obdobné vlastnosti (430). CAFs jsou schopny modifikovat jak nádorové buňky, tak i např. diferenciační stupeň (na úrovni exprese keratinů) normálních zdravých keratinocytů (200,393). Podobně tomu tak je i v případě interakcí nádorových melanocytů s keratinocyty, navíc obdobného efektu jsou schopny i buňky neurální lišty, izolované z vlasového folikulu. Za tento efekt jsou odpovědné FGF-2, CXCL-1, IL-8 a VEGF-A produkované nádorovými melanocyty a buňkami neurální lišty (397). Tyto práce podporují význam podobných interakcí, v nádorovém mikroprostředí a např. ve vlasovém folikulu, pro udržení kmenového stavu nádorových buněk či epidermálních kmenových buněk a melanocytů uložených v *bulge* vlasového folikulu. Další význam epitelově-mezenchymových interakcí v melanomu ukazují práce, které studují vliv médií kondiciovaných CAFs a obsahující IL-6 a IL-8 na růst nádorových melanocytů v 3D *in vitro* modelu (398). Zásadní poznatky o úloze CAFs v biologii melanomu přinášejí práce, které ukazují jejich aktivaci u melanomů léčených BRAF inhibitory, která vede ke vzniku (získané) mikroprostředím zprostředkované rezistence (403).

Podobně jako u jiných typů nádorů, i v případě melanomu, mikroprostředí zastoupené keratinocyty, CAFs, TILs a samotnými nádorovými buňkami představuje komplikovanou souhru jednotlivých kompartmentů, kterou lze označit jako nádorový ekosystém. Právě inhibice nádorového mikroprostředí může být jednou z cest, jak zabránit nádorové rezistenci na nová léčebná schémata cílené terapie a imunoterapie.

8.5.2. Ekologie/ekosystém melanomu

Práce Lacina et al. Ecology of melanoma cell. *Histol Histopathol.* 2018 Mar;33(3):247-254, pojednává o nádorovém mikroprostředí melanomu a do nádorové biologie zavádí nový termín ekologie nádorů a nádorový ekosystém.

Nádorové mikroprostředí se podílí na udržování a potencování nádorového klonu, zachování kmenovosti nádorových buněk a podpory nenádorových buněčných populací

i nebuněčných součástí celého ekosystému. Termín ekosystém, který byl v této práci použit, charakterizuje vyvážený stav a vzájemné působení jednotlivých součástí a kompartmentů nádorového mikroprostředí a představuje alternativu pro označení „*niche*“. Samotná práce podrobněji diskutuje obdobnou problematiku jako přechozí přehledová práce, a to vztahy CAFs, nádorových melanocytů a vlivu embryonálního mikroprostředí.

Práce navíc dokumentuje vliv imunitního systému, který se významně podílí na utváření nádorového mikroprostředí melanomu a svým imunosupresivním chováním brání nádorové buňky proti vlastnímu imunitnímu systému. Významný imunomodulační vliv mají jak samotné nádorové buňky, tak i buňky nádorového stromatu. Balsamo a jeho spolupracovníci pospali vliv CAFs z melanomu na inhibici NK buněk (180). Cirkulující mezenchymální kmenové buňky, které jsou považovány za jeden z možných zdrojů CAFs, vykazují také imunomodulační účinky s potlačením imunitní odpovědi, což dokazuje cílenou podporu nádoru a omezení reparativních mechanismů pro organizmus vlastních (431). Imunosupresivní efekt ale mohou podněcovat i buňky imunitního systému. Infiltrace TILs je obecně spojena s lepší terapeutickou odpovědí a prognózou, ale např. vyšší přítomnost Treg lymfocytů je naopak spojena s imunosupresivním účinkem a horší prognózou onemocnění (432). Na aktivaci Treg lymfocytů se mohou podílet i cirkulující mezenchymální kmenové buňky a CAFs, s následným podílem inhibice cytotoxického efektu CD8⁺ T-lymfocytů v nádorovém stromatu (433). Imunomodulační účinek je dokumentován i u TAMs, kde polarizované M₂ makrofágy mají nádor podporující efekt, zejména pomocí produkce řady cytokinů stimulujících nádorový růst. M₁ polarizované makrofágy naopak mají tumor supresivní efekt a podporují protinádorovou imunitní odpověď. Některé uveřejněné práce, které dokumentují přesmyk fenotypu z polarizovaného stavu M₁ do M₂ a tyto makrofágy jsou dále podporovány např. i mezenchymálními buňkami nádorového stromatu (282).

Práce shrnuje zásadní poznatky o nádorovém mikroprostředí melanomu a vzájemné podpoře nádorových melanocytů a buněk nádorového mikroprostředí. Poměrně zásadní roli v tomto mikroprostředí hrají CAFs, které jsou schopny podporovat nádorový klon, ale ovlivňují významně i ostatní buněčné populace nádorového mikroprostředí melanomu, včetně keratinocytů nebo buněk imunitního systému. Termín ekologie melanomu představuje pojem shrnující komplexní vlastnosti nádorového mikroprostředí.

8.5.3. IL-6 a jeho význam v biologii nádorů

Práce Lacina et al. Interleukin-6: a molecule with complex biological impact in cancer. *Histol Histopathol.* 2019 Feb;34(2):125-136. se věnuje komplexní problematice IL-6 v biologii nádorů včetně melanomu.

IL-6 je glykoprotein produkováný celou řadou buněk imunitního systému a buňkami normálních zdravých tkání, jako jsou např. myoblasty či myofibroblasty. Vedle imunitního systému je IL-6 produkováný nádorovými buňkami a buňkami nádorového stromatu (421). Receptor pro IL-6 má na rozdíl od IL-8 (CXCR-1, CXCR-2) pouze jednu variantu, která je exprimována celou řadou buněk jak normálních tkání, tak i buněk účastnících se patologických procesů (434). Četnost zdravotních komplikací a onemocnění bývá často spojena se stárnutím jedince a v řadě těchto pochodů (atrofie kůže, redukce kostní hmoty, kardiovaskulární onemocnění apod.) se uplatňuje i biologická funkce IL-6 (435). Elevace IL-6 byla spojena u starších pacientů s astma bronchiale a respiračními poruchami, dále pak s kardiovaskulárními onemocněními nebo osteoartritidou (436–438). Vysoká hladina IL-6 v séru silně koreluje s funkčními a orgánovými poruchami u starších pacientů, a navíc může predikovat nutnost hospitalizace či dokonce úmrtí (439). Tyto údaje souhrnně ukazují, že elevace IL-6 je součástí komplexu mírného prozánětlivé prostředí, spojeného mimo jiné i se stárnutím, a může obecně ovlivnit funkční stav organismu u starších jedinců.

Při stárnutí lze pozorovat i ztrátu svalové hmoty, která je umocněna u celkové kachexie v terminálním stadiu nádorových onemocnění. I v tomto procesu se ukazuje role IL-6 (a jiných molekul, např. TNF- α , IL-1) jako poměrně významná (440). Důležitou složkou signalizační kaskády IL-6 je STAT3, který ovlivňuje lipolýzu a metabolismus adipocytů, hepatocytů a přispívá k atrofii myofibril (441). Metabolická funkce IL-6 souvisí i s poruchou příjmu potravy jako je anorexie a nechutenství, které jsou jedním z typických projevů terminálních stádií nádorových onemocnění (442). Koncentrace IL-6 je významně zvýšena v séru i v dalších biologických tekutinách u pacientů s nádorovými onemocněními, navíc u některých jeho koncentrace koreluje s klinickým stádiem onemocnění a přežitím (443,444). Exprese IL-6 v dlaždicobuněčných karcinomech hlavy a krku a v kolorektálním karcinomu může být spojena s nižším stupněm diferenciací, a tím i agresivnějším chováním nádorových buněk (222,445). IL-6 významně potencuje proliferaci a migraci buněk karcinomu prostaty, buněk dlaždicobuněčného karcinomu hlavy a krku a melanomu (398,402,446,447). Vedle

nádorových buněk je IL-6 produkován řadou buněk nádorového stromatu jako jsou CAFs a TAMs ^{204,378,429}. Tyto vzájemně se podporující interakce mohou navzájem antagonizovat další současně působící molekuly v nádorovém mikroprostředí. Příkladem tohoto jevu je např. aktivace estrogenového receptoru α v CAFs, která je schopna snížit produkci IL-6 a CCL5, což vede k následnému snížení invazivního růstu nádorových buněk a poukazuje to na určité regulační mechanismy nádorového mikroprostředí (449). Mechanismy vedoucí k rezistenci na BRAF inhibitory zahrnují celou řadu bioaktivních molekul, mezi které patří i IL-6; navíc snížená funkce genu pro IL-6 prostřednictvím miR-98 vede k potlačení metastatického chování melanomu v myším *in vivo* modelu (450). V nádorové biologii je hojně diskutována problematika nádorových kmenových buněk, které jsou rezistentní k protinádorové terapii a jsou významné pro sebeobnovu nádorového klonu včetně jeho progresu a zakládání metastatického postižení. Stimulační účinek IL-6 produkovaný endotelovými buňkami může napomáhat migraci nádorových buněk a může tak dojít ke zvýšení rizika metastatického šíření nádorů (451). Tato pozorování podporují práce popisující zvýšenou hladinu IL-6 spojenou s tendencí k metastatickému postižení kostí (452). Poměrně zásadní může být role IL-6 v překonání mechanismů rezistence na imunoterapii, kde v myším modelu s vyřazením genu pro IL-6, lze pozorovat lepší protinádorovou imunitní odpověď a to i na podávanou imunoterapii (453). Tato práce podporuje další experimentální pozorování synergického efektu blokování IL-6 a anti-PD-1 terapie u melanomu k potencování protinádorového efektu (401). Komplexní role IL-6 dokazují i práce s možným synergickým blokováním IL-6 a TNF- α u autoimunitních onemocnění jako je např. revmatoidní artritida, Crohnova choroba a ulcerózní kolitida (454). Poměrně jednoduchá možnost blokování efektu IL-6 se nabízí při terapii nesteroidními antirevmatiky, které inhibují signalizaci IL-6/STAT3 a narušují signalizaci NF κ B-IL-6 (367,455,456).

Tato přehledová práce poukazuje na komplexní úlohu IL-6 nejenom v nádorových onemocněních, ale i při fyziologických procesech stárnutí, onemocněních vedoucích k poruše příjmu poruchy včetně těžkých stavů podvýživy až kachexie, která je jedním z typických příznaků terminálního stadia nádorových onemocnění, nebo při nespécifických střevních zánětech. Role v nádorové biologii shrnuje poznatky o funkci IL-6, jeho stimulační efekt nádorového růstu, potencování migrační schopnosti a zakládání metastáz, a to nejen u melanomu, ale i u řady dalších nádorových onemocnění. Práce ukazuje i na studie dokládající efekt možného blokování IL-6 při potencionálním využití v léčebné strategii nádorových onemocnění.

8.5.4. Šíření melanomu závisí na vlastnostech maligních buněk a mezibuněčných interakcích v nádorovém mikroprostředí

V práci Kodet et al. Cutaneous melanoma dissemination is dependent on the malignant cell properties and factors of intercellular crosstalk in the cancer microenvironment (Review). Int J Oncol. 2020 Sep;57(3):619-630, jsou shrnuty poznatky věnující se nádorovému mikroprostředí a mechanismům progresu melanomu.

Práce diskutuje problematiku metastatického šíření melanomu, vliv nádorového mikroprostředí při šíření melanomu, vliv migrastatik na inhibici migrace a šíření nádorových buněk. Dále pak jsou diskutovány změny, odrážející se v sérologických nálezech u melanomu, a problematika kachexie jako komplikace terminálního stádia nádorového mikroprostředí.

Metastatické šíření je složitý, vícestupňový a komplexní proces, což již před téměř 200 lety poznamenal chirurg Stephen Paget, který vytvořil hypotézu „semene a půdy (*seed and soil*)“ (153). Melanom může metastazovat do různých orgánů bez zvláštní predilekce, a tak se liší od např. uveálního melanomu podobné histogeneze, který metastazuje typicky do jater (457). U kožního melanomu je nejčastěji detekováno metastatické postižení lymfatických uzlin díky rutinnímu vyšetřování sentinelové uzliny (76). U metastáz lymfatickou cestou může hrát roli i elevace VEGF-C, která se podílí na zvýšené hustotě lymfatických kapilár (156). Pro viscerální metastatické postižení jsou typické metastázy do plic, které mohou být zprostředkovány expresí $\alpha 6\beta 4$ -integrinu u melanomových buněk, který se váže prediktivně na receptor CLCA2 exprimovaný v plicích (158). Pro prognózu pacienta s generalizovaným melanomem je naprosto zásadní rozvoj mozkových metastáz. Některé studie poukazují na význam neurotrofinů a neurotrofinových receptorů, které predikují a usnadňují rozvoj metastatického postižení CNS (162). Pro kožní metastázy může být poměrně zásadní interakce chemokinového receptoru CCR10, který je exprimovaný v melanomových buňkách s jeho ligandem CCL27, který je na druhé straně exprimován v epidermis v normálních keratinocytech (171,458). Pro šíření nádorových buněk cirkulací a zakládání vzdálených metastáz může být zásadní schopnost nádorové plasticity a udržení fenotypu kmenových nádorových buněk, který napomáhá unikat mechanismům imunitního systému. Buňky šířící se z primárního nádoru pronikají do cév, které využívají k hematogenní diseminaci podobně

jako normální zdravé kmenové buňky. Ty jsou schopné migrovat do místa hojení a podílejí se na udržování homeostázy (459).

Melanom a nádorová onemocnění obecně jsou složitým ekosystémem, na kterém se podílejí jak nádorové buňky, tak buňky nádorového stromatu jako jsou CAFs, pericyty, TILs nebo TAMs. Je poměrně zajímavé, že do stromatu melanomu lze řadit i okolní keratinocyty obklopující primární melanom (397). Právě mezibuněčné interakce obou složek tohoto mikroprostředí definují biologické chování nádoru. Adhezivní molekuly jako jsou kadheriny a integriny se podílejí na regulaci invazivního chování melanomových buněk při procesu metastatického šíření. Expresí N-kadherinu v melanomových buňkách pomáhá interagovat s CAFs a ECM a stimuluje invazivní potenciál buněk melanomu a jejich proliferaci. Podílí se i na aktivaci PI3/AKT/mTOR a ERK kinázy. Inhibice N-kadherinu představuje tedy poměrně zajímavou možnost s potenciálním klinickým využitím (460). Bylo prokázáno snížení exprese N-kadherinů, které může být navozeno prostřednictvím keratinocytů s jejich mezibuněčnými kontakty (461). Keratinocyty se podílejí i na inhibici migračních schopností melanomových buněk prostřednictvím exprese desmogleinu-2 u melanomových buněk (462,463). Tato zjištění podporují význam rovnováhy v komunikaci mezi melanomovými buňkami a buňkami nádorového stromatu v mikroprostředí (ekosystému) melanomu. Dalším význam může být i mezi kontakty nádorových buněk s ECM, které jsou zprostředkovány pomocí integrinů. Integriny $\beta 1$ a $\beta 3$ jsou exprimovány při progresi melanomových buněk z radiální růstové fáze na vertikální invazivní šíření (464,465). Kromě toho v buňkách melanomu, které exprimují $\beta 1$ integriny, dochází k podpoře jejich transendoteliální migrace vazbou na adhezivní molekulu VCAM-1 (466). Expresí integrinu $\alpha\beta 3$ zvyšuje elasticitu nádorových melanocytů za adherentních i neadherentních podmínek v *in vitro* modelování, což ukazuje na možné usnadnění migračních schopností a navození pro-metastatického fenotypu (467). Mezibuněčné kontakty a adhezivní molekuly, které se na těchto interakcích podílejí, hrají důležitou roli i v možnostech cílené terapie při inhibici povrchového receptoru Notch, jehož signalizace vede ke zlepšení aktivity ERK inhibitorů u BRAF V600E mutovaných melanomů (463).

Vedle mezibuněčných kontaktů hrají významnou roli v biologii nádorů molekuly uvolňované buňkami nádorového mikroprostředí. Obecně je soubor takto produkovaných molekul označován jako se senescencí asociovaný sekretom. Buňky melanomu exprimují receptory pro CXCL-1 a IL-8 a tyto faktory jsou schopné potencovat i invazivitu melanomu, což podporuje použití antagonistů receptorů CXCR $\frac{1}{2}$ v léčbě. Tito

antagonisté mají dobře zdokumentovaný inhibiční účinek na migraci melanomových buněk (468). Chemokin IL-8 stimuluje vaskularizaci melanomu a jeho vysoká exprese obecně indikuje špatnou prognózu pacientů s melanomem (469). Exprese jiného chemokinu CXCL-16 byla zdokumentována při progresi melanocytárních névů v melanom (470). Aktivace receptoru CXCR-6 rozpoznávajícího chemokin CXCL-16 navozuje navíc kmenové vlastnosti melanomových buněk a iniciuje migraci (471). IL-6 je rozhodujícím faktorem vyvolávajícím imunitní odpověď a má širokou roli v progresi nádorů, včetně melanomu, s možností inhibice počátečního růstu melanomu. Pozdější fáze melanomu jsou spojeny s prokázanou vyšší produkcí IL-6 (472). Role celé řady dalších molekul byla diskutována v předchozích studiích, a především v teoretickém úvodu (VEGF, HGF apod.).

Nově je v práci diskutována role exozomů, které představují další nástroj buněčné komunikace nádorových buněk a buněk nádorového stromatu v nádorovém mikroprostředí. Exozomy stimulují melanomové buňky k EMT, nebo např. ovlivňují vaskularizaci lymfatických uzlin. Exozomy se významně podílejí na regulaci lokální invazivity a také na vstupu buněk melanomu do cílových orgánů při zakládání metastáz (175,473). Tyto účinky mohou souviset s přítomností miRNA v exozomech. Další z funkcí exozomů je poměrně výrazný efekt na imunosupresivní chování mikroprostředí nádorů. Exozomy z melanomu jsou schopny inhibovat IL-2 dependentní proliferaci CD8⁺ T lymfocytů (176). Exozomální miRNA-125b-5p z melanomu indukuje v makrofázích fenotyp podporující růst nádoru, dochází k aktivaci smíšeného fenotypu TAMs na M₁ a M₂ s tendencí podpory pronádorového klonu a s produkcí CCL22, IL-12B, IL-1β, IL-6, i-NOS a TNF-α (174,177). Tyto studie ukazují na význam exozomů a jejich roli v mikroprostředí melanomu. Exozomy představují i zajímavé molekuly pro případné hledání nových léčebných strategií k inhibici jak nádorových buněk, tak funkcí nádorového stromatu.

Jednou z léčebných možností je inhibice migrace a invazivního růstu. Léky obecně interferující s těmito vlastnostmi nádorových buněk označujeme jako „migrastatika“ (474). Tento termín byl zaveden zcela záměrně ve snaze odlišit tato léčiva od konvenčních cytostatik, která na rozdíl od migrastatik ovlivňují neselektivně buněčnou proliferaci. Migrastatika jsou schopna inhibovat lokální invazi nádorových buněk a následnou tvorbu metastáz. Komplexnost těchto léčiv demonstrují i některé práce u melanomu. Migrující buňky melanomu jsou schopny adherovat na kapilárním endotelu, interkalovat mezi endotelovými buňkami a migrovat skrz cévy do okolního parenchymu.

Ani z pohledu endotelových buněk není tento proces pasivní. Endotelové buňky se aktivně podílejí na extravazaci pomocí exprese N-kadherinu (400). Další studovanou molekulou podílející se na extravazaci je CD146, která kooperuje s VEGF-A a může být i zvýšena v séru pacientů s melanomem (475). Endotelové buňky ale samy brání migraci nádorových buněk pomocí exprese VE-kadherinů, které jsou exprimované na povrchu endotelových buněk kapilár (476). Další molekulou, která se podílí na interakci nádorových buněk a endotelu je P-selektin. Expres této molekuly na endotelových buňkách a krevních destičkách se jeví jako předpoklad pro úspěšné šíření metastatické invaze melanomových buněk. Navíc exprese P-selektinu na povrchu endotelových buněk je vyvolána aktivací STAT3 signalizace, která je pro změnu aktivována IL-6, jehož role v biologii melanomu byla již hojně diskutována (477,478). Cílem migrastatik je tedy inhibice nejen nádorových buněk, ale i buněk které napomáhají migraci a invazivnímu šíření, jako jsou endotelové buňky a v předchozích pracích diskutované CAFs nebo TAMs.

Práce shrnuje poznatky s důrazem na potenciální kombinaci migrastatik s jinými tradičně již užívanými léky, jako je imunoterapie či cílená terapie. Jednou z možností je opakovaně diskutovaná role IL-6 a snaha o jeho cílenou blokaci, která by do kombinace s jinými léky mohla přinést vysoce žádoucí synergismus. Je však zřejmé, že inhibice signalizační osy IL-6 není dostatečná, a proto musí být doprovázena současnou blokádou dalších proteinů či jejich receptorů, jako jsou IL-8, VEGF-A a MFGE8 (398,479). Terapeutická blokáda IL-6 v kombinaci s anti-PD-1 představuje zajímavou možnost překonání některých imunologických mechanismů rezistence a je ukázkou již studovaného synergického účinku těchto léčiv. Blokování IL-6 je schopno up-regulovat expresi PD-L1 na melanomových buňkách v myším *in vivo* modelu a může senzibilizovat melanom k imunoterapii *checkpoint* inhibitory (anti-PD-1) (401). Tato zjištění potvrzují komplexní význam IL-6 v biologii melanomu, jeho terapeutický potenciál i nutnost dalšího studia nádorového mikroprostředí melanomu, které se na jeho progresi významně podílí.

8.5.5. Abskopální efekt v současné době imunoterapie melanomu *checkpoint* inhibitory

Práce Kodet O et al. Němejcova K, Strnadová K, Havlínová A, Dundr P, Krajsová I, Štok J, Smetana K Jr, Lacina L. The Abscopal Effect in the Era of Checkpoint Inhibitors. *Int J Mol Sci.* 2021 Jul 4;22(13):7204, je kombinací přehledové práce v kontextu soudobé imunoterapie melanomu a vlastních pozorování unikátního abskopálního efektu.

Abskopální efekt představuje působení určité veličiny mimo místo původního zásahu (z latiny, „ab“ - od „scopus“ – cíl). V korelaci s nádorovou biologii se jedná o možnost likvidace nádorových buněk imunitním systémem i mimo původní cíl terapeutického zásahu (např. radioterapií) (122). Navzdory tomu, že mechanismus abskopálního efektu je v zásadě dobře pochopený, jedná se o děj pozorovaný v klinické praxi poměrně vzácně. V současné době je jeho princip významně akcentován imunoterapeutickými možnostmi nádorů včetně melanomu (480).

Práce popisuje případ pacienta s generalizovaným melanomem, u kterého byl navozen abskopální efekt kryalizací kožních metastáz, které progredovaly po předchozí terapii anti-CTLA-4/ipilimumabem. Při kontrolním vyšetření 2 měsíce po kryalizaci navíc vymizely i jaterní a uzlinové metastázy. Pacient zemřel 13 měsíců po kryalizaci na infarkt myokardu, ale bez známek recidivy onemocnění. Zdokumentovaný případ je doložen i histologickým a imunohistochemickým vyšetřením kožních metastáz odebraných před léčbou ipilimumabem, před kryalizací a po kryalizaci při patrné spontánní regresí. Nález dokumentují chudý infiltrát TILs v kožních metastázách před léčbou, a naopak mohutný nárůst TILs v kožní metastáze po kryalizaci (jednalo se o spontánně regredující metastázu, bez ošetření kryalizací). Terapeutická odpověď byla patrna i v laboratorních vyšetření, kdy došlo k normalizaci hladin S100B proteinu, LDH a CRP v kontrolních vyšetřeních po kryalizaci.

Nedostatečné uvolnění a následná nedostatečná stimulace imunitního systému nádorovými neoantigeny je jedním z faktorů podílejících se na rezistenci nádorů na imunoterapii *checkpoint* inhibitory (326). Abskopální efekt je nejčastěji popisován v souvislosti s použitím radioterapie, kde následná terapeutická odpověď je pozorována i v místech primárně neozařovaných. Poprvé byl popsán v roce 1953, právě po použití radioterapie (481). Radioterapie indukuje buněčnou apoptózu nazývanou imunogenní buněčná smrt (dále jako ICD, anglicky: immunogenic cell death). Tento typ apoptózy je

odpovědný za uvolnění nádorových neoantigenů pro stimulaci APC s možným navozením systémové protinádorové imunitní odpovědi (482). Exprese calreticulinu, která je v buňkách po radioterapii přítomna může být jedním ze signálů pro antigen prezentující buňky, resp. DC, které následně fagocytují poškozené a apoptotické nádorové buňky (483). V ideálním případě dochází pomocí těchto DC k iniciaci specifické protinádorové imunitní odpovědi. Antigeny jsou poté prezentovány CD4⁺ i CD8⁺ T-lymfocytům. Navíc stimulované DC přispívají k cytotoxické imunitní odpovědi aktivací NK buněk (238,239). I v myším melanomovém modelu bylo prokázáno navýšení CD8⁺ T-lymfocytů infiltrujících nádor po lokalizované radioterapii a protinádorový efekt byl následně posílen imunoterapií (484). Tyto práce dokládají schopnost radioterapie posílit protinádorový efekt a následná imunoterapie *checkpoint* inhibitory může navozenou imunitní odpověď ještě více posílit. Bohužel neexistuje jednoznačné schéma, které by bylo možné rutinně aplikovat při terapii melanomu v kombinaci s imunoterapií.

Abskopální efekt byl pozorován i u řady lokálních forem terapie jako je použití elektrovaporizace, nebo intratumorózní aplikace různorodých léčiv (např. vakcína s talimogene laherparepvec, T-VEC). Zejména kombinace imunoterapie anti-PD-1 a lytických virů, jako je T-VEC se ukazuje jako možná cesta k posílení systémové protinádorové imunoterapie (108). Abskopální efekt navozený krytalizací je doposud raritní pozorování, i když jsou doklady o poměrně rychlé infiltraci TILs v nádoru po krytalizaci u myších modelů (485). Tato pozorování dokládají i náš případ, kde byl pozorován výrazný infiltrát CD8⁺, CD45⁺ T-lymfocytů a CD68⁺ makrofágů v kožních metastázách měsíc po samotné krytalizaci. V myším melanomovém modelu byla po kryoterapii prokázána i stimulace sekrece prozánětlivých cytokinů, jako jsou IL-1p, IL-2, IL-6, IL 12p, IFN- α , které se podílí na indukci protinádorové imunitní odpovědi (486).

Mikroprostředí nádoru, včetně maligního melanomu, má určitou podobnost jako hojící se rána a jedná se o dynamický systém, který významně podporuje nádorové buňky (185,487). Kryoterapie tkáň navozuje akutní fázi poranění, která je spojena s aktivací imunitního systému za účelem likvidace termicky poškozených buněk (485). Významně se tak může podílet na modifikaci nádorového mikroprostředí, a navíc může navodit synergický efekt při použití imunoterapie *checkpoint* inhibitory. Tato práce popisuje zcela unikátní pozorování, které je i dle světové literatury raritní.

Tato kapitola shrnuje zásadní výsledky publikované v přehledových pracích, a komentuje studie, které shrnují dosavadní poznatky o biologii melanomu. Cílem těchto

prací je shrnutí dosavadních poznatků, včetně vlastních, o úloze CAFs v nádorovém mikroprostředí melanomu a o komplexní roli IL-6 v nádorech i v dalších patologických procesech. Jedná se tedy o dva stěžejní pilíře, které jsou v naší práci, při experimentálním modelování nádorů studovány. Poslední práce popisuje vlastní pozorování abskopálního efektu v kontextu soudobé imunoterapie melanomu.

9. Závěr a hodnocení

Práce je věnována komplexní problematice melanomu se snahou poukázat na význam nádorového mikroprostředí, kterým se na našem pracovišti dlouhodobě zabýváme jak v oblasti melanomu, tak i u epitelových nádorů kůže a dlaždicobuněčného karcinomu hlavy a krku. V teoretickém úvodu je vedle fyziologie melanocytů diskutována role vývoje melanocytů v korelaci s rozvojem melanomu. V těchto úvodních kapitolách (1.- 5.) je popsána základní charakteristika melanomu a jeho klinických variant, problematika klinické i histopatologické diagnostiky a rizikových faktorů. Přehledně je pojednána i problematika terapie melanomu s rozбором konvenčních metod (chirurgie a radioterapie), ale zároveň je kladen velký důraz na problematiku soudobých léčebných schémat, a to cílené terapie (BRAF a MEK inhibitory) a imunoterapie *checkpoint* inhibitory. Druhá část úvodu je věnována šíření melanomu, metastatickému postižení, vlastnostem a biologickému chování nádorového mikroprostředí. V rámci nádorového mikroprostředí je podrobněji probrána problematika CAFs, TILs a TAMs, které patří mezi významné komponenty stromatu nádorů včetně melanomu. V práci jsou dále popsány hlavní mechanismy rezistence na cílenou terapii včetně vlivu nádorového mikroprostředí. Vznik rezistence je jedním z obtížně překonávaných problémů cílené terapie a mapování těchto mechanismů může podhalit možné cesty další léčby. Vedle rezistence na cílenou terapii je diskutována obdobná problematika u imunoterapie *checkpoint* inhibitory včetně problematiky mikrobiomu u pacientů s melanomem. V poslední části teoretického úvodu je řešena problematika biomarkerů melanomu s novými možnostmi monitorace a účinnější predikce nádorových onemocnění se zaměřením na problematiku melanomu.

Ve druhé části práce jsou diskutovány dosažené výsledky, které jsou rozděleny do čtyř tematických okruhů. V prvním okruhu jsou shrnuty práce věnované nádorovému mikroprostředí melanomu, vlivu CAFs na nádorové melanocyty a jejich migrační schopnost v *in vitro* 3D modelování. Byly definovány konkrétní faktory (IL-6 a IL-8),

kteře se na těchto procesech podílejí a byla prokázána možnost inhibice těchto funkcí nádorového stromatu (402,421). S možnostmi cílené terapie u pacientů s melanomem a vznikem nádorové rezistence je klíčové identifikovat mechanismy nádorových buněk, kterými rezistence na tato léčiva vzniká. Nádorové stroma a CAFs jsou jedním z významných faktorů, které jsou odpovědné za tzv. mikroprostředím zprostředkovanou rezistenci na cílenou terapii BRAF a MEK inhibitory (186). V této kapitole je probírána i možnost studia nádorového mikroprostředí v biologickém xenografním modelu s kuřecí chorioalantoidní membránou, který představuje zajímavý, i když limitující model pro jeho výzkum (488).

Druhý tematický okruh je věnován biomarkerům melanomu a jejich studiu s možným prognostickým výstupem. Práce věnovaná expresi Glut-1, přináší největší doposud publikovaný soubor vyšetřených pacientů s melanomem a benigními pigmentovými névy. Vedle charakterizace exprese Glut-1 v melanomu je, dle těchto výsledků, možné použít vyšetření exprese Glut-1 k odlišení benigních névů a melanomu (489). Další práce je věnovaná morfologickému hodnocení TILs v mikroprostředí melanomu a srovnává pět různých skórovacích systémů používaných pro jejich hodnocení. I když signifikantní význam prokázaly jen některé tyto systémy, je zhodnocení TILs v melanomu klinicky velice přínosné (231). Navíc je tato problematika vysoce aktuální při možnostech terapie melanomu *checkpoint* inhibitory.

Třetí okruh je věnovaný genetické problematice melanomu a genetickým alteracím. Ve stěžejní práci se podařilo prokázat nové patogenní mutace v našem vyšetřovaném souboru pacientů s melanomem. Na rozdíl od podobných prací, věnovaným genetickým alteracím, byl kladem důraz na identifikaci patogenity jednotlivých mutací, a ne jen na čistém mapování jejich výskytu u pacientů s melanomem (490). Ve druhé práci byla studována problematika PTEN genu a stanovení jeho alterací, kde se podařilo poukázat na limity imunohistochemické detekce tohoto genu (491). Problematika studia funkcí a stanovení PTEN genu a jeho alterací je pro melanom významná, protože se jedná o molekulu, která je zapojena do mechanismů rezistence na cílenou terapii. Ztráta funkce PTEN genu se účastní i procesů rezistence na imunoterapii *checkpoint* inhibitory a při samotné progresi melanomu.

V posledním tematickém okruhu jsou popsány přehledové práce, které jsou věnované problematice nádorového mikroprostředí melanomu, vlivu embryonálního mikroprostředí na nádorové melanocyty a biologické funkci CAFs v melanomu (492). Do nádorové biologie se pokouší zavést i nové pojmy “nádorová ekologie“ a “nádorový

ekosystém“, které představují celkové propojení biologických funkcí nádorového klonu s ostatními komponentami nádorového mikroprostředí (185). Významná je i práce diskutující problematiku IL-6 jak v kontextu nádorů, tak i v patologických procesech doprovázejících stárnutí (493). Obsahově nejrozsáhlejší přehledová práce je snahou komplexně zdokumentovat problematiku melanomu a jeho nádorového mikroprostředí, které se významně podílí na biologickém chování nádorových buněk a přispívá k progresi a šíření melanomu (494). V poslední práci je věnována pozornost abскопálnímu efektu v kontextu se soudobou imunoterapií melanomu. Práce je založena na vlastním pozorování tohoto jevu.

Druhá část práce (kapitoly 6. – 8.) podává přehledně soubor publikací, které se věnují aktuální problematice melanomu v širokém kontextu studia nádorového mikroprostředí, biologických markerů melanomu a genetických alterací. V některých případech se podařilo publikovat výsledky založené na poměrně velkém počtu pacientů a vytvořit unikátní soubor zdokumentovaných a vyšetřených pacientů. Vedle těchto prací bylo dále klíčové propojení základního výzkumu při *in vitro* modelování nádorového mikroprostředí a klinického sledování při studiu nádorového mikroprostředí a sérologických biomarkerů. Vytyčené cíle této práce považujeme tedy za splněné a dostatečně dokumentované. Jednotlivé publikační výstupy jsou součástí této publikace formou přílohy.

10.Literatura:

1. Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, Del Barrio MG, et al. The transcription factor Snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol.* 2000; 2(2): 76–83.
2. Uong A, Zon LI. Melanocytes in development and cancer. *J Cell Physiol.* 2010; 222(1): 38–41.
3. Reedy M V, Faraco CD, Erickson CA. The delayed entry of thoracic neural crest cells into the dorsolateral path is a consequence of the late emigration of melanogenic neural crest cells from the neural tube. *Dev Biol.* 1998; 200(2): 234–46.

4. Osawa M, Fisher DE. Notch and melanocytes: Diverse outcomes from a single signal. *J Invest Dermatol.* 2008; 128(11): 2571-2574.
5. Bandarchi B, Jabbari CA, Vedadi A, Navab R. Molecular biology of normal melanocytes and melanoma cells. *J Clin Pathol.* 2013; 66(8): 644–648.
6. Carmona-Fontaine C, Matthews HK, Kuriyama S, Moreno M, Dunn GA, Parsons M, et al. Contact inhibition of locomotion in vivo controls neural crest directional migration. *Nature.* 2008; 456(7224): 957–961.
7. Nishimura EK. Melanocyte stem cells: a melanocyte reservoir in hair follicles for hair and skin pigmentation. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2011; 24(3): 401–410.
8. Mort RL, Jackson IJ, Elizabeth Patton E. The melanocyte lineage in development and disease. *Development.* 2015; 142(4): 620-632.
9. Tobin DJ. Human hair pigmentation - Biological aspects. *Int J Cosmet Sci.* 2008; 30(4): 233-257.
10. Palma S, Boldrini P, Nucci R, Fano RA, Cenacchi G, Martini A. Melanin in human vestibular organs: what do we know now? An ultrastructural study and review of the literature. *Hear Balanc Commun.* 2018; 16(2): 101–107.
11. Buac K, Pavan WJ. Stem cells of the melanocyte lineage. *Int J Cosmet Sci.* 2008; 30(4): 233-257.
12. Gola M, Czajkowski R, Bajek A, Dura A, Drewa T. Melanocyte stem cells: Biology and current aspects. *Med Sci Monit.* 2012; 18(10):155–159.
13. Hearing VJ. Determination of melanin synthetic pathways. *J Invest Dermatol.* 2011; 131(E1): 8-11.
14. Schiaffino MV. Signaling pathways in melanosome biogenesis and pathology. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010; 42(7): 1094-1104.
15. Van Den Bossche K, Naeyaert JM, Lambert J. The quest for the mechanism of melanin transfer. *Traffic.* 2006; 7(7): 769-778.
16. Fitzpatrick TB, Breathnach AS. The epidermal melanin unit system. *Dermatol Wochenschr.* 1963; 147(48): 1–9.
17. Nordlund JJ. The melanocyte and the epidermal melanin unit: an expanded

- concept. *Dermatol Clin.* 2007; 25(3): 271–281.
18. Cichorek M, Wachulska M, Stasiewicz A, Tymińska A. Skin melanocytes: Biology and development. *Postep Dermatologii i Alergol.* 2013; 30(1): 30–41.
 19. Ravaioli GM, Dika E, Lambertini M, Chessa MA, Fanti PA, Patrizi A. Acral melanoma: Correlating the clinical presentation to the mutational status. *G Ital Dermatol Venereol.* 2019;154(5): 567-572.
 20. Damsky WE, Bosenberg M. Melanocytic nevi and melanoma: Unraveling a complex relationship *Oncogene.* 2017; 36(42): 5771-5792.
 21. Colebatch AJ, Ferguson P, Newell F, Kazakoff SH, Witkowski T, Dobrovic A, et al. Molecular Genomic Profiling of Melanocytic Nevi. *J Invest Dermatol.* 2019; 139(8): 1762–1768.
 22. Da Forno PD, Pringle JH, Fletcher A, Bamford M, Su L, Potter L, et al. BRAF, NRAS and HRAS mutations in spitzoid tumours and their possible pathogenetic significance. *Br J Dermatol.* 2009; 161(2): 364–372.
 23. Nemeth K, Szabo S, Cottrell CE, McNulty SM, Segura A, Sokumbi O, et al. Mosaic pathogenic HRAS variant in a patient with nevus spilus with agminated Spitz nevi and parametrial–uterine rhabdomyosarcoma. *Br J Dermatol.* 2018; 178(3): 804-806.
 24. S. Kim Suvarna; Cristopher Layton; John D. Bancroft. *Bancroft’s Theory and Practice of Histological Techniques - Immunohistochemical and immunofluorescent techniques.* Elsevier Books. 2018; 8: 347–390
 25. Gown AM, Vogel AM, Hoak D, Gough F, McNutt MA. Monoclonal Antibodies Specific for Melanocytic Tumors Distinguish Subpopulations of Melanocytes. *Am J Pathol.* 1986; 123(2): 195–203.
 26. Moustakas A, Heldin CH. Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. *Cancer Sci.* 2007; 98(10): 1512-20.
 27. Haviv I, Polyak K, Qiu W, Hu M, Campbell I. Origin of carcinoma associated fibroblasts. *Cell Cycle.* 2009; 8(4): 589-595.

28. Díez-Torre A, Andrade R, Eguizábal C, López E, Arluzea J, Silió M, et al. Reprogramming of melanoma cells by embryonic microenvironments. *Int J Dev Biol.* 2009; 53(8–10): 1563–1568.
29. Kulesa PM, Kasemeier-Kulesa JC, Teddy JM, Margaryan N V., Seftor EA, Seftor REB, et al. Reprogramming metastatic melanoma cells to assume a neural crest cell-like phenotype in an embryonic microenvironment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(10): 3752–3757.
30. Hendrix MJC, Seftor EA, Seftor REB, Kasemeier-Kulesa J, Kulesa PM, Postovit LM. Reprogramming metastatic tumour cells with embryonic microenvironments. *Nat Rev Cancer.* 2007; 7(4): 246-55.
31. Boiko AD, Razorenova O V., Van De Rijn M, Swetter SM, Johnson DL, Ly DP, et al. Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor CD271. *Nature.* 2010; 466(7302):133–7.
32. Filipp F V., Li C, Boiko AD. CD271 is a molecular switch with divergent roles in melanoma and melanocyte development. *Sci Rep.* 2019;9(1): 7696.
33. Shen W, Li Y, Li B, Zheng L, Xie X, Le J, et al. Downregulation of KCTD12 contributes to melanoma stemness by modulating CD271. *Cancer Biol Med.* 2019; 16(3): 498–513.
34. Vidal A, Redmer T. Decoding the role of CD271 in Melanoma. *Cancers (Basel).* 2020; 12(9): 2460.
35. Jäger K, Larribère L, Wu H, Weiss C, Gebhardt C, Utikal J. Expression of neural crest markers GLDC and ERFF1 is correlated with melanoma prognosis. *Cancers (Basel).* 2019 ;11(1): 76.
36. Borrull A, Ghislin S, Deshayes F, Lauriol J, Alcaide-Loridan C, Middendorp S. Nanog and Oct4 overexpression increases motility and transmigration of melanoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2012; 138(7): 1145–1154.
37. Ramgolam K, Lauriol J, Lalou C, Lauden L, Michel L, de la Grange P, et al. Melanoma spheroids grown under neural crest cell conditions are highly plastic migratory/invasive tumor cells endowed with immunomodulator function. *PLoS One.* 2011; 6(4): e18784.

38. Kodet O, Dvořánková B, Krejčí E, Szabo P, Dvořák P, Štork J, et al. Cultivation-dependent plasticity of melanoma phenotype. *Tumor Biol.* 2013; 34(6): 3345–3355.
39. Rao P, Fuller GN, Prieto VG. Expression of SOX-9 in metastatic melanoma—a potential diagnostic pitfall. *Am J Dermatopathol.* 2010; 32(3): 262–266.
40. Muzumdar S, Argraves M, Kristjansson A, Ferenczi K, Dadrás SS. A quantitative comparison between SOX10 and MART-1 immunostaining to detect melanocytic hyperplasia in chronically sun-damaged skin. *J Cutan Pathol.* 2018; 45(4): 263–268.
41. Mu EW, Quatrano NA, Yagerman SE, Ratner D, Meehan SA. Evaluation of MITF, SOX10, MART-1, and R21 immunostaining for the diagnosis of residual melanoma in situ on chronically sun-damaged skin. *Dermatologic Surg.* 2018; 44(7): 933–938.
42. Sinnberg T, Levesque MP, Krochmann J, Cheng PF, Ikenberg K, Meraz-Torres F, et al. Wnt-signaling enhances neural crest migration of melanoma cells and induces an invasive phenotype. *Mol Cancer.* 2018;17(1): 59.
43. Krejčí E, Grim M. Isolation and characterization of neural crest stem cells from adult human hair follicles. *Folia Biol (Praha).* 2010; 56(4): 149–157.
44. Chang CY, Pasolli HA, Giannopoulou EG, Guasch G, Gronostajski RM, Elemento O, et al. NFIB is a governor of epithelial–melanocyte stem cell behaviour in a shared niche. *Nature.* 2013; 495(7439): 98–102.
45. Kodet O, Lacina L, Krejčí E, Dvořánková B, Grim M, Štork J, et al. Melanoma cells influence the differentiation pattern of human epidermal keratinocytes. *Mol Cancer.* 2015;14(1): 1.
46. Gershenwald JE, Scolyer RA, Hess KR, Sondak VK, Long G V., Ross MI, et al. Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin.* 2017; 67(6): 472–492.
47. WHO Classification of Skin Tumours. 4th Edition, Volume 11. 978-92-832-2440-2.

48. Buyyounouski MK, Choyke PL, McKenney JK, Sartor O, Sandler HM, Amin MB, et al. Melanoma Staging: Evidence-Based Changes in the American Joint Committee on Cancer Eighth Edition Cancer Staging Manual. *CA Cancer J Clin.* 2017; 67(3): 245–253.
49. Garbe C, Amaral T, Peris K, Hauschild A, Arenberger P, Bastholt L, et al. European consensus-based interdisciplinary guideline for melanoma. Part 1: Diagnostics – Update 2019. *Eur J Cancer.* 2020; 126: 141–158.
50. Dummer R, Hauschild A, Lindenblatt N, Pentheroudakis G, Keilholz U. Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2015; 26: 126–132.
51. Koshenkov VP, Broucek J, Kaufman HL. Surgical Management of Melanoma. *Cancer Treat Res.* 2016; 167: 149-179.
52. Soura E, Eliades PJ, Shannon K, Stratigos AJ, Tsao H. Hereditary melanoma: Update on syndromes and management Genetics of familial atypical multiple mole melanoma syndrome. *J Am Acad Dermatol.* 2016; 74(3): 411–420.
53. Berwick M, Orlow I, Hummer AJ, Armstrong BK, Krickler A, Marrett LD, et al. The prevalence of CDKN2A germ-line mutations and relative risk for cutaneous malignant melanoma: an international population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006; 15(8): 1520–1525.
54. Soura E, Eliades PJ, Shannon K, Stratigos AJ, Tsao H. Hereditary melanoma: Update on syndromes and management: Emerging melanoma cancer complexes and genetic counseling. *J Am Acad Dermatol.* 2016; 74(3): 411-420.
55. Rocco JW, Sidransky D. p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Exp Cell Res.* 2001; 264(1): 42–55.
56. Aoude LG, Gartside M, Johansson P, Palmer JM, Symmons J, Martin NG, et al. Prevalence of Germline BAP1, CDKN2A, and CDK4 Mutations in an Australian Population-Based Sample of Cutaneous Melanoma Cases. *Twin Res Hum Genet.* 2015; 18(2): 126–33.
57. Ni C, Zhang D, Beyer LA, Halsey KE, Fukui H, Raphael Y, et al. Hearing dysfunction in heterozygous *Mitf*^{Mi-wh/+} mice, a model for Waardenburg

- syndrome type 2 and Tietz syndrome. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2013; 26(1): 78–87.
58. Black JO. Xeroderma Pigmentosum. *Head Neck Pathol.* 2016; 10(2): 139–144.
59. Kraemer KH, Lee MM, Andrews AD, Lambert WC. The Role of Sunlight and DNA Repair in Melanoma and Nonmelanoma Skin Cancer: The Xeroderma Pigmentosum Paradigm. *Arch Dermatol.* 1994; 130(8): 1018–1021.
60. Kinsler VA, O’Hare P, Bulstrode N, Calonje JE, Chong WK, Hargrave D, et al. Melanoma in congenital melanocytic naevi. *Br J Dermatol.* 2017;176(5): 1131-1143.
61. Krenkel S, Hauschild A, Schäfer T. Melanoma risk in congenital melanocytic naevi: A systematic review. *Br J Dermatol.* 2006; 155(1): 1-8.
62. Bauer J, Garbe C, Tsao H, Bevona C, Goggins W, Quinn T. Risk Estimation for Malignant Transformation of Melanocytic Nevi. *Arch Dermatol.* 2004; 140(1): 127
63. Duffy K, Grossman D. The dysplastic nevus: From historical perspective to management in the modern era: Part I. Historical, histologic, and clinical aspects. *J Am Acad Dermatol.* 2012; 67(1): 1-16.
64. Duffy K, Grossman D. The dysplastic nevus: from historical perspective to management in the modern era: part II. Molecular aspects and clinical management. *J Am Acad Dermatol.* 2012; 67(1): 1-12.
65. Holm-Schou ASS, Philipsen PA, Wulf HC. Skin cancer phototype: A new classification directly related to skin cancer and based on responses from 2869 individuals. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2019; 35(2): 116–123.
66. Sample A, He YY. Mechanisms and prevention of UV-induced melanoma. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2018; 34(1): 13-24.
67. Vuong K, McGeechan K, Armstrong BK, AMFS Investigators, GEM Investigators, Cust AE. Occupational sun exposure and risk of melanoma according to anatomical site. *Int J cancer.* 2014; 134(11): 2735–2741.
68. Kodet O, Krajsová I. Maligní melanom, incidence, rizikové faktory a jeho časná

- diagnostika. *Onkologie* 2017; 11(3): 138-143.
69. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Dyba T, Randi G, Bettio M, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *Eur J Cancer*. 2018; 103: 356-387.
 70. Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg*. 1970; 172(5): 902–908.
 71. Garbe C, Amaral T, Peris K, Hauschild A, Arenberger P, Bastholt L, et al. European consensus-based interdisciplinary guideline for melanoma. Part 2: Treatment – Update 2019. *Eur J Cancer*. 2020; 126: 159–177.
 72. Testori A, Rutkowski P, Marsden J, Bastholt L, Chiarion-Sileni V, Hauschild A, Eggermont AM. Surgery and radiotherapy in the treatment of cutaneous melanoma. *Ann Oncol*. 2009; 20(Suppl 6): 22-29.
 73. Tardelli E, Mazzarri S, Rubello D, Gennaro M, Fantechi L, Duce V, Romanini A, Chondrogiannis S, Volterrani D, Colletti PM, Manca G. Sentinel Lymph Node Biopsy in Cutaneous Melanoma: Standard and New Technical Procedures and Clinical Advances. A Systematic Review of the Literature. *Clin Nucl Med*. 2016; 41(12): 498-507.
 74. Morton DL. Overview and update of the phase III Multicenter Selective Lymphadenectomy Trials (MSLT-I and MSLT-II) in melanoma. *Clin Exp Metastasis*. 2012; 29(7): 699-706.
 75. Faries B, Thompson JF, Cochran AJ, Andtbacka RH, Mozzillo N, Zager JS, et al. Completion dissection or observation for sentinel-node metastasis in melanoma. *N Engl J Med*. 2017; 376(23): 2211–2222.
 76. Fioranelli M, Roccia MG, Pastore C, Aracena CJ, Lotti T. Completion dissection or observation for sentinel-node metastasis in melanoma. *Dermatol Ther*. 2017; 30(6): 2211–2222.
 77. Weber JS. Immunotherapy in the adjuvant setting for high-risk melanoma. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2018; 16(8): 546–548.
 78. Kirkwood JM, Strawderman MH, Ernstoff MS, Smith TJ, Borden EC, Blum RH. Interferon alfa-2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma: The

- Eastern Cooperative Oncology Group trial EST 1684. *J Clin Oncol*. 1996; 14(1): 7–17.
79. Ives NJ, Suci S, Eggermont AMM, Kirkwood J, Lorigan P, Markovic SN, et al. Adjuvant interferon- α for the treatment of high-risk melanoma: An individual patient data meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2017; 82: 171-183.
 80. Eggermont AMM, Suci S, Rutkowski P, Kruit WH, Punt CJ, Dummer R, et al. Long term follow up of the EORTC 18952 trial of adjuvant therapy in resected stage IIB-III cutaneous melanoma patients comparing intermediate doses of interferon-alpha-2b (IFN) with observation: Ulceration of primary is key determinant for IFN-sensitivity. *Eur J Cancer*. 2016; 55: 111–121.
 81. Lens M, Ferrucci PF, Testori A. Anti-CTLA4 monoclonal antibody Ipilimumab in the treatment of metastatic melanoma: recent findings. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*. 2008; 3(2): 105–113.
 82. Ribas A, Kirkwood JM, Flaherty KT. Anti-PD-1 antibody treatment for melanoma. *Lancet Oncol*. 2018; 19(5): 219.
 83. Bhandaru M, Rotte A. Monoclonal antibodies for the treatment of melanoma: Present and future strategies. *Methods Mol Biol*. 2019; 1904: 83-108.
 84. Eggermont AMM, Chiarion-Sileni V, Grob JJ, Dummer R, Wolchok JD, Schmidt H, et al. Adjuvant ipilimumab versus placebo after complete resection of stage III melanoma: long-term follow-up results of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer 18071 double-blind phase 3 randomised trial. *Eur J Cancer*. 2019; 119: 1–10.
 85. Weber J, Mandala M, Del Vecchio M, Gogas HJ, Arance AM, Cowey CL, et al. Adjuvant nivolumab versus ipilimumab in resected stage III or IV melanoma. *N Engl J Med*. 2017; 377(19): 1824–1835.
 86. Eggermont AMM, Chiarion-Sileni V, Grob JJ, Dummer R, Wolchok JD, Schmidt H, et al. Adjuvant ipilimumab versus placebo after complete resection of high-risk stage III melanoma (EORTC 18071): A randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2015; 16(5): 522–530.
 87. Haydn JM, Hufnagel A, Grimm J, Maurus K, Scharl M, Meierjohann S. The

- MAPK pathway as an apoptosis enhancer in melanoma. *Oncotarget*. 2014; 5(13): 5040–5053.
88. Maio M, Lewis K, Demidov L, Mandalà M, Bondarenko I, Ascierto PA, et al. Adjuvant vemurafenib in resected, BRAFV600 mutation-positive melanoma (BRIM8): a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2018; 19(4): 510–520.
 89. Long G V., Hauschild A, Santinami M, Atkinson V, Mandal M, Chiarion-Sileni V, et al. Adjuvant dabrafenib plus trametinib in stage III BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med*. 2017; 377(19): 1813–1823.
 90. Schermers B, Franke V, Rozeman EA, van de Wiel BA, Bruining A, Wouters MW, et al. Surgical removal of the index node marked using magnetic seed localization to assess response to neoadjuvant immunotherapy in patients with stage III melanoma. *Br J Surg*. 2019; 106(5): 519–522.
 91. Amaria RN, Menzies AM, Burton EM, Scolyer RA, Tetzlaff MT, Antdbacka R, et al. Neoadjuvant systemic therapy in melanoma: recommendations of the International Neoadjuvant Melanoma Consortium. *Lancet Oncol*. 2019; 20(7): 378-389.
 92. Amaria RN, Reddy SM, Tawbi HA, Davies MA, Ross MI, Glitza IC, et al. Neoadjuvant immune checkpoint blockade in high-risk resectable melanoma. Vol. 24, *Nature Medicine*. *Nat Med*. 2018; 24(11): 1649-1654.
 93. Huang AC, Orlowski RJ, Xu X, Mick R, George SM, Yan PK, et al. A single dose of neoadjuvant PD-1 blockade predicts clinical outcomes in resectable melanoma. *Nat Med*. 2019; 25(3): 454-461.
 94. Rozeman EA, Menzies AM, van Akkooi ACJ, Adhikari C, Bierman C, van de Wiel BA, et al. Identification of the optimal combination dosing schedule of neoadjuvant ipilimumab plus nivolumab in macroscopic stage III melanoma (OpACIN-neo): a multicentre, phase 2, randomised, controlled trial. *Lancet Oncol*. 2019; 20(7): 948–960.
 95. Long G V., Saw RPM, Lo S, Nieweg OE, Shannon KF, Gonzalez M, et al. Neoadjuvant dabrafenib combined with trametinib for resectable, stage IIIB–C, BRAFV600 mutation-positive melanoma (NeoCombi): a single-arm, open-label,

- single-centre, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2019; 20(7): 961–971.
96. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 2010; 363(8): 711–723.
 97. Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O'Day S, Weber J, Garbe C, et al. Ipilimumab plus Dacarbazine for Previously Untreated Metastatic Melanoma. *N Engl J Med.* 2011; 364(26): 2517–2526.
 98. Ascierto PA, Marincola FM, Ribas A. Anti-CTLA4 monoclonal antibodies: The past and the future in clinical application. *J Transl Med.* 2011;13(9): 196.
 99. Robert C, Long G V., Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med.* 2015; 372(4): 320–330.
 100. Ascierto PA, Long G V., Robert C, Brady B, Dutriaux C, Di Giacomo AM, et al. Survival Outcomes in Patients with Previously Untreated BRAF Wild-Type Advanced Melanoma Treated with Nivolumab Therapy: Three-Year Follow-up of a Randomized Phase 3 Trial. *JAMA Oncol.* 2019; 5(2): 187–194.
 101. Robert C, Schachter J, Long G V., Arance A, Grob JJ, Mortier L, et al. Pembrolizumab versus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med.* 2015; 372(26): 2521–2532.
 102. Schachter J, Ribas A, Long G V., Arance A, Grob JJ, Mortier L, et al. Pembrolizumab versus ipilimumab for advanced melanoma: final overall survival results of a multicentre, randomised, open-label phase 3 study (KEYNOTE-006). *Lancet.* 2017; 390(10105): 1853–1862.
 103. Wolchok JD, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Rutkowski P, Grob JJ, Cowey CL, et al. Overall Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med.* 2017; 377(14): 1345–1356.
 104. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Rutkowski P, Lao CD, et al. Five-year survival with combined nivolumab and ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med.* 2019; 381(16): 1535–1546.
 105. Hodi FS, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Rutkowski P, Cowey CL, et al.

- Nivolumab plus ipilimumab or nivolumab alone versus ipilimumab alone in advanced melanoma (CheckMate 067): 4-year outcomes of a multicentre, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2018; 19(11): 1480–1492.
106. Bommareddy PK, Patel A, Hossain S, Kaufman HL. Talimogene Laherparepvec (T-VEC) and Other Oncolytic Viruses for the Treatment of Melanoma. *Am J Clin Dermatol.* 2017; 18(1): 1-15.
 107. LaRocca CJ, Warner SG. Oncolytic viruses and checkpoint inhibitors: combination therapy in clinical trials. *Clin Transl Med.* 2018; 7(1): 35.
 108. Ribas A, Dummer R, Puzanov I, VanderWalde A, Andtbacka RHI, Michielin O, et al. Oncolytic Virotherapy Promotes Intratumoral T Cell Infiltration and Improves Anti-PD-1 Immunotherapy. *Cell.* 2017; 170(6):1109-1119.
 109. Hamid O, Ismail R, Puzanov I. Intratumoral Immunotherapy—Update 2019. *Oncologist.* 2020; 25(3): 423–438.
 110. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, et al. Improved Survival with Vemurafenib in Melanoma with BRAF V600E Mutation. *N Engl J Med.* 2011; 364(26): 2507–2516.
 111. Chapman PB, Robert C, Larkin J, Haanen JB, Ribas A, Hogg D, et al. Vemurafenib in patients with BRAF V600 mutation-positive metastatic melanoma: final overall survival results of the randomized BRIM-3 study. *Ann Oncol.* 2017; 28: 2581–2587.
 112. Hauschild A, Grob JJ, Demidov L V., Jouary T, Gutzmer R, Millward M, et al. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: A multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet.* 2012; 380(9839): 358–365.
 113. Villanueva J, Vultur A, Herlyn M. Resistance to BRAF inhibitors: unraveling mechanisms and future treatment options. *Cancer Res.* 2011; 71(23): 7137–7140.
 114. Kakadia S, Yarlagadda N, Awad R, Kundranda M, Niu J, Naraev B, et al. Mechanisms of resistance to BRAF and MEK inhibitors and clinical update of US Food and Drug Administration-approved targeted therapy in advanced melanoma. *Onco Targets Ther.* 2018; 11: 7095–7107.
 115. Robert C, Grob JJ, Stroyakovskiy D, Karaszewska B, Hauschild A, Levchenko E,

- et al. Five-year outcomes with dabrafenib plus trametinib in metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2019; 381(7): 626–636.
116. Ascierto PA, McArthur GA, Dréno B, Atkinson V, Liskay G, Di Giacomo AM, et al. Cobimetinib combined with vemurafenib in advanced BRAFV600-mutant melanoma (coBRIM): updated efficacy results from a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2016; 17(9): 1248–1260.
117. Dummer R, Ascierto PA, Gogas HJ, Arance A, Mandala M, Liskay G, et al. Overall survival in patients with BRAF-mutant melanoma receiving encorafenib plus binimetinib versus vemurafenib or encorafenib (COLUMBUS): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2018; 19(10): 1315–1327.
118. Long G V., Grob JJ, Nathan P, Ribas A, Robert C, Schadendorf D, et al. Factors predictive of response, disease progression, and overall survival after dabrafenib and trametinib combination treatment: a pooled analysis of individual patient data from randomised trials. *Lancet Oncol*. 2016; 17(12): 1743–1754.
119. Long G V., Lebbe C, Atkinson V, Mandalà M, Nathan PD, Arance Fernandez AM, et al. The anti-PD-1 antibody spartalizumab (S) in combination with dabrafenib (D) and trametinib (T) in previously untreated patients (pts) with advanced BRAF V600-mutant melanoma: Updated efficacy and safety from parts 1 and 2 of COMBI-i. *J Clin Oncol*. 2019; 37(15 suppl): 9531–9531.
120. Nathan P, Dummer R, Long G V, Ascierto PA, Tawbi HA, Robert C, et al. Spartalizumab plus dabrafenib and trametinib (Sparta-DabTram) in patients (pts) with previously untreated BRAF V600-mutant unresectable or metastatic melanoma: Results from the randomized part 3 of the phase III COMBI-i trial. 2020; ESMO Virtual Congress 2020. Abstract LBA43.
121. Tsui JM, Mihalcioiu C, Cury FL. Abscopal Effect in a Stage IV Melanoma Patient who Progressed on Pembrolizumab. *Cureus*. 2018; 10(2): 2238.
122. Grimaldi AM, Simeone E, Giannarelli D, Muto P, Falivene S, Borzillo V, Giugliano FM, Sandomenico F, Petrillo A, Curvietto M, Esposito A, Paone M, Palla M, Palmieri G, Caracò C, Ciliberto G, Mozzillo N, Ascierto PA. Abscopal effects of radiotherapy on advanced melanoma patients who progressed after ipilimumab immunotherapy. *Oncoimmunology*. 2014; 3: 28780.

123. Okuma K, Yamashita H, Niibe Y, Hayakawa K, Nakagawa K. Abscopal effect of radiation on lung metastases of hepatocellular carcinoma: A case report. *J Med Case Rep.* 2011; 5(1): 111.
124. Kan CE, Mansur DB. The role of radiation therapy in the management of cutaneous melanoma. *Melanoma Manag.* 2016; 3(1): 61–72.
125. Glitza Oliva I, Tawbi H, Davies MA. Melanoma Brain Metastases: Current Areas of Investigation and Future Directions. *Cancer J.* 2017; 23(1): 68-74.
126. Lippitz B, Lindquist C, Paddick I, Peterson D, O’Neill K, Beaney R. Stereotactic radiosurgery in the treatment of brain metastases: The current evidence. *Cancer Treat Rev.* 2014; 40(1): 48-59.
127. Nguyen SM, Castrellon A, Vaidis O, Johnson AE. Stereotactic Radiosurgery and Ipilimumab Versus Stereotactic Radiosurgery Alone in Melanoma Brain Metastases. *Cureus.* 2017; 9(7): 1511.
128. Johansson J, Kiffin R, Andersson A, Lindnér P, Naredi PL, Bagge RO, et al. Isolated limb perfusion with melphalan triggers immune activation in melanoma patients. *Front Oncol.* 2018; 8: 570.
129. Verhoef C, Wilt JHW, Grünhagen DJ, Geel AN, Hagen TLM, Eggermont AMM. Isolated limb perfusion with melphalan and TNF- α in the treatment of extremity sarcoma. *Curr Treat Options Oncol.* 2007; 8(6): 417-427
130. van Veenendaal LM, Madu MF, Tesselaar MET, Verhoef C, Grünhagen DJ, van Akkooi ACJ. Efficacy of isolated limb perfusion (ILP) in patients with Merkel cell carcinoma (MCC): A multicenter experience. *Eur J Surg Oncol.* 2017; 43(11): 2157–2162.
131. Tsai KK, Zarzoso I, Daud AI. PD-1 and PD-11 antibodies for melanoma. *Hum Vaccines Immunother.* 2014; 10(11): 3111–3116.
132. Sullivan RJ, Hamid O, Gonzalez R, Infante JR, Patel MR, Hodi FS, et al. Atezolizumab plus cobimetinib and vemurafenib in BRAF-mutated melanoma patients. *Nat Med.* 2019; 25(6): 929-935.
133. Zhang M, Yan Z, Wang J, Yao X. Toll-like receptors 7 and 8 expression correlates with the expression of immune biomarkers and positively predicts the clinical

- outcome of patients with melanoma. *Onco Targets Ther.* 2017; 10: 4339–4346.
134. Klemen ND, Feingold PL, Goff SL, Hughes MS, Kammula US, Yang JC, et al. Metastasectomy Following Immunotherapy with Adoptive Cell Transfer for Patients with Advanced Melanoma. *Ann Surg Oncol.* 2017; 24(1): 135–141.
 135. Lauss M, Donia M, Harbst K, Andersen R, Mitra S, Rosengren F, Salim M, Vallon-Christersson J, Törngren T, Kvist A, Ringnér M, Svane IM, Jönsson G. Mutational and putative neoantigen load predict clinical benefit of adoptive T cell therapy in melanoma. *Nat Commun.* 2017; 8(1): 1738.
 136. Green A, Autier P, Boniol M, Boyle P, Doré JF, Gandini S, et al. The association of use of sunbeds with cutaneous malignant melanoma and other skin cancers: A systematic review. *Int J Cancer.* 2007; 120(5): 1116–1122.
 137. Laga AC, Murphy GF. Cellular heterogeneity in vertical growth phase melanoma. *Arch Pathol Lab Med.* 2010; 134(12): 1750–1757.
 138. Ciarletta P, Foret L, Amar M Ben. The radial growth phase of malignant melanoma: Multi-phase modelling, numerical simulations and linear stability analysis. *J R Soc Interface.* 2011; 8(56): 345–368.
 139. Morais MCC, Stuhl I, Sabino AU, Lautenschlager WW, Queiroga AS, Tortelli TC, et al. *Sci Rep.* 2017; 7(1): 8026.
 140. LeBoit PE. The Morphology of Tumor Progression in Melanoma in Situ. *Dermatol.* 2019; 155(7): 775-776.
 141. Ren M, Kong YY, Shen XX, Cai X, Kong JC. Lentigo maligna and lentigo maligna melanoma: a clinicopathologic analysis of twenty-four cases. *Zhonghua bing li xue za zhi = Chinese J Pathol.* 2018; 47(10): 769–774.
 142. Melanoma: Genetic Abnormalities, Tumor Progression, Clonal Evolution and Tumor Initiating Cells. *Med Sci.* 2017; 5(4): 28.
 143. Shain AH, Yeh I, Kovalyshyn I, Sriharan A, Talevich E, Gagnon A, et al. The genetic evolution of melanoma from precursor lesions. *N Engl J Med.* 2015; 373(20): 1926–1936.
 144. Moreno A, Manrique-Silva E, Virós A, Requena C, Sanmartín O, Traves V, et al.

- Histologic Features Associated with an Invasive Component in Lentigo Maligna Lesions. *JAMA Dermatology*. 2019; 155(7): 782–788.
145. Reed JA, Scott McNutt N, Bogdany JK, Albino AP. Expression of the mast cell growth factor interleukin-3 in melanocytic lesions correlates with an increased number of mast cells in the perilesional stroma: Implications for melanoma progression. *J Cutan Pathol*. 1996; 23(6): 495–505.
 146. Rajabi P, Neshat A, Mokhtari M, Rajabi MA, Eftekhari M, Tavakoli P. The role of VEGF in melanoma progression. *J Res Med Sci*. 2012; 17(6): 534.
 147. Gabay M, Li Y, Felsher DW. MYC activation is a hallmark of cancer initiation and maintenance. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014; 4(6): 014241.
 148. Lin X, Sun R, Zhao X, Zhu D, Zhao X, Gu Q, et al. C-myc overexpression drives melanoma metastasis by promoting vasculogenic mimicry via c-myc/snail/Bax signaling. *J Mol Med*. 2017; 95(1): 53–67.
 149. Singleton KR, Crawford L, Tsui E, Manchester HE, Maertens O, Liu X, et al. Melanoma Therapeutic Strategies that Select against Resistance by Exploiting MYC-Driven Evolutionary Convergence. *Cell Rep*. 2017; 21(10): 2796–2812.
 150. Ott PA, Stephen Hodi F, Buchbinder EI. Inhibition of immune checkpoints and vascular endothelial growth factor as combination therapy for metastatic melanoma: An overview of rationale, preclinical evidence, and initial clinical data. *Front Oncol*. 2015; 5: 202.
 151. Itakura E, Huang RR, Wen DR, Paul E, Wünsch PH, Cochran AJ. IL-10 expression by primary tumor cells correlates with melanoma progression from radial to vertical growth phase and development of metastatic competence. *Mod Pathol*. 2011; 24(6): 801–809.
 152. Van Kilsdonk JWJ, Bergers M, Van Kempen LCLT, Schalkwijk J, Swart GWM. Keratinocytes drive melanoma invasion in a reconstructed skin model. *Melanoma Res*. 2010; 20(5): 372–380.
 153. Paget S. THE DISTRIBUTION OF SECONDARY GROWTHS IN CANCER OF THE BREAST. *Lancet*. 1889; 133(3421): 571–573.
 154. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: The “seed and soil” hypothesis

- revisited. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3: 453–458.
155. Kruper LL, Spitz FR, Czerniecki BJ, Fraker DL, Blackwood-Chirchir A, Ming ME, et al. Predicting sentinel node status in AJCC stage I/II primary cutaneous melanoma. *Cancer*. 2006; 107(10): 2436–2445.
 156. Nathanson SD. Insights into the mechanisms of lymph node metastasis. *Cancer*. 2003; 98(2): 413–423.
 157. Barth A, Wanek LA, Morton DL. Prognostic factors in 1,521 melanoma patients with distant metastases. *J Am Coll Surg*. 1995; 181(3): 193–201.
 158. Abdel-Ghany M, Cheng HC, Elble RC, Pauli BU. The Breast Cancer β 4 Integrin and Endothelial Human CLCA2 Mediate Lung Metastasis. *J Biol Chem*. 2001; 276(27): 25438–2546.
 159. Adler NR, Wolfe R, Kelly JW, Haydon A, McArthur GA, McLean CA, et al. Tumour mutation status and sites of metastasis in patients with cutaneous melanoma. *Br J Cancer*. 2017; 117(7): 1026–1035.
 160. Tawbi HA, Boutros C, Kok D, Robert C, McArthur G. New Era in the Management of Melanoma Brain Metastases. *Am Soc Clin Oncol Educ B*. 2018; 38(38): 741–750.
 161. Brastianos P, Davies MA, Margolin K, Yu HA. Modern Management of Central Nervous System Metastases in the Era of Targeted Therapy and Immune Oncology. *Am Soc Clin Oncol Educ B*. 2019; 39(39): 59–69.
 162. Menter DG, Herrmann JL, Nicolson GL. The role of trophic factors and autocrine/paracrine growth factors in brain metastasis. *Clin Exp Metastasis*. 1995; 13(2): 67–88.
 163. Denkins Y, Reiland J, Roy M, Sinnappah-Kang ND, Galjour J, Murry BP, et al. Brain metastases in melanoma: Roles of neurotrophins. *Neuro Oncol*. 2004; 6(2): 154–165.
 164. Marchetti D, Denkins Y, Reiland J, Greiter-Wilke A, Galjour J, Murry B, et al. Brain-Metastatic Melanoma: A Neurotrophic Perspective. *Pathol Oncol Res*. 2003; 9(3): 147-158.

165. Dankort D, Curley DP, Cartlidge RA, Nelson B, Karnezis AN, Damsky WE, et al. BrafV600E cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. *Nat Genet.* 2009; 41(5): 544–552.
166. Deuker MM, Durban VM, Phillips WA, McMahon M. PI3'-kinase inhibition forestalls the onset of MEK1/2 inhibitor resistance in BRAF-mutated melanoma. *Cancer Discov.* 2015; 5(2): 143–153.
167. Cho JH, Robinson JP, Arave RA, Burnett WJ, Kircher DA, Chen G, et al. AKT1 Activation Promotes Development of Melanoma Metastases. *Cell Rep.* 2015; 13(5): 898–905.
168. Xie TX, Huang FJ, Aldape KD, Kang SH, Liu M, Gershenwald JE, et al. Activation of Stat3 in human melanoma promotes brain metastasis. *Cancer Res.* 2006; 66(6): 3188–3196.
169. Xie TX, Wei D, Liu M, Gao AC, Ali-Osman F, Sawaya R, et al. Stat3 activation regulates the expression of matrix metalloproteinase-2 and tumor invasion and metastasis. *Oncogene.* 2004; 23(20): 3550–3560.
170. Redmer T. Deciphering mechanisms of brain metastasis in melanoma - the gist of the matter. *Mol Cancer.* 2018; 17(1): 106.
171. Martinez-Rodriguez M, Thompson AK, Monteagudo C. High CCL27 immunoreactivity in “supratumoral” epidermis correlates with better prognosis in patients with cutaneous malignant melanoma. *J Clin Pathol.* 2017; 70(1): 15–19.
172. Simonetti O, Goteri G, Lucarini G, Filosa A, Pieramici T, Rubini C, et al. Potential role of CCL27 and CCR10 expression in melanoma progression and immune escape. *Eur J Cancer.* 2006; 42(8): 1181–1187.
173. Ben-Baruch A. Organ selectivity in metastasis: Regulation by chemokines and their receptors. *Clin Exp Metastasis.* 2008; 25(4): 345-356.
174. Bardi GT, Smith MA, Hood JL. Melanoma exosomes promote mixed M1 and M2 macrophage polarization. *Cytokine.* 2018; 105: 63–72.
175. Xiao D, Barry S, Kmetz D, Egger M, Pan J, Rai SN, et al. Melanoma cell-derived exosomes promote epithelial-mesenchymal transition in primary melanocytes through paracrine/autocrine signaling in the tumor microenvironment. *Cancer Lett.*

- 2016; 376(2): 318–327.
176. Clayton A, Mitchell JP, Court J, Mason MD, Tabi Z. Human tumor-derived exosomes selectively impair lymphocyte responses to interleukin-2. *Cancer Res.* 2007; 67(15): 7458–7466.
 177. Gerloff D, Lützkendorf J, Moritz RKC, Wersig T, Mäder K, Müller LP, et al. Melanoma-derived exosomal mir-125b-5p educates tumor associated macrophages (TAMs) by targeting lysosomal acid lipase A (LIPA). *Cancers (Basel).* 2020; 12(2): 464.
 178. Guo D, Lui GYL, Lai SL, Wilmott JS, Tikoo S, Jackett LA, et al. RAB27A promotes melanoma cell invasion and metastasis via regulation of pro-invasive exosomes. *Int J Cancer.* 2019; 144(12): 3070–85.
 179. Su X, Ye J, Hsueh EC, Zhang Y, Hoft DF, Peng G. Tumor Microenvironments Direct the Recruitment and Expansion of Human Th17 Cells. *J Immunol.* 2010; 184(3): 1630–1641.
 180. Balsamo M, Scordamaglia F, Pietra G, Manzini C, Cantoni C, Boitano M, et al. Melanoma-associated fibroblasts modulate NK cell phenotype and antitumor cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci.* 2009; 106(49): 20847–2052.
 181. Gurzu S, Beleaua MA, Jung I. The role of tumor microenvironment in development and progression of malignant melanomas – A systematic review. *Rom J Morphol Embryol.* 2018; 59(1): 23–28.
 182. Němejcová K, Tichá I, Bárta M, Kodet O, Důra M, Jakša R, et al. Comparison of five different scoring methods in the evaluation of inflammatory infiltration (tumor-infiltrating lymphocytes) in superficial spreading and nodular melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2019; 32(3): 412–423.
 183. Giavina-Bianchi MH, Giavina-Bianchi Junior PF, Festa Neto C. Melanoma: Tumor microenvironment and new treatments. *An Bras Dermatol.* 2017; 92(2): 156–166.
 184. Lacina L, Plzak J, Kodet O, Szabo P, Chovanec M, Dvorankova B, et al. Cancer Microenvironment: What Can We Learn from the Stem Cell Niche. *Int J Mol Sci.* 2015; 16(10): 24094-24110.

185. Lacina L, Kodet O, Dvořánková B, Szabo P, Smetana K. Ecology of melanoma cell. *Histol Histopathol.* 2018; 33(3): 247–254.
186. Kodet O, Dvořánková B, Bendlová B, Sýkorová V, Krajsová I, Štork J, et al. Microenvironment-driven resistance to B-Raf inhibition in a melanoma patient is accompanied by broad changes of gene methylation and expression in distal fibroblasts. *Int J Mol Med.* 2018; 41(5): 2687–2703.
187. Kakadia S, Yarlagadda N, Awad R, Kundranda M, Niu J, Naraev B, et al. Mechanisms of resistance to BRAF and MEK inhibitors and clinical update of US Food and Drug Administration-approved targeted therapy in advanced melanoma. *Onco Targets Ther.* 2018; 11: 7095–7107.
188. van Obberghen-Schilling E, Tucker RP, Saupe F, Gasser I, Cseh B, Orend G. Fibronectin and tenascin-C: Accomplices in vascular morphogenesis during development and tumor growth. *Int J Dev Biol.* 2011; 55(4–5): 511–525.
189. Jinka R, Kapoor R, Sistla PG, Raj TA, Pande G. Alterations in cell-extracellular matrix interactions during progression of cancers. *Int J Cell Biol.* 2012; 2012: 219196.
190. Tsukamoto H, Mishima Y, Hayashibe K, Sasase A. α -Smooth muscle actin expression in tumor and stromal cells of benign and malignant human pigment cell tumors. *J Invest Dermatol.* 1992; 98(1): 116–20.
191. Sasaki K, Sugai T, Ishida K, Osakabe M, Amano H, Kimura H, et al. Analysis of cancer-associated fibroblasts and the epithelial-mesenchymal transition in cutaneous basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma, and malignant melanoma. *Hum Pathol.* 2018; 79: 1-8.
192. Gascard P, Tlsty TD. Carcinoma-associated fibroblasts: Orchestrating the composition of malignancy. *Genes Dev.* 2016; 30(9): 1002-1019.
193. Xing F, Saidou J, Watabe K. Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. *Front Biosci.* 2010; 15(1): 166–179.
194. Moinfar F, Man YG, Arnould L, Bratthauer GL, Ratschek M, Tavassoli FA. Cancer Research. *Cancer Res.* 2000; 57(21): 4882–4888.
195. Kurose K, Gilley K, Matsumoto S, Watson PH, Zhou XP, Eng C. Frequent somatic

- mutations in PTEN and TP53 are mutually exclusive in the stroma of breast carcinomas. *Nat Genet.* 2002; 32(3): 355–357.
196. Campbell I, Qiu W, Haviv I. Genetic changes in tumour microenvironments. *J Pathol.* 2011; 223(4): 450–458.
197. Kideryová L, Lacina L, Dvořánková B, Štork J, Čada Z, Szabo P, et al. Phenotypic characterization of human keratinocytes in coculture reveals differential effects of fibroblasts from benign fibrous histiocytoma (dermatofibroma) as compared to cells from its malignant form and to normal fibroblasts. *J Dermatol Sci.* 2009; 55(1): 18–26.
198. Dvořánkové B, Szabo P, Lacina L, Kodet O, Matouškové E, Smetana K. Fibroblasts prepared from different types of malignant tumors stimulate expression of luminal marker keratin 8 in the EM-G3 breast cancer cell line. *Histochem Cell Biol.* 2012; 137(5): 679–685.
199. Kučera J, Dvořánková B, Smetana K, Szabo P, Kodet O. Fibroblasts isolated from the malignant melanoma influence phenotype of normal human keratinocytes. *J Appl Biomed.* 2015; 13(3): 195-198.
200. Lacina L, Dvořánková B, Smetana K, Chovanec M, Plzák J, Tachezy R, et al. Marker profiling of normal keratinocytes identifies the stroma from squamous cell carcinoma of the oral cavity as a modulatory microenvironment in co-culture. *Int J Radiat Biol.* 2007; 83(11–12): 837–848.
201. Fuchs E. Scratching the surface of skin development. *Nature.* 2007;445(7130):834–42.
202. Karagiannis GS, Poutahidis T, Erdman SE, Kirsch R, Riddell RH, Diamandis EP. Cancer-Associated Fibroblasts Drive the Progression of Metastasis through both Paracrine and Mechanical Pressure on Cancer Tissue. *Mol Cancer Res.* 2012; 10(11): 1403–1418.
203. Cirri P, Chiarugi P. Cancer associated fibroblasts: the dark side of the coin. *Am J Cancer Res.* 2011; 1(4): 482–497.
204. Casey TM, Eneman J, Crocker A, White J, Tessitore J, Stanley M, et al. Cancer associated fibroblasts stimulated by transforming growth factor beta1 (TGF-β1)

- increase invasion rate of tumor cells: A population study. *Breast Cancer Res Treat.* 2008; 110(1): 39–49.
205. Dvořánková B, Szabo P, Lacina L, Gal P, Uhrova J, Zima T, et al. Human galectins induce conversion of dermal fibroblasts into myofibroblasts and production of extracellular matrix: Potential application in tissue engineering and wound repair. *Cells Tissues Organs.* 2011; 194(6): 469–480.
206. Valach J, Fík Z, Strnad H, Chovanec M, Plzák J, Čada Z, et al. Smooth muscle actin-expressing stromal fibroblasts in head and neck squamous cell carcinoma: Increased expression of galectin-1 and induction of poor prognosis factors. *Int J Cancer.* 2012; 131(11): 2499–2508.
207. Dvořánková B, Smetana K, Říhová B, Kučera J, Mateu R, Szabo P. Cancer-associated fibroblasts are not formed from cancer cells by epithelial-to-mesenchymal transition in nu/nu mice. *Histochem Cell Biol.* 2015; 143(5): 463–469.
208. Yoichi T, Nagashima T, Yagata H, Yoshida K, Suzuki M, Fujimori T, et al. Breast cancer with cartilaginous and/or osseous metaplasia. *Breast Cancer.* 2009; 16(3): 234–237.
209. Tsukuda K, Tsuji H, Kunitomo T, Aokage K, Miyake T, Nakahara S, Masuda H. Breast cancer with cartilaginous and/or osseous metaplasia diagnosed by lymph nodal metastasis: a case report. *Acta Med Okayama.* 2009; 63(6): 367-371.
210. Ninomiya J, Oyama T, Horiguchi J, Koibuchi Y, Yoshida T, Lijima K, et al. Two case of breast cancer with cartilaginous and osseous metaplasia. *Breast Cancer.* 2005; 12(1): 52–56.
211. Xu L, Li G. Circulating mesenchymal stem cells and their clinical implications. *J Orthopaedic Tran.on.* 2014; 2(1): 1–7.
212. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, Bell GW, et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature.* 2007; 449(7162): 557–563.
213. Mishra PJ, Mishra PJ, Humeniuk R, Medina DJ, Alexe G, Mesirov JP, et al. Carcinoma-associated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem

- cells. *Cancer Res.* 2008; 68(11): 4331–4339.
214. Guo Y, Zhang X, Zeng W, Zhang J, Cai L, Wu Z, et al. TRAF6 activates fibroblasts to cancer-associated fibroblasts (CAFs) through FGF19 in tumor microenvironment to benefit the malignant phenotype of melanoma cells. *J Invest Dermatol.* 2020; 140(11): 2268-2279.
215. Zhou L, Yang K, Wickett RR, Kadekaro AL, Zhang Y. Targeted deactivation of cancer-associated fibroblasts by β -catenin ablation suppresses melanoma growth. *Tumour Biol.* 2016; 37(10): 14235–14248.
216. Liu T, Zhou L, Yang K, Iwasawa K, Kadekaro AL, Takebe T, et al. The β -catenin/YAP signaling axis is a key regulator of melanoma-associated fibroblasts. *Signal Transduct Target Ther.* 2019; 4: 63.
217. Fedorenko I V., Abel E V., Koomen JM, Fang B, Wood ER, Chen YA, et al. Fibronectin induction abrogates the BRAF inhibitor response of BRAF V600E/PTEN-null melanoma cells. *Oncogene.* 2016; 35(10): 1225–1235.
218. Fedorenko I V, Wargo JA, Flaherty KT, Messina JL, Smalley SM, Moffitt T, et al. Therapeutic Escape. 2016; 135(12): 3115–3124.
219. Fedorenko I V., Wargo JA, Flaherty KT, Messina JL, Smalley KSM. BRAF inhibition generates a host-tumor niche that mediates therapeutic escape. *J Invest Dermatol.* 2015; 135(12): 3115–3124.
220. Straussman R, Morikawa T, Shee K, Barzily-Rokni M, Qian ZR, Du J, et al. Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. *Nature.* 2012; 487(7408): 500–504.
221. Zhou L, Yang K, Dunaway S, Abdel-Malek Z, Andl T, Kadekaro AL, et al. Suppression of MAPK signaling in BRAF-activated PTEN-deficient melanoma by blocking β -catenin signaling in cancer-associated fibroblasts. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2018; 31(2): 297–307.
222. Kolář M, Szabo P, Dvořánková B, Lacina L, Gabius HJ, Strnad H, et al. Upregulation of IL-6, IL-8 and CXCL-1 production in dermal fibroblasts by normal/malignant epithelial cells in vitro: Immunohistochemical and transcriptomic analyses. *Biol Cell.* 2012; 104(12): 738–751.

223. Ziani L, Safta-Saadoun T Ben, Gourbeix J, Cavalcanti A, Robert C, Favre G, et al. Melanoma-associated fibroblasts decrease tumor cell susceptibility to NK cell-mediated killing through matrix-metalloproteinases secretion. *Oncotarget*. 2017; 8(12): 19780–19794.
224. Herbst RS, Baas P, Kim DW, Felip E, Pérez-Gracia JL, Han JY, et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): A randomised controlled trial. *Lancet*. 2016; 387(10027): 1540–1550.
225. Yu J, Wang X, Teng F, Kong L. PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes. *Onco Targets Ther*. 2016; 9: 5023-5039.
226. Sunshine JC, Nguyen PL, Kaunitz GJ, Cottrell TR, Berry S, Esandrio J, et al. PD-L1 expression in melanoma: A quantitative immunohistochemical antibody comparison. *Clin Cancer Res*. 2017; 23(16): 4938–4944.
227. Li Z, Zhou J, Zhang J, Li S, Wang H, Du J. Cancer-associated fibroblasts promote PD-L1 expression in mice cancer cells via secreting CXCL5. *Int J Cancer*. 2019; 145(7): 1946–1957.
228. Ohshio Y, Teramoto K, Hanaoka J, Tezuka N, Itoh Y, Asai T, et al. Cancer-associated fibroblast-targeted strategy enhances antitumor immune responses in dendritic cell-based vaccine. *Cancer Sci*. 2015; 106(2):134–142.
229. Hendry S, Salgado R, Gevaert T, Russell PA, John T, Thapa B, et al. Assessing Tumor-infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method from the International Immunooncology Biomarkers Working Group: Part 1: Assessing the Host Immune Response, TILs in Invasive Breast Carcinoma and Ductal Carcinoma in Situ, Metastatic Tumor Deposits and Areas for Further Research. *Adv Anat Pathol*. 2017; 24(5): 235-251.
230. Hendry S, Salgado R, Gevaert T, Russell PA, John T, Thapa B, et al. Assessing Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method from the International Immuno-Oncology Biomarkers Working Group: Part 2: TILs in Melanoma, Gastrointestinal Tract Carcinomas, Non-Small Cell Lung Carcinoma and

- Mesothelioma, Endometrial and Ovarian Carcinomas, Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck, Genitourinary Carcinomas, and Primary Brain Tumors. *Adv Anat Pathol.* 2017; 24(6): 311-335.
231. Němejcová K, Tichá I, Bártů M, Kodet O, Důra M, Jakša R, et al. Comparison of five different scoring methods in the evaluation of inflammatory infiltration (tumor-infiltrating lymphocytes) in superficial spreading and nodular melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2019; 32(3): 412–423.
232. Clark WH, Elder DE, Guerry D, Braitman LE, Trock BJ, Schultz D, et al. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst.* 1989; 81(24): 1893–1904.
233. Azimi F, Scolyer RA, Rumcheva P, Moncrieff M, Murali R, McCarthy SW, et al. Tumor-infiltrating lymphocyte grade is an independent predictor of sentinel lymph node status and survival in patients with cutaneous melanoma. *J Clin Oncol.* 2012; 30(21): 2678–2683.
234. Saldanha G, Flatman K, Teo KW, Bamford M. A Novel Numerical Scoring System for Melanoma Tumor-infiltrating Lymphocytes Has Better Prognostic Value Than Standard Scoring. *Am J Surg Pathol.* 2017; 41(7): 906–914.
235. Park CK, Kim SK. Clinicopathological significance of intratumoral and peritumoral lymphocytes and lymphocyte score based on the histologic subtypes of cutaneous melanoma. *Oncotarget.* 2017; 8(9): 14759–14769.
236. Olbryt M, Rajczykowski M, Widłak W. Biological factors behind melanoma response to immune checkpoint inhibitors. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(11): 4071.
237. Wargo JA, Reddy SM, Reuben A, Sharma P. Monitoring immune responses in the tumor microenvironment. *Curr Opin Immunol.* 2016; 41: 23-31.
238. Mukherji B. Immunology of melanoma. *Clin Dermatol.* 2013; 31(2): 156–165.
239. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med.* 2012; 366(10): 883–892.
240. Tel J, Anguille S, Waterborg CEJ, Smits EL, Figdor CG, de Vries IJM. Tumoricidal activity of human dendritic cells. *Trends Immunol.* 2014; 35(1): 38-

- 46.
241. Vitale M, Cantoni C, Pietra G, Mingari MC, Moretta L. Effect of tumor cells and tumor microenvironment on NK-cell function. *Eur J Immunol*. 2014; 44(6): 1582-1592.
242. Boddupalli CS, Bar N, Kadaveru K, Krauthammer M, Pornputtpong N, Mai Z, et al. Interlesional diversity of T cell receptors in melanoma with immune checkpoints enriched in tissue-resident memory T cells. *JCI Insight*. 2016; 1(21): 88955.
243. Pedoeem A, Azoulay-Alfaguter I, Strazza M, Silverman GJ, Mor A. Programmed death-1 pathway in cancer and autoimmunity. *Clin Immunol*. 2014; 153(1): 145-152.
244. Zang X, Allison JP. The B7 family and cancer therapy: Costimulation and coinhibition [Internet]. Vol. 13, *Clinical Cancer Research*. 2007; 13(18): 5271-5279.
245. Costabile M, Bassal NK, Gerber JP, Hughes BP. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase activity by fatty acids and prostaglandins: A structure function analysis. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids*. 2017; 122: 7–15.
246. Lee N, Zakka LR, Mihm MC, Schatton T. Tumour-infiltrating lymphocytes in melanoma prognosis and cancer immunotherapy. *Pathology*. 2016; 48(2): 177–187.
247. Muenst S, Läubli H, Soysal SD, Zippelius A, Tzankov A, Hoeller S. The immune system and cancer evasion strategies: Therapeutic concepts. *J Intern Med*. 2016; 279(6): 541-562
248. Karachaliou N, Gonzalez-Cao M, Crespo G, Drozdowskyj A, Aldeguer E, Gimenez-Capitan A, et al. Interferon gamma, an important marker of response to immune checkpoint blockade in non-small cell lung cancer and melanoma patients. *Ther Adv Med Oncol*. 2018; 10: 1758834017749748.
249. Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. T cells in tumor microenvironment. *Tumour Biol*. 2016; 37(1): 39-45.
250. Hung K, Hayashi R, Lafond-Walker A, Lowenstein C, Pardoll D, Levitsky H. The

- central role of CD4⁺ T cells in the antitumor immune response. *J Exp Med*. 1998; 188(12): 2357–2368.
251. Bailey SR, Nelson MH, Himes RA, Li Z, Mehrotra S, Paulos CM. Th17 cells in cancer: The ultimate identity crisis. *Front Immunol*. 2014; 5: 276.
 252. Linck RDM, Costa RL de P, Garicochea B. Cancer immunology and melanoma immunotherapy. *An Bras Dermatol*. 2017; 92(6): 830–835.
 253. Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol*. 2014 Apr;27:1-7.
 254. Mourmouras V, Biagioli M, Miracco C, Luzi P, Tosi P, Cosci E, et al. Utility of tumour-infiltrating CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cell evaluation in predicting local recurrence in vertical growth phase cutaneous melanoma. *Oncol Rep*. 2007; 18(5): 1115–1122.
 255. Gambichler T, Bindsteiner M, Höxtermann S, Terras S, Kreuter A. Circulating CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} regulatory T cells are an independent predictor of advanced melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2013; 26(2): 280-283.
 256. Ma MW, Medicherla RC, Qian M, De Miera EVS, Friedman EB, Berman RS, et al. Immune response in melanoma: An in-depth analysis of the primary tumor and corresponding sentinel lymph node. *Mod Pathol*. 2012; 25(7): 1000–1010.
 257. Gooden MJM, De Bock GH, Leffers N, Daemen T, Nijman HW. The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: A systematic review with meta-analysis. *Br J Cancer*. 2011; 105(1): 93–103.
 258. Twyman-Saint Victor C, Rech AJ, Maity A, Rengan R, Pauken KE, Stelekati E, et al. Radiation and dual checkpoint blockade activate non-redundant immune mechanisms in cancer. *Nature*. 2015; 520(7547): 373–377.
 259. Ladányi A. Prognostic and predictive significance of immune cells infiltrating cutaneous melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2015; 28(5): 490–500.
 260. Ladányi A, Kiss J, Mohos A, Somlai B, Liskay G, Gilde K, et al. Prognostic impact of B-cell density in cutaneous melanoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2011; 60(12): 1729–1738.

261. Bosisio FM, Wilmott JS, Volders N, Mercier M, Wouters J, Stas M, et al. Plasma cells in primary melanoma. Prognostic significance and possible role of IgA. *Mod Pathol.* 2016; 29(4): 347–358.
262. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases-elimination, equilibrium and escape. *Curr Opin Immunol.* 2014; 27: 16-25.
263. Koebel CM, Vermi W, Swann JB, Zerafa N, Rodig SJ, Old LJ, et al. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature.* 2007; 450(7171): 903–907.
264. Fujimura T, Kakizaki A, Furudate S, Kambayashi Y, Aiba S. Tumor-associated macrophages in skin: How to treat their heterogeneity and plasticity. *J Dermatol Sci.* 2016; 83(3): 167-173.
265. Otsuka A, Yanagi T, Poggi A, Policlinico O, Martino S, Alfaro C, et al. Tumor-Associated Macrophages: Therapeutic Targets for Skin Cancer. 2018; 8: 1-3.
266. Falleni M, Savi F, Tosi D, Agape E, Cerri A, Moneghini L, et al. M1 and M2 macrophages' clinicopathological significance in cutaneous melanoma. *Melanoma Res.* 2017; 27(3): 200–210.
267. Storr SJ, Safuan S, Mitra A, Elliott F, Walker C, Vasko MJ, et al. Objective assessment of blood and lymphatic vessel invasion and association with macrophage infiltration in cutaneous melanoma. *Mod Pathol.* 2012; 25(4): 493–504.
268. Qian Y, Qiao S, Dai Y, Xu G, Dai B, Lu L, et al. Molecular-Targeted Immunotherapeutic Strategy for Melanoma via Dual-Targeting Nanoparticles Delivering Small Interfering RNA to Tumor-Associated Macrophages. *ACS Nano.* 2017; 11(9): 9536–9549.
269. Kakizaki A, Fujimura T, Furudate S, Kambayashi Y, Yamauchi T, Yagita H, et al. Immunomodulatory effect of peritumorally administered interferon-beta on melanoma through tumor-associated macrophages. *Oncoimmunology.* 2015; 4(11): 1047584
270. Fujimura T, Kambayashi Y, Furudate S, Kakizaki A, Hidaka T, Asano M, et al.

- Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL)/RANK signaling promotes cancer-related inflammation through M2 macrophages. *Exp Dermatol.* 2016; 25(5): 397-399.
271. Fujimura T, Kakizaki A, Kambayashi Y, Sato Y, Tanita K, Lyu C, et al. Cytotoxic antimelanoma drugs suppress the activation of M2 macrophages. *Exp Dermatol.* 2018; 27(1): 64–70.
272. Furudate S, Fujimura T, Kambayashi Y, Kakizaki A, Hidaka T, Aiba S. Immunomodulatory effect of imiquimod through ccl22 produced by tumor-associated macrophages in B16F10 melanomas. *Anticancer Res.* 2017; 37(7): 3461–3471.
273. Lok E, Chung AS, Swanson KD, Wong ET. Melanoma brain metastasis globally reconfigures chemokine and cytokine profiles in patient cerebrospinal fluid. *Melanoma Res.* 2014; 24(2): 120–130.
274. Fujimura T, Ring S, Umansky V, Mahnke K, Enk AH. Regulatory T cells stimulate B7-H1 expression in myeloid-derived suppressor cells in ret melanomas. *J Invest Dermatol.* 2012; 132(4):1239–1246.
275. Getts DR, Turley DM, Smith CE, Harp CT, McCarthy D, Feeney EM, et al. Tolerance Induced by Apoptotic Antigen-Coupled Leukocytes Is Induced by PD-L1 + and IL-10–Producing Splenic Macrophages and Maintained by T Regulatory Cells . *J Immunol.* 2011; 187(5): 2405–2417.
276. Pico de Coaña Y, Poschke I, Gentilcore G, Mao Y, Nyström M, Hansson J, et al. Ipilimumab treatment results in an early decrease in the frequency of circulating granulocytic myeloid-derived suppressor cells as well as their Arginase1 production. *Cancer Immunol Res.* 2013; 1(3): 158–162.
277. Hu-Lieskovan S, Mok S, Homet Moreno B, Tsoi J, Robert L, Goedert L, et al. Improved antitumor activity of immunotherapy with BRAF and MEK inhibitors in BRAFV600E melanoma. *Sci Transl Med.* 2015; 7(279): 279.
278. Gordon SR, Maute RL, Dulken BW, Hutter G, George BM, McCracken MN, et al. PD-1 expression by tumour-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumour immunity. *Nature.* 2017; 545(7655):495-499.

279. Vilain RE, Menzies AM, Wilmott JS, Kakavand H, Madore J, Guminski A, et al. Dynamic changes in PD-L1 expression and immune infiltrates early during treatment predict response to PD-1 blockade in Melanoma. *Clin Cancer Res.* 2017; 23(17): 5024–5033.
280. Linde N, Lederle W, Depner S, Van Rooijen N, Gutschalk CM, Mueller MM. Vascular endothelial growth factor-induced skin carcinogenesis depends on recruitment and alternative activation of macrophages. *J Pathol.* 2012; 227(1): 17–28.
281. Zhu X, Yang J, Gao Y, Wu C, Yi L, Li G, et al. The dual effects of a novel peptibody on angiogenesis inhibition and M2 macrophage polarization on sarcoma. *Cancer Lett.* 2018; 416: 1–10.
282. Yamada K, Uchiyama A, Uehara A, Perera B, Ogino S, Yokoyama Y, et al. MFG-E8 drives melanoma growth by stimulating mesenchymal stromal cell-induced angiogenesis and M2 polarization of tumor-associated macrophages. *Cancer Res.* 2016; 76(14): 4283–4292.
283. Kale S, Raja R, Thorat D, Soundararajan G, Patil T V., Kundu GC. Osteopontin signaling upregulates cyclooxygenase-2 expression in tumor-associated macrophages leading to enhanced angiogenesis and melanoma growth via $\alpha 9\beta 1$ integrin. *Oncogene.* 2014; 33(18): 2295–2306.
284. Lyons YA, Pradeep S, Wu SY, Haemmerle M, Hansen JM, Wagner MJ, et al. Macrophage depletion through colony stimulating factor 1 receptor pathway blockade overcomes adaptive resistance to anti-VEGF therapy. *Oncotarget.* 2017; 8(57): 96496–96505.
285. Kumar V, Donthireddy L, Marvel D, Condamine T, Wang F, Lavilla-Alonso S, et al. Cancer-Associated Fibroblasts Neutralize the Anti-tumor Effect of CSF1 Receptor Blockade by Inducing PMN-MDSC Infiltration of Tumors. *Cancer Cell.* 2017; 32(5): 654–668.
286. Amaral T, Sinnberg T, Meier F, Krepler C, Levesque M, Niessner H, et al. The mitogen-activated protein kinase pathway in melanoma part I - Activation and primary resistance mechanisms to BRAF inhibition. *Eur J Cancer.* 2017; 73: 85–92.

287. Hauschild A, Grob J-J, Demidov L V, Jouary T, Gutzmer R, Millward M, et al. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet (London, England)*. 2012; 380(9839): 358–365.
288. Kakadia S, Yarlagadda N, Awad R, Kundranda M, Niu J, Naraev B, et al. Mechanisms of resistance to BRAF and MEK inhibitors and clinical update of us food and drug administration-approved targeted therapy in advanced melanoma. *Onco Targets Ther*. 2018; 11: 7095-7107.
289. Wagle N, Emery C, Berger MF, Davis MJ, Sawyer A, Pochanard P, et al. Dissecting therapeutic resistance to RAF inhibition in melanoma by tumor genomic profiling. *J Clin Oncol*. 2011; 29(22): 3085–3096.
290. Easty DJ, Gray SG, O’Byrne KJ, O’Donnell D, Bennett DC. Receptor tyrosine kinases and their activation in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 201; 24(3): 446-461.
291. Prahallad A, Sun C, Huang S, Di Nicolantonio F, Salazar R, Zecchin D, et al. Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. *Nature*. 2012; 483(7387): 100–104.
292. Sun C, Wang L, Huang S, Heynen GJJE, Prahallad A, Robert C, et al. Reversible and adaptive resistance to BRAF(V600E) inhibition in melanoma. *Nature*. 2014; 508(7494): 118–122.
293. Koelblinger P, Lang R. New developments in the treatment of basal cell carcinoma: Update on current and emerging treatment options with a focus on vismodegib. *Onco Targets Ther*. 2018; 11: 8327-8340.
294. Sabbatino F, Wang Y, Wang X, Flaherty KT, Yu L, Pepin D, et al. PDGFR α up-regulation mediated by sonic hedgehog pathway activation leads to BRAF inhibitor resistance in melanoma cells with BRAF mutation. *Oncotarget*. 2014; 5(7): 1926–1941.
295. Warszawik-Hendzel O, Słowińska M, Olszewska M, Rudnicka L. Melanoma of the oral cavity: Pathogenesis, dermoscopy, clinical features, Staging and management. *J Dermatol Case Rep*. 2014; 8(3): 60–66.

296. Jalili A, Mertz KD, Romanov J, Wagner C, Kalthoff F, Stuetz A, et al. NVP-LDE225, a potent and selective SMOOTHENED antagonist reduces melanoma growth in vitro and in vivo. *PLoS One*. 2013; 8(7): 69064.
297. Werzowa J, Koehrer S, Strommer S, Cejka D, Fuereder T, Zebedin E, et al. Vertical inhibition of the mTORC1/mTORC2/PI3K pathway shows synergistic effects against melanoma in vitro and in vivo. *J Invest Dermatol*. 2011;1 31(2): 495–503.
298. Lito P, Rosen N, Solit DB. Tumor adaptation and resistance to RAF inhibitors. *Nat Med*. 2013; 19(11): 1401-1409.
299. Bucheit AD, Chen G, Siroy A, Tetzlaff M, Broaddus R, Milton D, et al. Complete loss of PTEN protein expression correlates with shorter time to brain metastasis and survival in stage IIIB/C melanoma patients with BRAFV600 mutations. *Clin Cancer Res*. 2014; 20(21): 5527–5536.
300. Wellbrock C, Marais R. Elevated expression of MITF counteracts B-RAF-stimulated melanocyte and melanoma cell proliferation. *J Cell Biol*. 2005; 170(5): 703–708.
301. Huber WE, Price ER, Widlund HR, Du J, Davis IJ, Wegner M, et al. A tissue-restricted cAMP transcriptional response: SOX10 modulates alpha-melanocyte-stimulating hormone-triggered expression of microphthalmia-associated transcription factor in melanocytes. *J Biol Chem*. 2003; 278(46): 45224–45230.
302. Atefi M, von Euw E, Attar N, Ng C, Chu C, Guo D, et al. Reversing melanoma cross-resistance to BRAF and MEK inhibitors by co-targeting the AKT/mTOR pathway. *PLoS One*. 2011; 6(12): 28973.
303. Kwong LN, Costello JC, Liu H, Jiang S, Helms TL, Langsdorf AE, et al. Oncogenic NRAS signaling differentially regulates survival and proliferation in melanoma. *Nat Med*. 2012; 18(10): 1503–1510.
304. Dummer R, Schadendorf D, Ascierto PA, Arance A, Dutriaux C, Di Giacomo AM, et al. Binimetinib versus dacarbazine in patients with advanced NRAS-mutant melanoma (NEMO): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2017; 18(4): 435–445.
305. Gastonguay A, Berg T, Hauser AD, Schuld N, Lorimer E, Williams CL. The role

- of Rac1 in the regulation of NF- κ B activity, cell proliferation, and cell migration in non-small cell lung carcinoma. *Cancer Biol Ther.* 2012; 13(8): 647–656.
306. Krauthammer M, Kong Y, Ha BH, Evans P, Bacchiocchi A, McCusker JP, et al. Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nat Genet.* 2012; 44(9): 1006–1014.
307. Nathanson KL, Martin A-M, Wubbenhorst B, Greshock J, Letrero R, D'Andrea K, et al. Tumor genetic analyses of patients with metastatic melanoma treated with the BRAF inhibitor dabrafenib (GSK2118436). *Clin Cancer Res.* 2013; 19(17): 4868–4878.
308. Wilmott JS, Long G V, Howle JR, Haydu LE, Sharma RN, Thompson JF, et al. Selective BRAF inhibitors induce marked T-cell infiltration into human metastatic melanoma. *Clin Cancer Res.* 2012; 18(5): 1386–1394.
309. Li Z, Jiang K, Zhu X, Lin G, Song F, Zhao Y, et al. Encorafenib (LGX818), a potent BRAF inhibitor, induces senescence accompanied by autophagy in BRAFV600E melanoma cells. *Cancer Lett.* 2016; 370(2): 332–344.
310. Shaverdashvili K, Wong P, Ma J, Zhang K, Osman I, Bedogni B. MT1-MMP modulates melanoma cell dissemination and metastasis through activation of MMP2 and RAC1. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014; 27(2): 287–296.
311. Ohanna M, Giuliano S, Bonet C, Imbert V, Hofman V, Zangari J, et al. Senescent cells develop a PARP-1 and nuclear factor- κ B-associated secretome (PNAS). *Genes Dev.* 2011; 25(12): 1245–1261.
312. Obenauf AC, Zou Y, Ji AL, Vanharanta S, Shu W, Shi H, et al. Therapy-induced tumour secretomes promote resistance and tumour progression. *Nature.* 2015; 520(7547): 368–372.
313. Ebert PJR, Cheung J, Yang Y, McNamara E, Hong R, Moskalenko M, et al. MAP Kinase Inhibition Promotes T Cell and Anti-tumor Activity in Combination with PD-L1 Checkpoint Blockade. *Immunity.* 2016; 44(3): 609–621.
314. Russo I, Miotto S, Saponeri A, Alaibac M. Ultra-low dose rituximab for refractory pemphigus vulgaris: a pilot study. *Expert Opin Biol Ther.* 2020; 20(6): 673-678.
315. Steinberg SM, Zhang P, Malik BT, Boni A, Shabaneh TB, Byrne KT, et al. BRAF

- inhibition alleviates immune suppression in murine autochthonous melanoma. *Cancer Immunol Res.* 2014; 2(11): 1044–1050.
316. Frederick DT, Piris A, Cogdill AP, Cooper ZA, Lezcano C, Ferrone CR, et al. BRAF inhibition is associated with enhanced melanoma antigen expression and a more favorable tumor microenvironment in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res.* 2013; 19(5): 1225–1231.
317. Wilmott JS, Haydu LE, Menzies AM, Lum T, Hyman J, Thompson JF, et al. Dynamics of chemokine, cytokine, and growth factor serum levels in BRAF-mutant melanoma patients during BRAF inhibitor treatment. *J Immunol.* 2014; 192(5): 2505–2513.
318. Cooper ZA, Reuben A, Spencer CN, Prieto PA, Austin-Breneman JL, Jiang H, et al. Distinct clinical patterns and immune infiltrates are observed at time of progression on targeted therapy versus immune checkpoint blockade for melanoma. *Oncoimmunology.* 2016 Feb 2;5(3):e1136044.
319. Pieper N, Zaremba A, Leonardelli S, Harbers FN, Schwamborn M, Lübcke S, et al. Evolution of melanoma cross-resistance to CD8+ T cells and MAPK inhibition in the course of BRAFi treatment. *Oncoimmunology.* 2018; 7(8): 1450127.
320. Jiang X, Zhou J, Giobbie-Hurder A, Wargo J, Hodi FS. The activation of MAPK in melanoma cells resistant to BRAF inhibition promotes PD-L1 expression that is reversible by MEK and PI3K inhibition. *Clin Cancer Res.* 2013; 19(3): 598–609.
321. Frelaut M, du Rusquec P, de Moura A, Le Tourneau C, Borcoman E. Pseudoprogression and Hyperprogression as New Forms of Response to Immunotherapy. *BioDrugs.* 2020; 34(4): 463-476.
322. Gide TN, Wilmott JS, Scolyer RA, Long G V. Primary and acquired resistance to immune checkpoint inhibitors in metastatic melanoma. *Clin Cancer Res.* 2018 Mar 15;24(6):1260-1270.
323. Ayers M, Lunceford J, Nebozhyn M, Murphy E, Loboda A, Kaufman DR, et al. IFN- γ -related mRNA profile predicts clinical response to PD-1 blockade. *J Clin Invest.* 2017; 127(8): 2930–2940.
324. Hugo W, Zaretsky JM, Sun L, Song C, Moreno BH, Hu-Lieskovan S, et al.

- Genomic and Transcriptomic Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma. *Cell*. 2016; 165(1): 35–44.
325. Snyder A, Makarov V, Merghoub T, Yuan J, Zaretsky JM, Desrichard A, et al. Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma. *N Engl J Med*. 2014; 371(23): 2189–2199.
326. Jiang T, Shi T, Zhang H, Hu J, Song Y, Wei J, et al. Tumor neoantigens: From basic research to clinical applications. *J Hematol Oncol*. 2019; 12(1): 93.
327. Jäger E, Ringhoffer M, Altmannsberger M, Arand M, Karbach J, Jäger D, et al. Immunoselection in vivo: Independent loss of MHC class I and melanocyte differentiation antigen expression in metastatic melanoma. *Int J Cancer*. 1997; 71(2): 142–147.
328. McGranahan N, Furness AJS, Rosenthal R, Ramskov S, Lyngaa R, Saini SK, et al. Clonal neoantigens elicit T cell immunoreactivity and sensitivity to immune checkpoint blockade. *Science*. 2016; 351(6280): 1463–9.
329. Gros A, Parkhurst MR, Tran E, Pasetto A, Robbins PF, Ilyas S, et al. Prospective identification of neoantigen-specific lymphocytes in the peripheral blood of melanoma patients. *Nat Med*. 2016; 22(4): 433–438.
330. Nowicki TS, Hu-Lieskovan S, Ribas A. Mechanisms of Resistance to PD-1 and PD-L1 Blockade. *Cancer J*. 2018; 24(1): 47-53.
331. Long G V, Larkin J, Ascierto PA, Hodi FS, Rutkowski P, Sileni V, et al. melanoma and other skin tumours 1112PD PD-L1 expression as a biomarker for nivolumab (NIVO) plus ipilimumab (IPI) and NIVO alone in advanced melanoma (MEL): A pooled analysis. *Ann Oncol*. 2016; 27: 379–400.
332. Carlino M, Ribas A, Gonzalez R, Hoeller C, Bar-Sela G, Barrow C, et al. Abstract CT004: KEYNOTE-006: PD-L1 expression and efficacy in patients (Pts) treated with pembrolizumab (pembro) vs ipilimumab (IPI) for advanced melanoma. In American Association for Cancer Research (AACR); 2016.
333. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med*. 2015; 373(1): 23–34.

334. Parsa AT, Waldron JS, Panner A, Crane CA, Parney IF, Barry JJ, et al. Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma. *Nat Med.* 2007; 13(1): 84–88.
335. Peng W, Qing Chen J, Liu C, Malu S, Creasy C, Tetzlaff MT, et al. Loss of PTEN promotes resistance to T cell-mediated immunotherapy Analysis and interpretation of data (statistical analysis and bioinformatic analysis): HHS Public Access. *Cancer Discov.* 2016; 6(2): 202–216.
336. Ni K, O’Neill H. The role of dendritic cells in T cell activation. *Immunol Cell Biol.* 1997; 75(3): 223–230.
337. Wu W, Wang W, Wang Y, Li W, Yu G, Li Z, et al. IL-37b suppresses T cell priming by modulating dendritic cell maturation and cytokine production via dampening ERK/NF- κ B/S6K signalings. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2015; 47(8): 597–603.
338. Lindenberg JJ, van de Ven R, Lougheed SM, Zomer A, Santegoets SJ, Griffioen AW, et al. Functional characterization of a STAT3-dependent dendritic cell-derived CD14 + cell population arising upon IL-10-driven maturation . *Oncoimmunology.* 2013; 2(4): 23837.
339. Emeagi PU, Maenhout S, Dang N, Heirman C, Thielemans K, Breckpot K. Downregulation of Stat3 in melanoma: Reprogramming the immune microenvironment as an anticancer therapeutic strategy. *Gene Ther.* 2013; 20(11): 1085–1092.
340. Hong M, Puaux AL, Huang C, Loumagne L, Tow C, Mackay C, et al. Chemotherapy induces intratumoral expression of chemokines in cutaneous melanoma, favoring T-cell infiltration and tumor control. *Cancer Res.* 2011; 71(22): 6997–7009.
341. Harlin H, Meng Y, Peterson AC, Zha Y, Tretiakova M, Slingluff C, et al. Chemokine expression in melanoma metastases associated with CD8 + T-Cell recruitment. *Cancer Res.* 2009; 69(7): 3077–3085.
342. Yue C, Shen S, Deng J, Priceman SJ, Li W, Huang A, et al. STAT3 in CD8+ T cells inhibits their tumor accumulation by downregulating CXCR3/CXCL10 axis. *Cancer Immunol Res.* 2015; 3(8): 864–870.

343. Kučera J, Strnadová K, Dvořánková B, Lacina L, Krajsová I, Štork J, et al. Serum proteomic analysis of melanoma patients with immunohistochemical profiling of primary melanomas and cultured cells: Pilot study. *Oncol Rep.* 2019; 42(5): 1793–1804.
344. Bouzin C, Brouet A, De Vriese J, DeWever J, Feron O. Effects of Vascular Endothelial Growth Factor on the Lymphocyte-Endothelium Interactions: Identification of Caveolin-1 and Nitric Oxide as Control Points of Endothelial Cell Energy. *J Immunol.* 2007; 178(3): 1505–1511.
345. Huang H, Langenkamp E, Georganaki M, Loskog A, Fuchs PF, Dieterich LC, et al. VEGF suppresses T-lymphocyte infiltration in the tumor microenvironment through inhibition of NF- κ B-induced endothelial activation. *FASEB J.* 2015; 29(1): 227–238.
346. Chen PL, Roh W, Reuben A, Cooper ZA, Spencer CN, Prieto PA, et al. Analysis of immune signatures in longitudinal tumor samples yields insight into biomarkers of response and mechanisms of resistance to immune checkpoint blockade. *Cancer Discov.* 2016; 6(8): 827–837.
347. Restifo NP, Smyth MJ, Snyder A. Acquired resistance to immunotherapy and future challenges. *Nat Rev Cancer.* 2016; 16(2): 121-126. .
348. Restifo NP, Marincola FM, Kawakami Y, Taubenberger J, Yannelli JR, Rosenberg SA. Loss of functional beta2-microglobulin in metastatic melanomas from five patients receiving immunotherapy. *J Natl Cancer Inst.* 1996; 88(2): 100–108.
349. Del Campo AB, Kyte JA, Carretero J, Zinchenko S, Méndez R, González-Aseguinolaza G, et al. Immune escape of cancer cells with beta2-microglobulin loss over the course of metastatic melanoma. *Int J Cancer.* 2014; 134(1): 102–113.
350. Zaretsky JM, Garcia-Diaz A, Shin DS, Escuin-Ordinas H, Hugo W, Hu-Lieskovan S, et al. Mutations associated with acquired resistance to PD-1 blockade in melanoma. *N Engl J Med.* 2016; 375(9): 819–829.
351. Jin W. Role of JAK/STAT3 Signaling in the Regulation of Metastasis, the Transition of Cancer Stem Cells, and Chemoresistance of Cancer by Epithelial–Mesenchymal Transition. *Cells.* 2020; 9(1): 217.

352. Kim TK, Herbst RS, Chen L. Defining and Understanding Adaptive Resistance in Cancer Immunotherapy. *Trends Immunol.* 2018; 39(8): 624-631.
353. Koyama S, Akbay EA, Li YY, Herter-Sprue GS, Buczkowski KA, Richards WG, et al. Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune checkpoints. *Nat Commun.* 2016; 7: 10501.
354. Taube JM, Young GD, McMiller TL, Chen S, Salas JT, Pritchard TS, et al. Differential expression of immune-regulatory genes associated with PD-L1 display in melanoma: Implications for PD-1 pathway blockade. *Clin Cancer Res.* 2015; 21(17): 3969–3976.
355. Ralli M, Botticelli A, Visconti IC, Angeletti D, Fiore M, Marchetti P, et al. Immunotherapy in the Treatment of Metastatic Melanoma: Current Knowledge and Future Directions. *J Immunol Res.* 2020; 2020: 9235638.
356. Kitano S, Nakayama T, Yamashita M. Biomarkers for Immune Checkpoint Inhibitors in Melanoma. *Front Oncol.* 2018; 8: 1–8.
357. Vétizou M, Pitt JM, Daillère R, Lepage P, Waldschmitt N, Flament C, et al. Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science.* 2015; 350(6264): 1079–1084.
358. Sivan A, Corrales L, Hubert N, Williams JB, Aquino-Michaels K, Earley ZM, et al. Commensal *Bifidobacterium* promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science.* 2015; 350(6264): 1084–1089.
359. Shaikh FY, Gills JJ, Sears CL. Impact of the microbiome on checkpoint inhibitor treatment in patients with non-small cell lung cancer and melanoma. *EBioMedicine.* 2019; 48: 642-647.
360. McQuade JL, Ologun GO, Arora R, Wargo JA. Gut Microbiome Modulation Via Fecal Microbiota Transplant to Augment Immunotherapy in Patients with Melanoma or Other Cancers. *Curr Oncol Rep.* 2020; 22(7): 74.
361. Yang M, Wang Y, Yuan M, Tao M, Kong C, Li H, et al. Antibiotic administration shortly before or after immunotherapy initiation is correlated with poor prognosis in solid cancer patients: An up-to-date systematic review and meta-analysis. *Int Immunopharmacol.* 2020; 88: 106876.

362. Gopalakrishnan V, Spencer CN, Nezi L, Reuben A, Andrews MC, Karpinets T V., et al. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science*. 2018; 359(6371): 97–103.
363. Chaput N, Lepage P, Coutzac C, Soularue E, Le Roux K, Monot C, et al. Baseline gut microbiota predicts clinical response and colitis in metastatic melanoma patients treated with ipilimumab. *Ann Oncol*. 2017; 28(6): 1368–1379.
364. Matson V, Fessler J, Bao R, Chongsuwat T, Zha Y, Alegre ML, et al. The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients. *Science* (80-). 2018; 359(6371): 104–108.
365. Tanoue T, Morita S, Plichta DR, Skelly AN, Suda W, Sugiura Y, et al. A defined commensal consortium elicits CD8 T cells and anti-cancer immunity. *Nature*. 2019; 565(7741): 600–605.
366. Hegazy AN, West NR, Stubbington MJT, Wendt E, Suijker KIM, Datsi A, et al. Circulating and Tissue-Resident CD4+ T Cells With Reactivity to Intestinal Microbiota Are Abundant in Healthy Individuals and Function Is Altered During Inflammation. *Gastroenterology*. 2017; 153(5): 1320-1337.
367. Frankel AE, Coughlin LA, Kim J, Froehlich TW, Xie Y, Frenkel EP, et al. Metagenomic Shotgun Sequencing and Unbiased Metabolomic Profiling Identify Specific Human Gut Microbiota and Metabolites Associated with Immune Checkpoint Therapy Efficacy in Melanoma Patients. *Neoplasia (United States)*. 2017; 19(10): 848–855.
368. Brooks JD. Translational genomics: The challenge of developing cancer biomarkers. *Genome Res*. 2012; 22(2): 183-187
369. Verykiou S, Ellis R, Lovat P. Established and Emerging Biomarkers in Cutaneous Malignant Melanoma. *Healthcare*. 2014; 2(1): 60–73.
370. Hauschild A, Engel G, Brenner W, Gläser R, Mönig H, Henze E, et al. Predictive value of serum S100B for monitoring patients with metastatic melanoma during chemotherapy and/or immunotherapy. *Br J Dermatol*. 1999; 140(6): 1065–1071.
371. Wagner NB, Forschner A, Leiter U, Garbe C, Eigentler TK. S100B and LDH as early prognostic markers for response and overall survival in melanoma patients

- treated with anti-PD-1 or combined anti-PD-1 plus anti-CTLA-4 antibodies. *Br J Cancer*. 2018; 119(3): 339–346.
372. Krajsová I, Arenberger P, Lakomý R, Kubala E, Bezinová I, Poprach A, et al. Long-term survival with ipilimumab: Experience from a national expanded access program for patients with melanoma. *Anticancer Res*. 2015; 35(11): 6303–6310.
373. Bosserhoff AK, Moser M, Hein R, Landthaler M, Buettner R. In situ expression patterns of melanoma-inhibiting activity (MIA) in melanomas and breast cancers. *J Pathol*. 1999; 187(4): 446–454.
374. Riechers A, Bosserhoff AK. Melanoma inhibitory activity in melanoma diagnostics and therapy - a small protein is looming large. *Exp Dermatol*. 2014; 23(1): 12–14.
375. Ene Nicolae CD, Nicolae I. Interleukin 8 serum concentration, but not lactate dehydrogenase activity, positively correlates to CD34 antigen in melanoma tumors. *J Immunoass Immunochem*. 2016; 37(5): 463–471.
376. Ugurel S, Rapp G, Tilgen W, Reinhold U. Increased serum concentration of angiogenic factors in malignant melanoma patients correlates with tumor progression and survival. *J Clin Oncol*. 2001; 19(2): 577–583.
377. Friedman EB, Shang S, de Miera E V., Fog JU, Teilum MW, Ma MW, et al. Serum microRNAs as biomarkers for recurrence in melanoma. *J Transl Med*. 2012; 10: 155.
378. Zhang Q, Wang Y, Liang J, Tian Y, Zhang Y, Tao K. Bioinformatics analysis to identify the critical genes, microRNAs and long noncoding RNAs in melanoma. 2017; 96(29): 7497.
379. Mumford SL, Towler BP, Pashler AL, Gilleard O, Martin Y, Newbury SF. Circulating microRNA biomarkers in melanoma: Tools and challenges in personalised medicine. *Biomolecules*. 2018; 8(2): 21.
380. Stark MS, Klein K, Weide B, Haydu LE, Pflugfelder A, Tang YH, et al. The Prognostic and Predictive Value of Melanoma-related MicroRNAs Using Tissue and Serum: A MicroRNA Expression Analysis. *EBioMedicine*. 2015; 2(7): 671–680.

381. Nezos A, Lembessis P, Sourla A, Pissimissis N, Gogas H, Koutsilieris M. Molecular markers detecting circulating melanoma cells by reverse transcription polymerase chain reaction: Methodological pitfalls and clinical relevance. *Clin Chem Lab Med*. 2009; 47(1): 1-11.
382. Forschner A, Weißgraeber S, Hadaschik D, Schulze M, Kopp M, Kelkenberg S, et al. Circulating tumor DNA correlates with outcome in metastatic melanoma treated by braf and mek inhibitors – results of a prospective biomarker study. *Onco Targets Ther*. 2020; 13: 5017–5032.
383. Herbreteau G, Vallée A, Knol AC, Théoleyre S, Quéreux G, Frénard C, et al. Circulating tumour DNA is an independent prognostic biomarker for survival in metastatic BRAF or NRAS-mutated melanoma patients. *Cancers (Basel)*. 2020; 12(7): 1–13.
384. Khoja L, Lorigan P, Zhou C, Lancashire M, Booth J, Cummings J, et al. Biomarker utility of circulating tumor cells in metastatic cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol*. 2013; 133(6): 1582–1590.
385. Forget P, Khalifa C, Defour JP, Latinne D, Van Pel MC, De Kock M. What is the normal value of the neutrophil-to-lymphocyte ratio? *BMC Res Notes*. 2017; 10(1): 1–4.
386. Ferrucci PF, Gandini S, Battaglia A, Alfieri S, Di Giacomo AM, Giannarelli D, et al. Baseline neutrophil-to-lymphocyte ratio is associated with outcome of ipilimumab-treated metastatic melanoma patients. *Br J Cancer*. 2015; 112(12): 1904–1910.
387. Capone M, Giannarelli D, Mallardo D, Madonna G, Festino L, Grimaldi AM, et al. Baseline neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) and derived NLR could predict overall survival in patients with advanced melanoma treated with nivolumab. *J Immunother Cancer*. 2018; 6(1): 74.
388. Teterycz P, Jagodzińska-Mucha P, Cybulska-Stopa B, Mariuk-Jarema A, Kozak K, Koseła-Paterczyk H, et al. High baseline neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts worse outcome in patients with metastatic BRAF-positive melanoma treated with BRAF and MEK inhibitors. *Melanoma Res*. 2018; 28(5): 435–441.
389. Mangana J, Cheng PF, Schindler K, Weide B, Held U, Frauchiger AL, et al.

- Analysis of BRAF and NRAS mutation status in advanced melanoma patients treated with anti-CTLA-4 antibodies: Association with overall survival? *PLoS One*. 2015; 10(10): 0139438.
390. Jessurun CAC, Vos JAM, Limpens J, Luiten RM. Biomarkers for response of melanoma patients to immune checkpoint inhibitors: A systematic review. *Front Oncol*. 2017; 7: 233.
391. Hayward NK, Wilmott JS, Waddell N, Johansson PA, Field MA, Nones K, et al. Whole-genome landscapes of major melanoma subtypes. *Nature*. 2017; 545(7653): 175–180.
392. Madore J, Strbenac D, Vilain R, Menzies AM, Yang JYH, Thompson JF, et al. PD-L1 Negative Status is Associated with Lower Mutation Burden, Differential Expression of Immune-Related Genes, and Worse Survival in Stage III Melanoma. *Clin Cancer Res*. 2016; 22(15): 3915–3923.
393. Lacina L, Smetana K, Dvořánková B, Pytlík R, Kideryová L, Kučerová L, et al. Stromal fibroblasts from basal cell carcinoma affect phenotype of normal keratinocytes. *Br J Dermatol*. 2007; 156(5): 819–829.
394. Desgarnier MCD, Fournier F, Droit A, Rochette PJ. Influence of a pre-stimulation with chronic low-dose UVB on stress response mechanisms in human skin fibroblasts. *PLoS One*. 2017; 12(3): 0173740.
395. Pittayapruek P, Meephansan J, Prapapan O, Komine M, Ohtsuki M. Role of matrix metalloproteinases in Photoaging and photocarcinogenesis. *Int J Mol Sci*. 2016; 17(6): 868.
396. Brennan M, Bhatti H, Nerusu KC, Bhagavathula N, Kang S, Fisher GJ, et al. Matrix Metalloproteinase-1 is the Major Collagenolytic Enzyme Responsible for Collagen Damage in UV-irradiated Human Skin[¶]. *Photochem Photobiol*. 2003; 78(1): 43.
397. Kodet O, Lacina L, Krejčí E, Dvořánková B, Grim M, Štork J, et al. Melanoma cells influence the differentiation pattern of human epidermal keratinocytes. *Mol Cancer*. 2015; 14(1): 1–12.
398. Jobe NP, Rösel D, Dvořánková B, Kodet O, Lacina L, Mateu R, et al. Simultaneous

- blocking of IL-6 and IL-8 is sufficient to fully inhibit CAF-induced human melanoma cell invasiveness. *Histochem Cell Biol.* 2016; 146(2): 205-217.
399. Li L, Dragulev B, Zigrino P, Mauch C, Fox JW. The invasive potential of human melanoma cell lines correlates with their ability to alter fibroblast gene expression in vitro and the stromal microenvironment in vivo. *Int J Cancer.* 2009; 125(8): 1796–1804.
400. Kucera R, Topolcan O, Treskova I, Kinkorova J, Windrichova J, Fuchsova R, et al. Evaluation of IL-2, IL-6, IL-8 and IL-10 in malignant melanoma diagnostics. *Anticancer Res.* 2015; 35(6): 3537–3541.
401. Tsukamoto H, Fujieda K, Miyashita A, Fukushima S, Ikeda T, Kubo Y, et al. Combined blockade of IL6 and PD-1/PD-L1 signaling abrogates mutual regulation of their immunosuppressive effects in the tumor microenvironment. *Cancer Res.* 2018; 78(17): 5011–5022.
402. Jobe NP, Živicová V, Mifková A, Rösel D, Dvořánková B, Kodet O, et al. Fibroblasts potentiate melanoma cells in vitro invasiveness induced by UV-irradiated keratinocytes. *Histochem Cell Biol.* 2018; 149(5): 503–516.
403. Whipple CA, Brinckerhoff CE. BRAF V600E melanoma cells secrete factors that activate stromal fibroblasts and enhance tumourigenicity. *Br J Cancer.* 2014; 111(8): 1625–1633.
404. Pérez-Guijarro E, Day CP, Merlino G, Zaidi MR. Genetically engineered mouse models of melanoma. *Cancer.* 2017; 123(S11): 2089-2103.
405. Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Dev Dyn.* 1992; 195(4): 231–272.
406. Xing Z, Schat KA. Expression of cytokine genes in Marek's disease virus-infected chickens and chicken embryo fibroblast cultures. *Immunology.* 2000; 100(1): 70–76.
407. Liu J, Huang Z, Yang L, Wang X, Wang S, Li C, et al. Embryonic stem cells modulate the cancer-permissive microenvironment of human uveal melanoma. *Theranostics.* 2019; 9(16): 4764–4778.
408. Wang C, Wang X, Liu J, Huang Z, Li C, Liu Y, et al. Embryonic stem cell

- microenvironment suppresses the malignancy of cutaneous melanoma cells by down-regulating PI3K/AKT pathway. *Cancer Med.* 2019; 8(9): 4265–4277.
409. Ma X, Hui Y, Lin L, Wu Y, Zhang X, Liu P. Clinical significance of COX-2, GLUT-1 and VEGF expressions in endometrial cancer tissues. *Pakistan J Med Sci.* 2015; 31(2): 280–284.
410. Nemejcová K, Rosmusová J, Bártu M, Dura M, Tichá I, Dundr P. Expression of Glut-1 in Normal Endometrium and Endometrial Lesions: Analysis of 336 Cases. *Int J Surg Pathol.* 2017; 25(5): 389–396.
411. Parente P, Coli A, Massi G, Mangoni A, Fabrizi MM, Bigotti G. Immunohistochemical expression of the glucose transporters Glut-1 and Glut-3 in human malignant melanomas and benign melanocytic lesions. *J Exp Clin Cancer Res.* 2008; 27(1): 34.
412. Wachsberger PR, Gressen EL, Bhala A, Bobyock SB, Storck C, Coss RA, et al. Variability in glucose transporter-1 levels and hexokinase activity in human melanoma. *Melanoma Res.* 2002; 12(1): 35–43.
413. Cassimeris L. The oncoprotein 18/stathmin family of microtubule destabilizers. *Curr Opin Cell Biol.* 2002; 14(1): 18-24.
414. Rubin CI, Atweh GF. The role of stathmin in the regulation of the cell cycle. *J Cell Biochem.* 2004; 93(2): 242–250.
415. Biaoxue R, Hua L, Wenlong G, Shuanying Y. Overexpression of stathmin promotes metastasis and growth of malignant solid tumors: A systemic review and meta-analysis. *Oncotarget.* 2016; 7(48): 78994–9007.
416. Chen J, Abi-Daoud M, Wang A, Yang X, Zhang X, Feilotter HE, et al. Stathmin 1 is a potential novel oncogene in melanoma. *Oncogene.* 2013; 32(10): 1330–1337.
417. Alli E, Yang JM, Hait WN. Silencing of stathmin induces tumor-suppressor function in breast cancer cell lines harboring mutant p53. *Oncogene.* 2007; 26(7): 1003–1012.
418. Jiang L, Chen Y, Chan C yan, Wang X, Lin L, He M liang, et al. Down-regulation of stathmin is required for TGF- β inducible early gene 1 induced growth inhibition of pancreatic cancer cells. *Cancer Lett.* 2009; 274(1): 101–108.

419. Vereecken P, Cornelis F, Van Baren N, Vandersleyen V, Baurain JF. A synopsis of serum biomarkers in cutaneous melanoma patients. *Dermatol Res Pract.* 2012; 2012: 260643.
420. Anghel AE, Ene CD, Neagu M, Nicolae I. The relationship between interleukin 8 and ki67 in cutaneous malignant melanoma. *Hum Vet Med.* 2015; 7(3): 149–154.
421. Jobe NP, Rosel D, Dvorankova B, Kodet O, Lacina L, Mateu R, et al. Simultaneous blocking of IL-6 and IL-8 is sufficient to fully inhibit CAF-induced human melanoma cell invasiveness. *Histochem Cell Biol.* 2016; 146(2): 205–217.
422. de Oliveira SI, Andrade LNS, Onuchic AC, Nonogaki S, Fernandes PD, Pinheiro MC, et al. Platelet-activating factor receptor (PAF-R)-dependent pathways control tumour growth and tumour response to chemotherapy. *BMC Cancer.* 2010; 10: 1–12.
423. Corrie PG, Marshall A, Dunn JA, Middleton MR, Nathan PD, Gore M, et al. Adjuvant bevacizumab in patients with melanoma at high risk of recurrence (AVAST-M): Preplanned interim results from a multicentre, open-label, randomised controlled phase 3 study. *Lancet Oncol.* 2014; 15(6): 620–630.
424. Betti M, Aspesi A, Biasi A, Casalone E, Ferrante D, Ogliara P, et al. CDKN2A and BAP1 germline mutations predispose to melanoma and mesothelioma. *Cancer Lett.* 2016; 378(2): 120–130.
425. Akbani R, Akdemir KC, Aksoy BA, Albert M, Ally A, Amin SB, et al. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell.* 2015; 161(7): 1681–1696.
426. Hodis E, Watson IR, Kryukov G V., Arold ST, Imielinski M, Theurillat JP, et al. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell.* 2012; 150(2): 251–263.
427. Palmieri G, Colombino M, Casula M, Manca A, Mandalà M, Cossu A. Molecular Pathways in Melanomagenesis: What We Learned from Next-Generation Sequencing Approaches. *Curr Oncol Rep.* 2018; 20(11): 86.
428. Zhao X, Little P, Hoyle AP, Pegna GJ, Hayward MC, Ivanova A, et al. The prognostic significance of low-frequency somatic mutations in metastatic cutaneous melanoma. *Front Oncol.* 2019; 8: 584.
429. Smetana Jr. K, Szabo P, Gal P, Andre S, Gabius H-J, Kodet O, et al. Emerging role

- of tissue lectins as microenvironmental effectors in tumors and wounds. *Histol Histopathol.* 2015; 30(3): 293-309.
430. Mateu R, Živicová V, Krejčí ED, Grim M, Strnad H, Vlek A, et al. Functional differences between neonatal and adult fibroblasts and keratinocytes: Donor age affects epithelial-mesenchymal crosstalk in vitro. *Int J Mol Med.* 2016; 38(4): 1063–1074.
431. Poggi A, Giuliani M. Mesenchymal stromal cells can regulate the immune response in the tumor microenvironment. *Vaccines (Basel).* 2016; 4(4): 41.
432. Gray A, Grushchak S, Mudaliar K, Kliethermes S, Carey K, Hutchens KA. The microenvironment in primary cutaneous melanoma with associated spontaneous tumor regression: Evaluation for T-regulatory cells and the presence of an immunosuppressive microenvironment. *Melanoma Res.* 2017; 27(2): 104–109.
433. Duffy MM, Ritter T, Ceredig R, Griffin MD. Mesenchymal stem cell effects on T-cell effector pathways. *Stem Cell Res Ther.* 2011; 2(4): 34.
434. Scheller J, Garbers C, Rose-John S. Interleukin-6: From basic biology to selective blockade of pro-inflammatory activities. *Semin Immunol.* 2014; 26(1): 2-12.
435. Franceschi C, Capri M, Monti D, Giunta S, Olivieri F, Sevini F, et al. Inflammaging and anti-inflammaging: A systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mech Ageing Dev.* 2007; 128(1): 92–105.
436. Cho SH, Kim DW, Lee SH, Kolliputi N, Hong SJ, Suh L, et al. Age-related increased prevalence of asthma and nasal polyps in chronic rhinosinusitis and its association with altered IL-6 trans-signaling. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2015; 53(5): 601–606.
437. Nadrowski P, Chudek J, Skrzypek M, Puzianowska-Kuźnicka M, Mossakowska M, Więcek A, et al. Associations between cardiovascular disease risk factors and IL-6 and hsCRP levels in the elderly. *Exp Gerontol.* 2016; 85: 112–117.
438. Pearson MJ, Herndler-Brandstetter D, Tariq MA, Nicholson TA, Philp AM, Smith HL, et al. IL-6 secretion in osteoarthritis patients is mediated by chondrocyte-synovial fibroblast cross-talk and is enhanced by obesity. *Sci Rep.* 2017; 7(1):

3451.

439. Adriaensen W, Matheï C, Vaes B, van Pottelbergh G, Wallemacq P, Degryse JM. Interleukin-6 as a first-rated serum inflammatory marker to predict mortality and hospitalization in the oldest old: A regression and CART approach in the BELFRAIL study. *Exp Gerontol*. 2015; 69: 53–61.
440. Patel HJ, Patel BM. TNF- α and cancer cachexia: Molecular insights and clinical implications. *Life Sci*. 2017; 170: 56-63.
441. Zimmers TA, Fishel ML, Bonetto A. STAT3 in the systemic inflammation of cancer cachexia. *Semin Cell Dev Biol*. 2016; 54: 28-41.
442. Ostrowska Z, Ziora K, Oświęcimska J, Marek B, Źwiętochowska E, Kajdaniuk D, et al. Selected pro-inflammatory cytokines, bone metabolism, osteoprotegerin, and receptor activator of nuclear factor-kB ligand in girls with anorexia nervosa. *Endokrynol Pol*. 2015; 66(4): 313–321.
443. Sato H, Naito T, Ishida T, Kawakami J. Relationships between oxycodone pharmacokinetics, central symptoms, and serum interleukin-6 in cachectic cancer patients. *Eur J Clin Pharmacol*. 2016; 72(12): 1463–1470.
444. Suh SY, Choi YS, Yeom CH, Kwak SM, Yoon HM, Kim DG, et al. Interleukin-6 but not tumour necrosis factor-alpha predicts survival in patients with advanced cancer. *Support Care Cancer*. 2013; 21(11): 3071–3077.
445. Holmer R, Wätzig GH, Tiwari S, Rose-John S, Kalthoff H. Interleukin-6 trans-signaling increases the expression of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules 5 and 6 in colorectal cancer cells. *BMC Cancer*. 2015; 15(1): 1.
446. Kanazawa T, Nishino H, Hasegawa M, Ohta Y, Ino Y, Ichimura K, et al. Interleukin-6 directly influences proliferation and invasion potential of head and neck cancer cells. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology*. 2007; 264(7): 815–21.
447. Santer FR, Malinowska K, Culig Z, Cavarretta IT. Interleukin-6 trans-signalling differentially regulates proliferation, migration, adhesion and maspin expression in human prostate cancer cells. *Endocr Relat Cancer*. 2010; 17(1): 241–253.
448. Wolfe AR, Trenton NJ, Debeb BG, Larson R, Ruffell B, Chu K, et al.

- Mesenchymal stem cells and macrophages interact through IL-6 to promote inflammatory breast cancer in pre-clinical models. *Oncotarget*. 2016; 7(50): 82482–82492.
449. Yeh CR, Slavin S, Da J, Hsu I, Luo J, Xiao GQ, et al. Estrogen receptor α in cancer associated fibroblasts suppresses prostate cancer invasion via reducing CCL5, IL6 and macrophage infiltration in the tumor microenvironment. *Mol Cancer*. 2016; 15: 7.
450. Li F, Li XJ, Qiao L, Shi F, Liu W, Li Y, et al. MiR-98 suppresses melanoma metastasis through a negative feedback loop with its target gene IL-6. *Exp Mol Med*. 2014; 46(10): 116.
451. Kim HS, Chen YC, Nör F, Warner KA, Andrews A, Wagner VP, et al. Endothelial-derived interleukin-6 induces cancer stem cell motility by generating a chemotactic gradient towards blood vessels. *Oncotarget*. 2017; 8(59): 100339–100352.
452. Ara T, DeClerck YA. Interleukin-6 in bone metastasis and cancer progression. *Eur J Cancer*. 2010; 46(7): 1223–1231.
453. Kitamura H, Ohno Y, Toyoshima Y, Ohtake J, Homma S, Kawamura H, et al. Interleukin-6/STAT3 signaling as a promising target to improve the efficacy of cancer immunotherapy. *Cancer Sci*. 2017; 108(10): 1947-1952.
454. Drutskaya MS, Efimov GA, Kruglov AA, Nedospasov SA. Can we design a better anti-cytokine therapy? *J Leukoc Biol*. 2017; 102(3): 783–790.
455. Kim SR, Bae MK, Kim JY, Wee HJ, Yoo MA, Bae SK. Aspirin induces apoptosis through the blockade of IL-6-STAT3 signaling pathway in human glioblastoma A172 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 387(2): 342–347.
456. Saha S, Mukherjee S, Khan P, Kajal K, Mazumdar M, Manna A, et al. Aspirin suppresses the acquisition of chemoresistance in breast cancer by disrupting an NF κ B-IL6 signaling axis responsible for the generation of cancer stem cells. *Cancer Res*. 2016; 76(7): 2000–2012.
457. Carvajal RD, Schwartz GK, Tezel T, Marr B, Francis JH, Nathan PD. Metastatic disease from uveal melanoma: Treatment options and future prospects. *Br J Ophthalmol*. 2017; 101(1): 38-44.

458. Murakami T, Cardones AR, Hwang ST. Chemokine receptors and melanoma metastasis. *J Dermatol Sci.* 2004; 36(2): 71-78.
459. Gkoutela S, Aceto N. Stem-like features of cancer cells on their way to metastasis. *Biol Direct.* 2016; 11: 33.
460. Ciołczyk-Wierzbička D, Laidler P. The inhibition of invasion of human melanoma cells through N-cadherin knock-down. *Med Oncol.* 2018; 35(4): 1–9.
461. Chung H, Jung H, Jho E hoon, Multhaupt HAB, Couchman JR, Oh ES. Keratinocytes negatively regulate the N-cadherin levels of melanoma cells via contact-mediated calcium regulation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018; 503(2): 615–620.
462. Brandner JM, Haass NK. Melanoma's connections to the tumour microenvironment. *Pathology.* 2013; 45(5): 443–452.
463. Tan LY, Mintoff C, Johan MZ, Ebert BW, Fedele C, Zhang YF, et al. Desmoglein 2 promotes vasculogenic mimicry in melanoma and is associated with poor clinical outcome. *Oncotarget.* 2016; 7(29): 46492–46508.
464. Nikkola J, Vihinen P, Vlaykova T, Hahka-Kemppinen M, Heino J, Pyrhönen S. Integrin chains $\beta 1$ and αv as prognostic factors in human metastatic melanoma. *Melanoma Res.* 2004; 14(1): 29–37.
465. Van Belle PA, Elenitsas R, Satyamoorthy K, Wolfe JT, Guerry IV D, Schuchter L, et al. Progression-related expression of $\beta 3$ integrin in melanomas and nevi. *Hum Pathol.* 1999; 30(5): 562–567.
466. Klemke M, Weschenfelder T, Konstandin MH, Samstag Y. High affinity interaction of integrin $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) enhances migration of human melanoma cells across activated endothelial cell layers. *J Cell Physiol.* 2007; 212(2): 368–374.
467. Lacaria L, Lange JR, Goldmann WH, Rico F, Alonso JL. $\alpha v\beta 3$ integrin expression increases elasticity in human melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020; 525(4): 836–840.
468. Kemp DM, Pidich A, Larijani M, Jonas R, Lash E, Sato T, et al. Ladarixin, a dual CXCR1/2 inhibitor, attenuates experimental melanomas harboring different

- molecular defects by affecting malignant cells and tumor microenvironment. *Oncotarget*. 2017; 8(9): 14428–14442.
469. Nürnberg W, Tobias D, Otto F, Henz BM, Schadendorf D. Expression of interleukin-8 detected by in situ hybridization correlates with worse prognosis in primary cutaneous melanoma. *J Pathol*. 1999; 189(4): 546–551.
470. Ortega-Bernal D, La Rosa CHG, Arechaga-Ocampo E, Alvarez-Avitia MA, Moreno NS, Rangel-Escareño C. A meta-analysis of transcriptome datasets characterizes malignant transformation from melanocytes and nevi to melanoma. *Oncol Lett*. 2018; 16(2): 1899–1911.
471. Adamski V, Mentlein R, Lucius R, Synowitz M, Held-Feindt J, Hattermann K. The chemokine receptor CXCR6 evokes reverse signaling via the transmembrane chemokine CXCL16. *Int J Mol Sci*. 2017; 18(7): 1468.
472. Lu C, Kerbel RS. Interleukin-6 undergoes transition from paracrine growth inhibitor to autocrine stimulator during human melanoma progression. *J Cell Biol*. 1993; 120(5): 1281–1288.
473. Gowda R, Robertson BM, Iyer S, Barry J, Dinavahi SS, Robertson GP. The role of exosomes in metastasis and progression of melanoma. *Cancer Treat Rev*. 2020; 85: 101975.
474. Gandalovičová A, Rosel D, Fernandes M, Veselý P, Heneberg P, Čermák V, et al. Migrastatics—Anti-metastatic and Anti-invasion Drugs: Promises and Challenges. *Trends Cancer*. 2017; 3(6): 391-406.
475. Jouve N, Bachelier R, Despoix N, Blin MG, Matinzadeh MK, Poitevin S, et al. CD146 mediates VEGF-induced melanoma cell extravasation through FAK activation. *Int J Cancer*. 2015; 137(1): 50–60.
476. Hamilla SM, Stroka KM, Aranda-Espinoza H. VE-cadherin-independent cancer cell incorporation into the vascular endothelium precedes transmigration. *PLoS One*. 2014; 9(10): 109748.
477. Kim KJ, Kwon SH, Yun JH, Jeong HS, Kim HR, Lee EH, et al. STAT3 activation in endothelial cells is important for tumor metastasis via increased cell adhesion molecule expression. *Oncogene*. 2017; 36(39): 5445–5459.

478. Borgenström M, Wärrri A, Hiilesvuo K, Käkönen R, Käkönen S, Nissinen L, et al. O-sulfated bacterial polysaccharides with low anticoagulant activity inhibit metastasis. *Semin Thromb Hemost.* 2007; 33(5): 547-56.
479. Desch A, Strozyk EA, Bauer AT, Huck V, Niemeyer V, Wieland T, et al. Highly invasive melanoma cells activate the vascular endothelium via an MMP-2/integrin $\alpha\beta 5$ -induced secretion of VEGF-A. *Am J Pathol.* 2012; 181(2): 693–705.
480. Zhao X, Shao C. Radiotherapy-Mediated Immunomodulation and Anti-Tumor Abscopal Effect Combining Immune Checkpoint Blockade. *Cancers (Basel).* 2020; 12(10): 1–20.
481. MOLE RH. Whole body irradiation; radiobiology or medicine? *Br J Radiol.* 1953; 26(305): 234–241.
482. Zhou J, Wang G, Chen Y, Wang H, Hua Y, Cai Z. Immunogenic cell death in cancer therapy: Present and emerging inducers. *J Cell Mol Med.* 2019; 23(8): 4854-4865.
483. Gardai SJ, McPhillips KA, Frasch SC, Janssen WJ, Starefeldt A, Murphy-Ullrich JE, et al. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell.* 2005; 123(2): 321–334.
484. Lee Y, Auh SL, Wang Y, Burnette B, Wang Y, Meng Y, et al. Therapeutic effects of ablative radiation on local tumor require CD8 + T cells: Changing strategies for cancer treatment. *Blood.* 2009; 114(3): 589–595.
485. Gu Y, Srimathveeravalli G, Cai L, Ueshima E, Maybody M, Yarmohammadi H, et al. Pirfenidone inhibits cryoablation induced local macrophage infiltration along with its associated TGF β 1 expression and serum cytokine level in a mouse model. *Cryobiology.* 2018; 82: 106–111.
486. Takahashi Y, Izumi Y, Matsutani N, Dejima H, Nakayama T, Okamura R, et al. Optimized magnitude of cryosurgery facilitating anti-tumor immunoreaction in a mouse model of Lewis lung cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2016; 65(8): 973–982.
487. Dvorak HF. Tumors: Wounds that do not heal-redux. *Cancer Immunol Res.* 2015; 3(1): 1–11.

488. Strnadová K, Španko M, Dvořánková B, Lacina L, Kodet O, Shbat A, et al. Melanoma xenotransplant on the chicken chorioallantoic membrane: a complex biological model for the study of cancer cell behaviour. *Histochem Cell Biol.* 2020; 154(2): 177–188.
489. Dura M, Ticha I, Nemejcova K, Kodet O, Bartu M, Jaks R, et al. The expression of Glut-1 in malignant melanoma and melanocytic nevi: An immunohistochemical study of 400 cases. *Pathol Oncol Res.* 2019 Jan;25(1):361-368.
490. Ticha I, Hojny J, Michalkova R, Kodet O, Krkavcova E, Hajkova N, et al. A comprehensive evaluation of pathogenic mutations in primary cutaneous melanomas, including the identification of novel loss-of-function variants. *Sci Rep.* 2019; 9(1): 17050.
491. Němejcová K, Dundr P, Jakša R, Bártů M, Stružinská I, Hojný J, et al. Comprehensive Analysis of PTEN in Primary Cutaneous Melanoma. *Folia Biol (Czech Republic).* 2020; 66(1): 7–16.
492. Dvořánková B, Szabo P, Kodet O, Strnad H, Kolář M, Lacina L, et al. Intercellular crosstalk in human malignant melanoma. *Protoplasma.* 2017; 254(3): 1143-1150.
493. Lacina L, Brábek J, Král V, Kodet O, Smetana K. Interleukin-6: a molecule with complex biological impact in cancer. *Histol Histopathol.* 2019; 34(2): 125-136.
494. Kodet O, Kučera J, Strnadová K, Dvořánková B, Štork J, Lacina L, et al. Cutaneous melanoma dissemination is dependent on the malignant cell properties and factors of intercellular crosstalk in the cancer microenvironment (Review). *Int J Oncol.* 2020; 57(3): 619-630.