

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**  
**LÉKAŘSKÁ FAKULTA**



**Disertační práce**

**2021**

**MUDr. Marie Bartoušková**



**Využití neopterinu pro monitorování a predikci nežádoucích účinků cílené léčby a imunoterapie u pacientů s metastatickým maligním melanomem**

Marie Bartoušková, MUDr.

Dizertační práce

Olomouc 2021

Doktorský studijní program: Onkologie

Školitel: Prof. MUDr. Bohuslav Melichar, Ph.D.



**Use of neopterin for monitoring and predicting adverse events of targeted  
therapy and immunotherapy in patients with metastatic malignant  
melanoma**

Marie Bartoušková M. D.

Doctoral Thesis

Olomouc 2021

Doctoral Study Programme: Oncology

Supervisor: Prof. Bohuslav Melichar, M.D., Ph.D.

## **Prohlášení**

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci na téma: „Využití neopterinu pro monitorování a predikci nežádoucích účinků cílené léčby a imunoterapie u pacientů s metastatickým maligním melanomem.“ vypracovala samostatně a uvedla jsem všechny použité informační zdroje. Současně dávám souhlas k zařazení této práce do Knihovny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, kde může být užívána ke studijním účelům, pro publikační či přednáškovou činnost za předpokladu, že bude jako zdroj řádně citována. Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze své doktorské práce v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne 21. ledna 2021

MUDr. Marie Bartoušková

## **Poděkování**

Ráda bych na prvním místě poděkovala svému školiteli prof. MUDr. Bohuslavu Melicharovi Ph.D., který mě za dobu mého působení na Onkologické klinice v Olomouci naučil mnohé a bez jehož pomoci by tato práce nevznikla.

Velký dík patří i mé rodině, zejména mamince, která mě v průběhu mých životních peripetií vytrvale a láskyplně podporuje.

Je třeba poděkovat i pacientům, kteří vstoupili do tohoto projektu a bez jejichž účasti by nebylo možné tuto práci uskutečnit.

**„ To, co je nejdůležitější, je bod zvratu.“**

**Jan Pavel II**

## **1. TEORETICKÁ ČÁST**

### **1.1. Maligní melanom**

1.1.1 Úvod	10
1.1.2 Epidemiologie	10
1.1.3 Rizikové faktory	12
1.1.4 Prevence	13
1.1.5 Klinické příznaky	13
1.1.6 Klasifikace melanomů	14
1.1.7 TNM	16
1.1.8 Prognostické faktory	18
1.1.9 Prediktivní faktory	18
1.1.10 Diagnostický postup	19
1.1.11 Terapie	20
1.1.11.1 Léčba počátečních stádií	20
1.1.11.2 Léčba metastatického onemocnění	22

### **1.2 Imunoterapie a její role v léčbě maligních onemocnění**

1.2.1 Historie imunoterapie	29
1.2.2 Klasifikace imunoterapie	31
1.2.3 Mechanismus účinku checkpoint inhibitorů	32
1.2.4 Indikace	33
1.2.5 Imunitně podmíněné nežádoucí účinky	34
1.2.6 Incidence imunitně podmíněných nežádoucích účinků	35
1.2.7 Vybrané imunitně podmíněné nežádoucí účinky a jejich management	35
1.2.7.1 Kožní imunitně podmíněné nežádoucí účinky	35
1.2.7.2 Gastrointestinální	36
1.2.7.3 Endokrinní	38
1.2.7.4. Pneumonitida	39
1.2.7.5. Revmatologické	40

1.2.7.6. Neurologické	40
1.2.7.7. Renální	41
1.2.7.8 Oftalmologické	41
1.2.7.9 Kardiovaskulární	41
1.2.7.10 Hematologické	42
1.2.8 Obecná doporučení pro terapii imunitně podmíněných nežádoucích účinků	42
1.2.9 Vztah mezi imunitně podmíněnými nežádoucími účinky a efektem imunoterapie	43
1. 2. 10 Hodnocení léčebné odpovědi u pacientů léčených imunoterapií	43
1. 2. 11 Fenomén hyperprogrese	44
1. 2. 12 Biomarkery a imunoterapie	44
<b>1.3 Neopterin</b>	
1.3.1 Úvod	48
1.3.2 Chemická struktura pteridinů	48
1.3.3 Neopterin a jeho syntéza in vivo	48
1.3.4 Neopterin a jeho chemické vlastnosti	50
1.3.5 Neopterin v tělních tekutinách	50
1.3.6 Metoda stanovení neopterinu	50
1.3.7 Normální hodnoty neopterinu	51
1.3.8 Využití neopterinu v klinické medicíně	52
1.3.9.1 Virové infekce	53
1.3.9.2 Infekce centrálního nervového systému	53
1.3.9.3 Tuberkulóza	53
1.3.9.4 Kardiovaskulární onemocnění	54
1.3.9.5 Polytrauma	54

1.3.9.6 Význam monitorování neopterinu u kriticky nemocných pacientů na jednotkách intenzivní péče	54
1.3.9.7 Transplantace	55
1.3.9.8 Autoimunitní choroby	55
1.3.9.9 Vyšetření zdravých dárců	56
1.4.1 Význam neopterinu v onkologii	56
1.4.1.1 Monitorace buněčné imunitní odpovědi	56
1.4.1.2 Prognostický význam neopterinu u nemocných s nádory	57
1.3.9.3 Využití neopterinu ke sledování účinku protinádorové terapie	59
1.3.9.4 Využití neopterinu k monitoraci toxicity protinádorové terapie	59
1.3.9.5 Využití neopterinu jako prediktoru vzniku imunitně podmíněných nežádoucích účinků u pacientů léčených checkpoint inhibitory	60
1. 3. 9.6 Závěr	60
<b>2. PRAKTICKÁ ČÁST</b>	
<b>2.1.Využití neopterinu jako biomarkeru toxicity imunoterapie</b>	
2.1.1 Pilotní studie - Kazuistika neočekávaný nežádoucí účinek nivolumabu	61
2.1.2 Kazuistika - Neopterin a imunitně podmíněné nežádoucí účinky postihující více orgánů u pacienta léčeného kombinovanou imunoterapií	66
2.1.3 Neopterin jako biomarker imunitně podmíněných nežádoucích účinků	68
2.1.3.1 Metodika	68
2.1.3.2 Výsledky	69
2.1.3.3 Diskuze a závěr	74
<b>2. 2 Využití sledování hladin neopterinu v séru a v moči při hodnocení horečky u pacientů léčených kombinací BRAF a MEK inhibitoru</b>	
2.2.1. Popis případu	75
2.2.2. Závěr	79



<b>2.3. Neopterin u pacientů s metastatickým maligním melanomem léčených ipilimumabem</b>	
2.3.1 Charakteristika souboru a metodika	81
2.3.2 Výsledky	81
2.3.3 Diskuze	83
<b>3. ZÁVĚR</b>	85
<b>Seznam použitých pramenů a literatury</b>	86
<b>Seznam obrázků</b>	109
<b>Seznam tabulek</b>	110
<b>Seznam grafů</b>	111
<b>Seznam zkratk</b>	112
<b>Seznam prací autorky dizertace</b>	115

# TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Maligní melanom

### 1.1.1 Úvod

Maligní melanom je označení pro velmi heterogenní skupinu nádorů, jejichž biologické chování je vysoce variabilní a obtížně predikovatelné. Společně s karcinomem z Merkelových buněk se maligní melanom řadí mezi nejzhoubnější kožní nádory. Melanom vychází z melanocytů, které následně během embryogeneze migrují z neurální lišty do kůže a kožních adnex, sliznic, mozkových plen a celé řady orgánů, mohou být postiženy jednotlivé části uvey (iris, corpus ciliare, choroidea), v oblasti ucha (kochlea, vestibulární aparát).

Imunohistochemické markery pro melanom jsou protein S-100, Melan A a protilátka HMB-45. (1)

S maligním melanomem se můžeme potkat nejen v oblasti kůže, ale existují i extrakutánní melanomy - slizniční melanom (lokalizován v dutině ústní, spojivce, paranasálních dutinách, jícnu, žaludku, močovém měchýři, v oblasti anu či vagině), dále uveální melanom (nejčastější primární nitrooční nádor dospělých, tato skupina zahrnuje melanom choroidey, ciliárního tělesa a duhovky) a melanomy meningů.

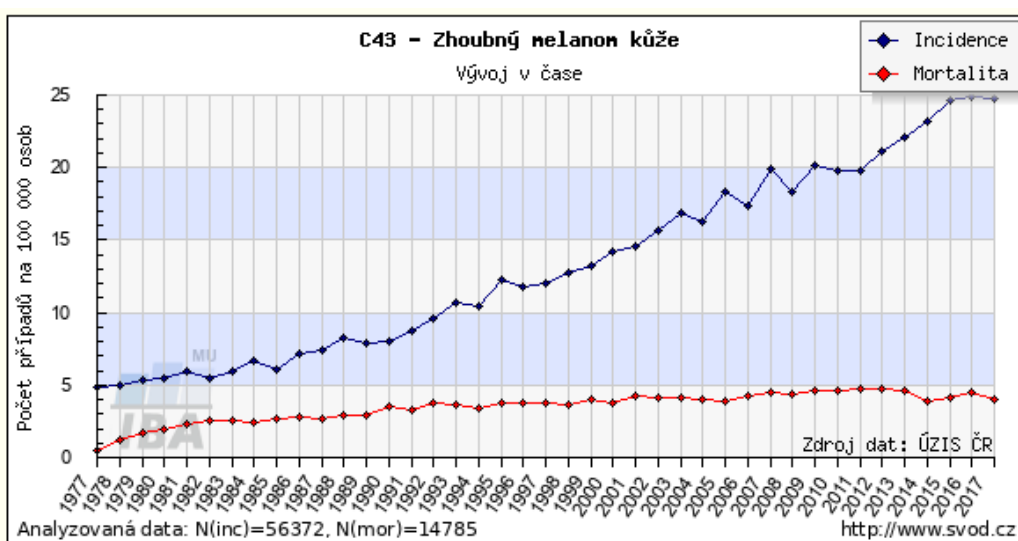
Tyto nádory se liší nejen svou molekulárně biologickou charakteristikou, biologickým chováním, ale zejména typem protinádorové léčby. U kožních melanomů, kterými se tato práce zabývá podrobněji, hraje od roku 2011 klíčovou roli imunoterapie a cílená léčba. U uveálních melanomů dochází bohužel až u 50 % pacientů do 5 let k tvorbě jaterních metastáz a v případě izolovaného postižení jaterního parenchymu se uplatňují lokoregionální metody léčby (například intraarteriální chemoterapie, chemoembolizace či izolovaná jaterní perfuze).

(2) U slizničních melanomů můžeme nacházet aktivační mutaci c-kit a pak jsou lékem volby c-kit inhibitory (imatinib mesylát).

### 1.1.2 Epidemiologie

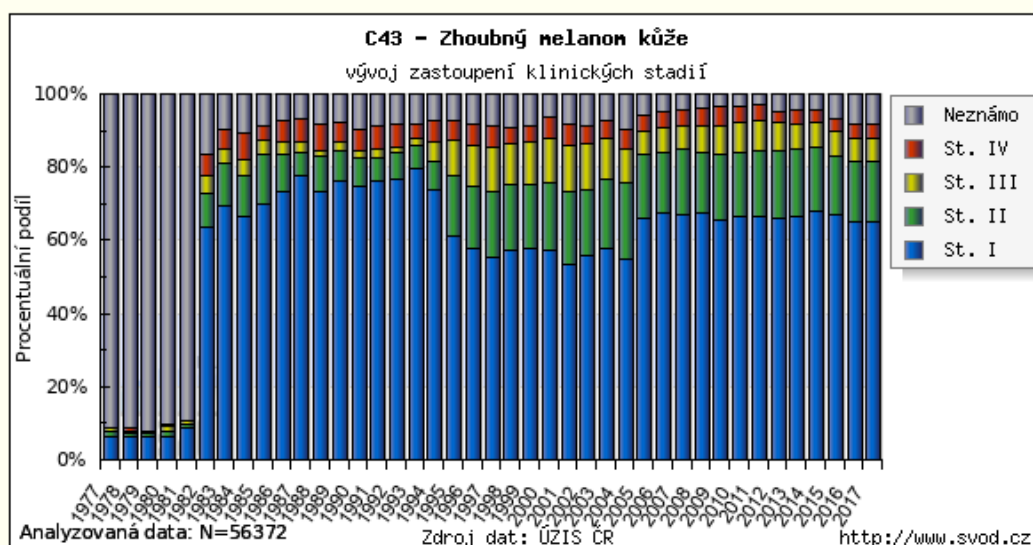
Incidence kožního maligního melanomu (C43) v posledních letech prudce narůstá, za posledních 40 let se zvýšila téměř pětkrát. V roce 1977 byla incidence 4,89 na 100 000 (v absolutních číslech 500 nových pacientů), v roce 2017 byla incidence 24,74 na 100 000 (bylo hlášeno 2620 nově diagnostikovaných pacientů s kožním melanomem). (3) Celosvětově je nejvyšší incidence v Austrálii a Novém Zélandě, Česká republika zaujímá dvanácté místo v přepočtu na světový standard. Bohužel nárůst incidence je patrný zejména u mladších

pacientů. Poměr zastoupení mužů a žen je 1:1. Jedná se o sedmý nejčastější nádor v České republice. Mortalita je stacionární vzhledem k tomu, že většina nádorů je zachycena v časném stadiu choroby s relativně dobrou prognózou onemocnění. Na tomto místě je třeba zdůraznit důležitost preventivních programů, erudovanost populace, zlepšení diagnostiky klinické i histopatologické, ale také rizikové chování mladších skupin (solária), všechny tyto činitele vedou ke zvýšení incidence melanomu, ale také k zachycení v časnější fázi choroby. V současné době je většina pacientů (80-85%) diagnostikována ve fázi lokalizovaného onemocnění, asi 10-15% má v době diagnózy již uzlinové metastázy a 5% pacientů má v době diagnózy již vzdálené metastázy.



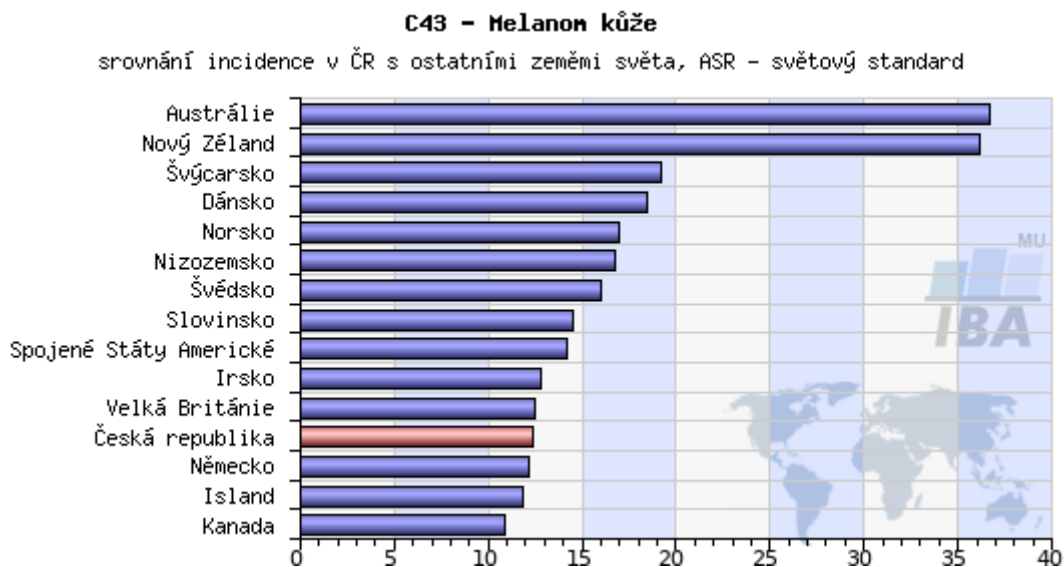
**Obrázek 1: Incidence a mortalita na maligní melanom (C43) v letech 1977 -2017 v přepočtu na 100 000.**

Zdroj dat: Národní onkologický registr. Převzato z <http://www.svod.cz>



**Obrázek 2: Zastoupení klinických stadií v čase.**

Zdroj dat: Národní onkologický registr. Převzato z <http://www.svod.cz>



**Obrázek 3. Srovnání incidence celosvětově.**

Zdroj dat: Národní onkologický registr. Převzato z <http://www.svod.cz>

### 1.1.3 Rizikové faktory

Rizikové faktory můžeme rozdělit do dvou skupin, faktory genetické a faktory zevního prostředí. Asi 10 % melanomů má familiární výskyt. (4) Mezi hereditární nádorové syndromy můžeme zařadit **syndrom familiárního melanomu**, jedná se o autozomálně dominantně dědičné onemocnění. Onemocnění je způsobeno germinální mutací v genu CDKN2A (cyklin dependent kinase inhibitor 2A) a CDK4. Gen CDKN2A hraje roli asi u 20-40 % hereditárních melanomů a 0,2- 4 % sporadických nádorů. Nosiči s mutací v tomto genu mají celoživotní riziko 58-92 %, dále je zvýšené riziko nádorů pankreatu na 11-17 %. (5)

Indikace k vyšetření CDKN2A genu splňují 2 skupiny pacientů:

- 1) pacienti s familiárním výskytem melanomu:
  - alespoň 2 maligní melanomy u přímého příbuzného prvního a druhého stupně, diagnostikované ve věku pod 50 let
  - tři a více maligních melanomů v rodinné linii
  - výskyt 2 maligních melanomů, nádoru prsu nebo slinivky u přímých příbuzných
- 2) pacienti se sporadickým melanomem
  - opakovaně diagnostikován maligní melanom u jednoho pacienta, první nález před 50. rokem věku

- vícečetná malignita u pacienta nádor prsu nebo nádor slinivky břišní a maligní melanom, aspoň jeden diagnostikován před 50. rokem věku

Testování je indikováno klinickým genetikem na základě předchozí genetické konzultace.

Mezi další hereditární syndromy patří přítomnost **BRCA2 mutace, Li-Fraumeniho syndrom, Xeroderma pigmentosum.**

Asi 10-15 % melanomů se vyvíjí na podkladě dysplastických či získaných névů. Normální počet získaných névů u jedince kolem 30let se pohybuje mezi 20-40, při počtu vyšším jak 100 je riziko vzniku melanomu sedminásobné. Je třeba říci, že riziko maligní transformace získaného névu je však nízké, vyšší riziko mají pacienti s vyšším počtem dysplastických névů. Také záleží také na kožním fototypu, lidé se světlou pletí, velkým množstvím pih a s tendencí k rychlému spálení kůže mají vyšší riziko onemocnění. Z faktorů zevního prostředí hraje klíčovou roli UV záření, jak UVA i UVB. Ultrafialové záření působí jak ve fázi iniciace maligního procesu, jako promotor, kokancerogen a má i imunosupresivní vliv. Rizikové se jeví zejména prudké nárazové spálení kůže, spálení v raném dětství, spálení osob s fototypem kůže I a II (blond či zrzavé vlasy, modré či zelené oči), než působení kumulativního slunečního záření. Vyšší riziko mají dlouhodobě imunosuprimovaní jedinci. (6)

#### **1.1.4 Prevence**

Důležitou roli zde má primární prevence, zejména ochrana pokožky před slunečním zářením, vyvarovat se pobytu na slunci přes poledne, používat krémy s vysokým ochranným faktorem (SPF 40 a více, proti UVA i UVB složce), krémy užívat opakovaně při delším pobytu na slunci, nenavštěvovat solária. Sekundární prevence zahrnuje samovyšetření pokožky každý měsíc, kožní kontroly lékařem, u pacientů v rizikových skupinách se užívá fotodokumentace rizikových névů pomocí digitální dermatoskopie a následné odstranění rizikových znamének.

#### **1.1.5 Klinické příznaky**

Často se charakteristické znaky vzniklého melanomu označují zkratkou ABCDEF, A znamená asymetrii névu (asymetry), B se týká nepravidelných či nejasně ohraničených okrajů léze (border), C znamená změny barvy, barva není uniformní, stejně jako přítomnost modré, šedé či červené barvy (colour), D velikost ložiska nad 5 mm (diameter), můžou se však vyskytnout i mikromelanomy, E typické postupné zvětšování jak v horizontálním i vertikálním směru (enlargement), písmeno F (funny-looking) odkazuje k podivnému vzhledu.

Dále se může vyskytnout svědění, ulcerace či krvácení, které jsou známkou pokročilého onemocnění. (6)

Většinou se melanom vyvíjí postupně v několika růstových fázích nejprve melanom in situ, poté probíhá radiální fáze růstu (laterální šíření s invazí do papilární dermis), následuje vertikální fáze (zahrnuje invazi do retikulární dermis). (1,4,6)

Metastazování probíhá jak lymfogenně, nejprve do regionálních lymfatických uzlin a kůže, tak i hematogenně do vzdálených orgánů. Pozdním příznakem metastazování lokoregionálními lymfatickými cestami jsou kožní metastázy. U pacientů s metastatickým melanomem se vyskytují kožní metastázy až u 50 % nemocných. Kožní metastázy klasifikujeme podle vzdálenosti mezi primárním ložiskem a metastázou na **satelitní metastázy** (do vzdálenosti 5 cm od primárního ložiska) a intranzitní metastázy. **Intranzitní metastázy** jsou ve větší vzdálenosti od primární léze směrem ke spádovým lymfatickým uzlinám. Dále mohou být přítomny **podkožní metastázy**, které se prezentují jako tuhé uzly kdekoli na těle. **Uzlinové metastázy** se vyskytují asi u 75 % nemocných, představují nejčastější formu metastazování. (7) Melanom patří mezi nádory, které metastazují v podstatě do jakéhokoli orgánu, **vzdálené metastázy** tedy můžeme lokalizovat kdekoli včetně raritních lokalizací (například štítná žláza, myokard). Vzdálené metastázy se mohou objevit za velmi dlouhou dobu po diagnóze základního onemocnění.

### 1.1.6 Klasifikace melanomů

#### 1) Dle lokalizace:

##### **Kožní melanomy**

##### **Extrakutánní**

- slizniční (spojivka, dutina ústní, paranasální dutiny, sliznice gastrointestinálního traktu, anogenitální oblast, vagina)
- uveální melanom (melanom duhovky, melanom choroidey, melanom corpus ciliare)
- melanom meningů

#### 2) Morfologická klasifikace kožního melanomu na základě klinického a histologického obrazu:

### **Lentigo maligna melanom (LMM)**

Často bývá na místech exponovaných slunečnímu záření, v obličeji starších osob. Vzniká v ložisku prekancerózy lentigo maligna. Jedná se o velmi pomalu rostoucí formu, progresse z radiální do vertikální fáze růstu může být dlouhá i několik let, léze může dosahovat poměrně velkých rozměrů až 5 cm. Představuje si 10 % všech melanomů.

### **Povrchově se šířící melanom (SSM)**

Nejčastější forma melanomu (65-75 %), typicky v počátečních fázích roste horizontálně, v pozdější fázi růstu probíhá invaze do dermis. Objevuje se na trupu i na končetinách. Prekurzorem této formy může být dysplastický či junkční névus.

### **Nodulární melanom (NMM)**

Patří mezi nejagresivnější formy, pro které je typická absence horizontálního šíření, vertikální růst nastupuje od počátku, má nejhorší prognózu. Do této skupiny můžeme zařadit 15-30 % lézí. Může se vyskytnout jako amelanotická forma.

### **Akrolentiginózní melanom (ALM)**

Patří mezi vzácné formy, vyskytuje se na ploskách nohou, dlaních, pod nehty. Často bývá diagnostikován pozdě, může být zaměněn za subunguální hematom.

### **Desmoplastický melanom**

Patří mezi vzácné varianty, vyskytující se na hlavě, krku či horní polovině zad.

### **Amelanotické formy**

Vlivem poruchy enzymů tvořících pigment nemají typické zbarvení. Často způsobují diagnostické obtíže. (4)

### **3) Klasifikace na základě analýzy genového expresního profilu:**

Jednotlivé podtypy se liší počtem chromozomálních aberací a frekvencí mutací ve specifických genech (BRAF, NRAS, KIT, CDK).

### **Melanomy kůže vznikající v oblasti bez chronického solárního poškození**

Představují největší podskupinu maligních melanomů, často se vyskytuje BRAF mutace či NRAS mutace. U této skupiny nádorů hraje významnou roli cílená léčba.

## Melanomy vznikající v oblastech kůže s chronickým solárním poškozením

Melanomy obličejové či dorzální strany krku, časté je zastoupení mutace NRAS.

### Akrální melanomy

Vyskytují se na akrech rukou a nohou včetně subunguálního melanomu.

### Slizniční melanomy

Patří sem melanomy vznikající v dutině ústní, v oblasti paranasálních dutin, v oblasti anogenitální sliznice či vagině, častá je přítomnost mutace KIT. (8)

### 1.1.7 TNM klasifikace

T primární nádor se klasifikuje po excizi pT

<b>pT Primární nádor</b>
pTX primární nádor nelze hodnotit pT0 bez známek primárního nádoru nebo regredovaných melanomů pTis melanom in situ (Clark 1)
<b>pT1 nádor o tloušťce do 1mm</b>
pT1a nádor o tloušťce do 0,8mm, bez ulcerace pT1b nádor o tloušťce do 0,8mm s ulcerací, nebo 0,8-1mm s i bez ulcerace
<b>pT2 nádor o tloušťce větší než 1mm, menší než 2mm</b>
pT2a bez ulcerace pT2b s ulcerací
<b>pT3 nádor o tloušťce větší než 2mm, menší než 4mm</b>
pT3a bez ulcerace pT3b s ulcerací
<b>pT4 nádor o tloušťce nad 4mm</b>
pT4a bez ulcerace pT4b s ulcerací

**Tabulka 1: TNM klasifikace kategorie pT**

Převzato z TNM klasifikace, 8. vydání 2018. (9)

### Regionální uzliny

NX regionální mízní uzliny nelze hodnotit



N0 regionální mízní uzliny bez metastáz, histologické vyšetření má zahrnovat 6 a více mízních uzlin

<b>N1 metastáza v jedné regionální mízní uzlině nebo metastáza v průběhu regionální mízní drenáže s jednou uzlinovou metastázou</b>
N1a pouze mikroskopická metastáza (klinicky nezjistitelná)
N1b makroskopická metastáza (klinicky zřejmá)
N1c satelit nebo transitorní metastáza, bez regionální uzlinové metastázy
<b>N2 metastázy ve dvou nebo třech regionálních mízních uzlinách nebo metastázy v průběhu regionální mízní drenáže s jednou uzlinovou metastázou</b>
N2a pouze mikroskopické uzlinové metastázy
N2b makroskopické uzlinové metastázy
N2c satelit nebo transitorní metastázy, spolu s pouze jednou metastázou v regionální uzlině
<b>N3 metastázy ve čtyřech či více regionálních mízních uzlinách, splývající metastaticky postižené mízní uzliny, nebo satelity nebo transitorní metastázy spolu s metastázami ve dvou nebo více regionálních mízních uzlinách</b>
N3a pouze mikroskopické uzlinové metastázy
N3b makroskopické uzlinové metastázy
N3c satelit nebo transitorní metastázy, spolu se dvěma nebo více metastázami v regionálních uzlinách

**Tabulka 2: TNM klasifikace kategorie N**

Převzato z TNM klasifikace, 8. vydání 2018. (9)

### **M vzdálené metastázy, hladina laktátdehydrogenázy**

M0 bez vzdálených metastáz
M1 vzdálená metastáza
M1a kůže, podkoží, mízní uzliny mimo regionální lymfatické oblasti
M1b plíce
M1c jiné lokalizace mimo centrální nervový systém
M1d centrální nervový systém
<b>Hladina laktátdehydrogenázy</b>
0 hladina laktátdehydrogenázy není zvýšena
1 hladina laktátdehydrogenázy je zvýšená

**Tabulka 3: TNM klasifikace kategorie M, LDH**

Převzato z TNM klasifikace, 8. vydání 2018. (9)

**Rozdělení do klinických stádií**

0	pTis N0M0
IA	pT1a/1b N0M0
IB	pT2aN0M0
IIA	pT2bN0M0, pT3aN0M0
IIB	pT3bN0M0, pT4aN0M0
IIC	pT4bN0M0
III	jakékoliv pT N1,N2,N3M0
IV	jakékoli T jakékoli N M1 (a měkké tkáně, LU, b plíce, c viscerální orgány mimo CNS, d postižení CNS)

**Tabulka 4: Rozdělení do klinických stádií**

Převzato z TNM klasifikace, 8. vydání 2018. (9)

**1.1.8 Prognostické faktory**

Mezi prognostické znaky zahrnujeme klasifikaci podle Breslowa, jedná se o tloušťku nádoru v milimetrech, klasifikaci podle Clarka (hloubka invaze), která nemá prognostický význam u melanomů o tloušťce nad 1mm. Dále charakter a lokalizace metastáz (viscerální ložiska versus kůže či postižení lymfatických uzlin), zvýšená hodnota laktátdehydrogenázy, mikroskopické postižení sentinelových uzlin. Další nepříznivé prognostické faktory jsou lokalizace melanomu v oblasti trupu, počet mitóz na mm<sup>2</sup>, vaskulární a lymfatická invaze, mužské pohlaví, věk nad 50 let. Navzdory přítomnosti těchto prognostických znaků, chování melanomu je značně variabilní a metastázy se mohou objevit i několik desítek let po excizi primárního nádoru. Studium dalších molekulárně prognostických znaků je předmětem výzkumu. (6,9)

**1.1.9 Prediktivní faktory a molekulární diagnostika**

Mezi prediktivní znaky zařazujeme mutaci BRAF a KIT.

## **BRAF mutace**

Melanomy s přítomností mutace BRAF V600 s typickým podtypem V600E tvoří přibližně 40-50% melanomů. Mutace BRAF bývá pozitivní u mladších pacientů s četnými melanocytárními névy. Tento typ melanomu bývá lokalizován na částech těla exponovaných slunečnímu záření (trup, horní partie končetin). Jedná se o prediktivní faktor pro podání BRAF a MEK inhibitorů. Pro hodnocení BRAF mutace je vhodnější testovat metastázu než primární nádor, je to z důvodu vysoké diskordance mezi přítomností BRAF mutace v primárním nádoru a v jeho metastázách.

## **NRAS mutace**

Mutace NRAS je druhou nejčastější mutací, je přítomná u 15-20% melanomů. Tento typ mutace je typický pro melanomy vyskytující se u starších pacientů, v oblastech chronicky exponovaných slunečnímu záření (hlava, krk, končetiny). Testování NRAS nemá prognostický ani prediktivní význam. Přítomnost NRAS mutace bývá někdy spojována s agresivnějším onemocněním, je častá u nodulárního melanomu.

Přítomnost mutace BRAF vylučuje současně přítomnost mutace NRAS.

## **KIT mutace**

Mutace KIT se vyskytuje zejména u slizničních nebo akrolentiginózních melanomů. Vznik těchto nádorů nelze spojovat s expozicí UV záření. (10)

### **1. 1. 10 Diagnostický postup**

Základem je podrobné klinické vyšetření pacienta dermatoskopem, či pomocí digitální dermatoskopie s možností pořízení fotodokumentace a následného vyhodnocení lézí. Při klinickém vyšetření se řídí dermatolog ABCDEF pravidlem. Suspektní léze zpravidla vykazující následující znaky A (asymmetry) asymetrie, B (border irregularity) nepravidelné okraje, C (colour) změny pigmentace, D (diameter) průměr nad 5 mm, E (enlargement) zvětšování léze, F (funny-looking) podivný vzhled.

Pokud je při klinickém vyšetření zjištěn melanom, je indikováno kompletní odstranění nádoru. Pokud není diagnóza jistá, provádí se neširoká totální excize primárního nádoru s lemem zdravé tkáně 1 až 3 mm, lem nesmí být širší pro riziko změny odtoky lymfy a následné ovlivnění detekce sentinelové uzliny. Další postup se řídí stanoveným stadiem onemocnění.

Stadium IA po odstranění melanomu je indikována dispenzarizace. U stadia IB a vyšším se provádí vyšetření sentinelové uzliny. Při postižení sentinelové uzliny je indikována exenterace postižené lymfatické oblasti. Pacienti ve stadiu IIC – III mají horší prognózu onemocnění a riziko progresu choroby je velké. Kromě odstranění primárního nádoru a postižených lymfatických uzlin je indikováno doplnění kompletního stagingu onemocnění k vyloučení přítomnosti vzdálených metastáz. Provádí se buď PET/CT vyšetření včetně CNS nebo CT hrudníku, břicha a malé pánve.

Dále se stanovuje hladina laktátdehydrogenázy, zvýšená hladina je negativní prognostický marker, protein S100. Vyšetření mutace BRAF je primárně indikováno u pacientů ve stadiu III nebo IV. (4,6)

### **1. 1. 11 Terapie**

Základem pro stanovení správné léčebné strategie je znát stadium onemocnění, dle pokročilosti indikujeme vyšetření sentinelové uzliny eventuálně doplnění stagingu a vyšetření dalších molekulárně biologických znaků (BRAF, NRAS, KIT), důležitá je těsná spolupráce mezi dermatologem, patologem a klinickým onkologem. Klíčový pro léčbu metastatického onemocnění byl rok 2011, kdy do léčby onemocnění s dříve infaustní prognózou vstoupila imunoterapie a cílená léčba. V současné době máme k dispozici cílené léky (BRAF a MEK inhibitory), checkpoint inhibitory (nivolumab, pembrolizumab, ipilimumab) a dále probíhá celá řada klinických studií.

Léčba metastatického melanomu pro onkologii jako takovou představuje důležitý **bod zvratu**, protože imunoterapie metastatického maligního melanomu se stala modelovým příkladem využití imunoterapie pro léčbu nádorového onemocnění. S nadsázkou můžeme říct, že léčba metastatického maligního melanomu byla jakýmsi „průkopníkem“ imunoterapie na poli onkologie. V následující kapitole se blíže věnuji jednotlivým preparátům a klíčovým klinickým studiím. Léky uvádím v pořadí, ve kterém se postupně dostávaly do terapie maligního melanomu.

#### **1.1.11.1 Léčba časných stádií**

Při podezření na maligní melanom se nejprve provádí neširoká excize, na základně histologického nálezu se poté indikuje reexcize jizvy a vyšetření sentinelové uzliny.

U pacientů **stadia IA** (nádor o tloušťce do 1mm) se provádí pouze široká excize a následně se pacient dispenzarizuje.

U pacientů ve **stadiu IB a II** se doplňuje široká excize a vyšetření sentinelové uzliny. Pokud je sentinelové uzlina negativní indikujeme dispenzarizaci. V případě pozitivního nálezu sentinelové uzliny, dochází ke změně stagingu ze stadia IB a II na stadium III, je indikována disekce mízních uzlin. U pacientů stádia IIB a IIC je riziko recidivy vysoké a zvažujeme podání adjuvantní léčby. (6)

V adjuvantní léčbě se více než 30 let užíval **Interferon alfa**, i přes velké zkušenosti s tímto preparátem nepanovala shoda stran dávkovacích schémat, nebyly známy žádné prediktivní faktory, řada pacientů adjuvantní léčbu pro závažné nežádoucí účinky nedokončila a k prodloužení celkového přežití došlo jen u malé části nemocných. (11) V roce 2014 se začala užívat pegylovaná forma interferonu alfa, jejíž výhodou je podávání jedenkrát týdně.

U pacientů **ve stadiu III** se provádí široká excize a eventuálně disekce spádových lymfatických uzlin. V adjuvantním podání se užívá kombinace BRAF a MEK inhibitoru (dabrafenib, trametinib) či checkpoint inhibitory (nivolumab, pembrolizumab). Je třeba zdůraznit, že se jedná o léčbu systémového onemocnění a cílem podání adjuvantní léčby je zejména zabránění systémového relapsu onemocnění. Délka trvání adjuvantní léčby je maximálně 12 měsíců.

Na základě úspěchu **ipilimumabu** u pacientů s metastatickým onemocněním, se dál zkoumal potenciál ipilimumabu v adjuvantním podání. Podání ipilimumabu v adjuvantní indikaci bylo schváleno na základě studie EORTC 18071. (12) Na základě výsledků dalších klinických studií byl však ipilimumab v adjuvanci nahrazen účinnějšími a méně toxickými PD-1 inhibitory.

**Nivolumab** prokázal svoji účinnost v adjuvantním podání na základě studie CheckMate 238, kde prokázal vyšší účinnost a lepší bezpečnostní profil oproti ipilimumabu. Ve studii bylo randomizováno celkem 906 pacientů, kteří byli léčeni buď nivolumabem v dávce 3mg/kg každé 2 týdny nebo ipilimumabem v dávce 10mg/kg podávaného každé tři týdny první 4 dávky a dále pak každých 12 týdnů celkem po dobu jednoho roku. Primárním cílem bylo přežití bez recidivy. Analýza po 18- měsíčním sledování ukázala, že míra přežívání bez recidivy byla významně vyšší v rameni s nivolumabem 66,4 % (95 % CI;61,8-70,6) ve srovnání s ipilimumabem 52,7 % (95 % CI;47,8-57,4). Nivolumab redukoval riziko rekurence o 35 % ve srovnání s ipilimumabem HR 0,65 (95 % CI;0,53-0,8;  $p < 0,0001$ ). Studie tedy prokázala statisticky významné zlepšení přežití bez relapsu u nemocných léčených

nivolumabem. (13) Nivolumab se podává v adjuvantním podání u pacientů stadia III nebo IV stadia po kompletní resekci v dávce 240mg á 2 týdny (maximálně 12 měsíců). (14)

Další PD-1 inhibitor, který se uplatňuje v adjuvantním podání je **pembrolizumab**.

V registrační studii KEYNOTE-054 pembrolizumab prokázal prodloužení přežití bez relapsu oproti placebo, HR 0,56; (98,4 % CI, 0,43-0,74). (15) Pembrolizumab se podává pacientům ve stádiu III po kompletní resekci 200mg á 3 týdny (maximální doba léčby 12 měsíců) nebo 400mg á 6 týdnů (maximální doba léčby 12 měsíců). (14)

Mezi dalšími léky studovanými léky v adjuvantní podání nechyběly ani BRAF a MEK inhibitory. Nejprve byla srovnávána monoterapie vemurafenibem oproti placebo, v této studii nebyl dosažen primární cíl (přežití bez nemoci). (16) Naopak kombinovaná cílená terapie **dabrafenibem a trametinibem** ve studii COMBI-AD prokázala účinnost této kombinace v adjuvantním podání u pacientů s BRAF mutovaným melanomem. (17) Pacienti užívají dabrafenib 150mg 2x denně a trametinib 2mg 1x denně maximálně po dobu 12 měsíců. (14)

Nesmíme opomenout roli **radioterapie** u pacientů po resekci ve stádiu I a II. Zejména v přítomnosti rizikových faktorů (nemožnost provedení radikální excize, lokalizace na hlavě a krku, vertikální rozměr nad 4 mm se satelitními lézemi, či ulcerací) snižuje radioterapie riziko lokální recidivy, ve stádiu III má význam imunoterapie nebo cílená terapie k zabránění vzniku vzdálené diseminace. (6)

### **1.1.11.2 Léčba metastatického onemocnění**

Prognóza pacientů s metastatickým onemocněním je stále, i přes pokroky v systémové léčbě vážná. V hlavní míře je prognóza dána lokalizací a počtem vzdálených metastáz a mírou odpovědi na léčbu. Metastatický melanom je jedním z nejvíce imunogenních nádorů. I přesto, že se jedná o chemorezistentní a radiorezistentní onemocnění, ještě před nedávnem představovala chemoterapie dakarbazinem jednu z mála možností systémové léčby pacientů s metastatickým onemocněním.

#### **Dakarbazin**

V léčbě metastatického melanomu se zkoušela celá řada cytostatik nejen dakarbazin, ale i temozolomid, cisplatina, karmustin, lomustin, kombinované režimy CVD (cisplatina, vinblastin, dakarbazin), BOLD (bleomycin, vinkristin, lomustin, dakarbazin), CBDT (cisplatina, karmustin, dakarbazin a tamoxifen), dále kombinace s interferonem alfa. Dakarbazin patří mezi alkylační cytostatika, FDA byl schválen v roce 1975. I přes nízkou

účinnost (neprokázal vliv na celkové přežití) se pro terapeutické zoufalství stal dakarbazin téměř na dobu 30 let zlatým standardem pro léčbu metastatického onemocnění. Odpověď na monoterapii dakarbazinem se pohybovala mezi 5,3 % až 28 % (průměr 15,3 %). (18,19) Dávky dakarbazinu v monoterapii se pohybují mezi 200-250mg/m<sup>2</sup>/den podávaného první až pátý den cyklu, či 1000mg/m<sup>2</sup> podaného první den cyklu. Cyklus se opakuje každé tři týdny. Mezi časté nežádoucí účinky patří hematologická toxicita (leukopenie, trombocytopenie, lehká anémie), dále nauzea, zvracení, flu-like syndrom, vzácně byly popsány případy hepatotoxicity způsobené trombózou jaterních žil, doprovázenou nekrózou hepatocytů a jaterním selháním. (19)

### **Interleukin-2**

Prvním lékem, který dokázal malé skupině pacientů navodit i dlouhodobě trvající kompletní remisi byl vysokodávkový interleukin-2. IL-2 je cytokin objevený v roce 1976 s pleiotropním účinkem na imunitní systém. FDA jej schválila pro léčbu metastatického maligního melanomu v roce 1998, na základě studie s 270 pacienty léčenými vysoce dávkovaným IL-2, objektivní odpověď byla zaznamenána v 16 % (17 kompletních a 26 parciálních odpovědí). Limitující ovšem byly závažné nežádoucí účinky, 6 pacientů zemřelo na komplikace související s léčbou, nejčastější příčinou úmrtí byla sepsa. O léčbě vysokodávkovým IL-2 můžeme s nadsázkou říct, že se jedná o dost dobrodružnou a pro pacienta nebezpečnou léčbu s nejistým výsledkem. (20, 21)

### **Ipilimumab**

Ipilimumab je lidská monoklonální IgG1 anti CTLA-4 protilátka. Registrační studie MDX010-20 proběhla v roce 2010, kde ipilimumab jako první lék prokázal vliv na prodloužení celkového přežití. Ve studii bylo zařazeno celkem 676 pacientů, pacienti byli randomizováni do tří ramen: ipilimumab s vakcínou gp 100 (n= 403) samotný ipilimumab (n = 137), gp100 (n = 166). Ipilimumab byl podáván v dávce 3mk/kg v infuzi po dobu 90min. V rameni s kombinovanou terapií byl medián celkového přežití 10 měsíců, v rameni s ipilimumabem v monoterapii 10,1 měsíce, v rameni s gp100 6,4 měsíce. Objektivní odpověď byla zaznamenána u 10,9 % v rameni s ipilimumabem samotným, a u dalších 17,5 % pacientů dosáhlo stabilizace onemocnění. Poprvé byly popsány imunitně podmíněné nežádoucí účinky a jejich terapie kortikosteroidy, infliximabem a mycofenolát mofetilem. (22)

V roce 2011 přichází druhá velká studie první linie, která srovnala dakarbazin s ipilimumabem. Zařazeno bylo celkem 502 pacientů dosud neléčených pro metastatický maligní melanom, pacienti byli randomizováni do ramene s ipilimumabem v dávce (10mg/kg) plus dakarbazin (850mg/m<sup>2</sup>) a do ramene s dakarbazinem (850mg/m<sup>2</sup>) a placebem. Primárním cílem bylo celkové přežití. Medián celkového přežití byl signifikantně delší v rameni s ipilimumabem a dakarbazinem (11,2 měsíce versus 9,1 měsíce). Četnost léčebných odpovědí byla pro kombinovanou léčbu 15,2 %, v rameni s dakarbazinem samotným 10,3 %. Nežádoucí účinky stupně 3 a 4 se objevily až u 56 % v rameni s ipilimumabem a dakarbazinem oproti 27,5 % pro dakarbazin a placebo. Nejčastějším nežádoucím účinkem byla hepatitida v rameni s kombinovanou léčbou. (23)

Ipilimumab se při monoterapii podává v dávce 3mg/kg po dobu 90minutové infuze každé tři týdny, celkem se podávají čtyři dávky. U kombinovaného režimu s nivolumabem se podává 3mg/kg ipilimumabu a 1mg/kg nivolumabu intravenózně v třítydenním intervalu, podávají se celkem 4 dávky, poté následuje monoterapie nivolumabem 240mg každá dva týdny (odstup od poslední dávky kombinace je 3 týdny) nebo 480mg podávaných jednou měsíčně (odstup od poslední dávky kombinovaného režimu je v tomto případě 6 týdnů). (14) Nežádoucí účinky imunoterapie jsou shrnuty v samostatné kapitole.

Další anti CTLA-4 protilátkou je **tremelimumab**, který zkoumá celá řada klinických studií u pacientů s melanomem, karcinomem žaludku, karcinomem močového měchýře, kolorektálním karcinomem nebo mesoteliomem. (24)

## **Nivolumab**

Nivolumab je plně humanizovaná IgG4 monoklonální protilátka proti PD-1 receptoru. Studie první fáze byly zahájeny v roce 2006 a již 22. prosince 2014 byl schválen FDA pro léčbu metastatického maligního melanomu.

Studie CheckMate 037 prokázala účinnost nivolumabu v 2. linii léčby. CheckMate-037 byla multicentrická randomizovaná studie III. fáze, která hodnotila účinek nivolumabu u pacientů předléčených ipilimumabem i BRAF inhibítorem v přítomnosti BRAF mutace. V této studii bylo zařazeno 405 pacientů, kteří byli randomizováni v poměru 2:1 mezi léčbu nivolumabem a chemoterapii dle volby investigátora (dakarbazin 1000mg/m<sup>2</sup> nebo karboplatina AUC 6 plus paklitaxel 175mg/m<sup>2</sup>). Hlavní stratifikační kritéria zahrnovala BRAF status, PD-L1 expresi a odpověď na předchozí léčbu ipilimumabem. Primárním cílem studie bylo ORR (objective response rate) a celkové přežití, které bylo hodnocené v době, kdy 120 pacientů léčených



nivolumabem bylo sledováno minimálně 24 týdnů. ORR bylo 31,7 % u nemocných léčených nivolumabem proti 10,6 % u pacientů léčených chemoterapií. Nivolumab tedy prokázal významně vyšší účinnost oproti chemoterapii a to bez ohledu na délku odpovědi po podání ipilimumabu, BRAF status či PD-L1 expresi. V této studii nebyl potvrzen významný rozdíl v celkovém přežití, ale tento fakt může být ovlivněn tím, že až 40,6 % (54 pacientů), kteří ukončili léčbu v rameni s chemoterapií pro progresi onemocnění, byli následně léčeni pembrolizumabem. Dále ve skupině pacientů léčených nivolumabem byl zaznamenán vyšší počet pacientů s prognosticky nepříznivými faktory (mozkové metastázy, vyšší hodnota laktátdehydrogenázy). (25)

Studii, která srovnávala účinnost nivolumabu ve srovnání s dakarbazinem v 1. linii léčby, byla randomizovaná studie III. fáze CheckMate 066, ve studii bylo celkem 418 nepředléčených pacientů s BRAF nemutovaným metastatickým maligním melanom. Nivolumab byl podáván v dávce 3mg/kg po dobu 60 minutové infuze každé 2 týdny, dakarbazin byl podáván v dávce 1000mg/m<sup>2</sup> každé tři týdny. Randomizace byla stratifikována podle PD-1 stavu a metastatického stádia (M0, M1a, M1b a M1c). Ve studii bylo 74 % s primárně kožním melanomem, 11 % mělo slizniční melanom. Stran PD-L1 pozitivitu bylo jako PD-L1 pozitivních hodnoceno 35 % pacientů (exprese nad 5 %). Primárním cílem studie bylo hodnocení celkového přežití, po prvním roce přežívalo 72,9 % nemocných léčených nivolumabem a 42,1 % léčených dakarbazinem. Medián přežití bez progresu byl 5,1 měsíce pro nivolumab a 2,2 měsíce pro dakarbazin. Objektivní léčebné odpovědi bylo dosaženo u 40 % léčených v rameni s nivolumabem a 13,9 % léčených dakarbazinem. Na základě výsledku studie nivolumab redukoval riziko úmrtí o 58 %, HR 0,42 (99,79 % CI;0,25-0,73, p<0,0001), prokázal významné zlepšení celkového přežití a přežití bez progresu ve srovnání s dakarbazinem a to bez ohledu na PD-L1 status. (26)

CheckMate 067 byla studie která proti sobě postavila ipilimumab a nivolumab. Jednalo se o trojramennou studii (ipilimumab vs. ipilimumab a nivolumab vs. nivolumab). Do této studie bylo zahrnuto 945 pacientů dosud neléčených pro metastatické onemocnění. Stratifikační kritéria zahrnovala PD-L1 expresi (pod 5 % vs. nad 5 %), BRAF statusu a M stadia dle AJCC (American Joint Committee on Cancer). Při minimálním sledování více než 60 měsíců nebyl medián celkového přežití v rameni s kombinovanou imunoterapií dosažen, v rameni s nivolumabem byl 36,9 měsíce v rameni s ipilimumabem 19,9 měsíce. Celkové přežití po pěti letech bylo 52 % ve skupině kombinované imunoterapie, 44 % v rameni s nivolumabem a 26 % v rameni s ipilimumabem. (27, 28)

Tyto výsledky ukazují, že kombinovaná léčba ipilimumab plus nivolumab je účinnější než samotná monoterapie nivolumabem či ipilimumabem. Kombinovaná imunoterapie je však také toxičtější. Nežádoucí účinky stupně 3 až 4 byly pozorovány až u 59 % pacientů léčených kombinovanou imunoterapií. (28) Je třeba si uvědomit, že při užití kombinovaného režimu se mohou imunitně podmíněné nežádoucí účinky objevit u více orgánových systémů najednou, což je u monoterapie vzácné. Právě z tohoto důvodu byly zkoumány jiné dávkovací schémata, studie CheckMate-511 prokázala lepší bezpečnostní profil a stejnou účinnost u dávkování ipilimumab 1mg/kg a nivolumab 3mg/kg. (29)

### **Pembrolizumab**

Pembrolizumab je humanizovaná monoklonální protilátka proti receptoru programované buněčné smrti PD-1. Účinnost pembrolizumabu oproti chemoterapii (dakarbazin, temozolomid, paklitaxel či karboplatina) potvrdila studie Keynote-002, populace pacientů byla předléčena ipilimumabem v případě pozitivity BRAF mutace i BRAF inhibítorem a MEK inhibítorem. Výsledky potvrdily významné zlepšení přežití bez progresu v rameni s pembrolizumabem v různém dávkovacím schématu (34 % u 2mg/kg, 38 % u 10mg/kg a 16 % u chemoterapie), významně vyšší byla i četnost léčebných odpovědí (21 % u 2mg/kg, 26% u 10mg/kg a 4 % u chemoterapie). (30) Superiorita pembrolizumabu oproti ipilimumabu byla prokázána ve studii Keynote-006, v této studii bylo zařazeno 834 pacientů, pembrolizumab byl podáván každé dva týdny (n = 279), každé tři týdny (n = 277), v rameni s ipilimumabem bylo zařazeno 279 pacientů. Po mediánu sledování 57,7 měsíce byl medián celkového přežití 32,7 měsíce v ramenech s pembrolizumabem a 15,9 měsíce v rameni s ipilimumabem, HR 0,73, (95 % CI 0,61-0,88, p = 0,00049). Medián přežití bez progresu byl 8,4 měsíce v ramenech s pembrolizumabem oproti 3,4 měsíce v rameni s ipilimumabem. (31)

Pembrolizumab se podává v dávce 200mg ve třítýdenním intervalu nebo v dávce 400mg v šestitýdenním intervalu do progresu onemocnění. (14)

Kromě imunoterapie se od roku 2011 v léčbě maligního melanomu uplatňuje cílená léčba. Mezi BRAF inhibitory patří vemurafenib, dabrafenib a encorafenib.

### **Vemurafenib**

Vemurafenib je vysoce specifický inhibitor BRAF kinázy, která je důležitou součástí signální dráhy RAS-RAF-MEK-ERK a MAPK (mitogen-aktivované proteinkinázové signální dráhy). Účinnost vemurafenibu u pacientů s BRAF mutovaným melanomem potvrdila studie BRIM-3. Ve studii bylo zařazeno 675 pacientů, medián celkového přežití byl významně delší

v rameni s vemurafenibem (13,6 měsíce) než u dakarbazinu (9,7 měsíce), HR 0,81 (95 % CI 0,67-0,98); p = 0,03. (32) Nejčastěji se jedná o BRAF mutaci V600E, méně často V600K. Tato léčba vede k velmi rychlé protinádorové odpovědi, ale také k rozvoji rezistence (reaktivací MAPK nebo poruchami v jiných signálních drahách). Léčbu BRAF inhibitorem indikujeme u pacientů s velmi rychle progredujícím onemocněním, kde potřebujeme dosáhnout rychlé odpovědi, mezi nežádoucí účinky patří vznik spinocelulárních karcinomů a keratoakantomů. Vemurafenib se podává v dávce 960mg 2x denně. (14)

### **Dabrafenib**

Dabrafenib je selektivní inhibitor BRAFV600E/K kinázy. Účinnost prokázala studie BREAK-3, studie zahrnovala 250 nepředléčených pacientů stadia III a IV. Medián přežití bez progresu byl u dabrafenibu 5,1 měsíce a u dakarbazinu 2,7 měsíce, HR 0,30 (95 % CI 0,18-0,51; p <0,0001), dabrafenib tedy snížil riziko progresu oproti dakarbazinu o 70 %. (33) Dabrafenib se podává v dávce 150mg 2x denně. (14) Mezi časté nežádoucí účinky patří bolesti hlavy, bolesti kloubů, kožní hyperkeratóza, papilomatóza, fotosenzitivita a febrilie. (33)

### **Kombinace BRAF inhibitorů s MEK inhibitory**

Kombinace BRAF inhibitorů s MEK inhibitory vede k prodloužení celkového přežití a doby do progresu, k oddálení vzniku rezistence a také k nižší toxicitě. Účinnost kombinované cílené terapie potvrdila studie COMBI-d, ve studii bylo 423 pacientů, kteří byli léčeni v rameni s kombinovanou terapií (dabrafenib plus trametinib) oproti monoterapii dabrafenibem. Třileté celkové přežití bylo 44 % u pacientů s kombinovanou léčbou oproti 32 % pacientům léčených dabrafenibem v monoterapii. (34) Mezi MEK inhibitory řadíme **trametinib**, který je reverzní inhibitor MEK 1 a MEK 2, podává se 2mg 2x denně a kombinuje se s dabrafenibem. (14) Další MEK inhibitor je **kobimetinib**, který se podává společně s vemurafenibem, či **binimetinib**, který se podává s BRAF inhibitorem **encorafenibem**.

### **C-kit inhibitory**

U pacientů s přítomností aktivační mutace c-kit užíváme cílené **c-kit inhibitory** (imatinib 400mg 1x denně). Aktivační mutace c-kit je přítomná u 3 % melanomů, vyšší zastoupení je u melanomů slizničních a akrálních. (35)

### **Kombinace cílené léčby a imunoterapie**

Studie IMspire150 byla randomizovaná, dvojitě zaslepená, placebem kontrolovaná studie třetí fáze. Pacienti s mutací BRAF V600E byli rozděleni 1:1 do ramene s atezolizumabem

podáveném v 28denním cyklu s vemurafenibem a s kobimetinibem a do ramene s placebem s vemurafenibem a kobimetinibem. Atezolizumab/placebo byl přidán od druhého cyklu terapie. Při mediánu sledování 18,9 měsíce (IQR 10,4-23,8) bylo přežití bez progresse podle hodnocení zkoušejícího studie významně prodlouženo u atezolizumabu oproti kontrole (15,1 vs. 10,6 měsíce, HR 0,78; 95 % CI 0,63-0,97;  $p = 0,025$ ). Studie prokázala bezpečnost a tolerabilitu kombinované léčby stejně jako prodloužení doby do progresse onemocnění. (36)

### **Sekvence léčby**

U nepředlčených pacientů s metastatickým onemocněním v dobrém výkonnostním stavu je standardem první linie léčby. Pokud má pacient BRAF mutaci a rychle progredující onemocnění s velkou nádorovou náloží volíme kombinace BRAF a MEK inhibitoru s cílem rychle dosáhnout odpovědi, nevýhodou je časově omezená délka odpovědi v důsledku rozvoje rezistence. Další možností je monoterapie PD-1 inhibitorem (nivolumab/pembrolizumab) či kombinovaná imunoterapie, která dává naději na dlouhodobé přežití. Druhá linie léčby po selhání PD-1 inhibitorů u BRAF mutovaných pacientů zahrnuje kombinaci BRAF a MEK inhibitoru. Otázku ideální sekvence léčby u pacientů s maligním melanomem řeší řada klinických studií ( DREAMseq, SECOMBIT ). (37,38)

Pacienti, kteří byli adjuvantně léčeni kombinací BRAF a MEK inhibitoru, a u nichž následně došlo k progresi onemocnění, můžeme léčit v první linii imunoterapií. U pacientů léčených adjuvantně PD-1 inhibitorem, můžeme při progresi onemocnění a přítomnosti BRAF mutace, léčit kombinací BRAF a MEK inhibitoru. V případě nepřítomnosti BRAF mutace můžeme zvážit alternativní systémovou terapii či léčbu v rámci klinické studie.

## 1.2 Imunoterapie a její role v léčbě maligních onemocnění

Cílená imunoterapie se stala součástí moderní protinádorové léčby relativně nedávno. Navzdory tomu, že je nejmladší modalitou protinádorové terapie, rychlost s jakou se rozšiřuje spektrum indikací imunoterapie v kombinaci s ostatními modalitami protinádorové léčby je ohromující.

### 1.2.1 Historie imunoterapie

Vůbec první zmínka o regresi nádoru v souvislosti s infekcí je v literatuře zaznamenána již okolo roku 1320, kdy servitský mnich Peregrín Laziosi, který trpěl exulcerovaným nádorem tibie, prodělal těžkou infekcí a následně u něj došlo k úplné regresi tumoru. To byl zřejmě první dokumentovaný případ efektivity imunoterapie v onkologii. Tento světec se později stal patronem pro nemocné trpící rakovinou, AIDS a těhotné, je zajímavým faktem, že všechny tyto stavy spojuje imunosuprese. (39)

Později okolo roku 1868 byly publikovány první vědecké práce, které ukazovaly souvislost mezi těžkou bakteriální infekcí a regresí maligního onemocnění. Jako první německý lékař **Wilhelm Bush** zaznamenal ústup nádoru u pacienta po infekci erysipelem. (41)

Na začátku zájmu chirurga **Wiliama Bradley Coleyho** o nádory a jejich léčbu bylo úmrtí 17leté Elizabeth Dashiell, které trpěla sarkomem horní končetiny, jedinou dostupnou léčbou byla amputace, i přes tento zákrok následně došlo k progresi onemocnění do jater a plic a Bessie umírá o šest měsíců později s Coleym po boku. Tato smutná událost podnítila jeho další zájem o boj se zhoubnými nádory. Coley začal procházet starší případy pacientů s nádorem, až narazil na podivuhodný případ německého přistěhovalce Freda Steina z roku 1883. Fred Stein podstoupil několik resekcí nádoru v oblasti krku, vždy však došlo k lokální recidivě onemocnění, po posledním výkonu prodělal těžkou infekci, agens bylo identifikováno *Streptococcus pyogenes*, Fred Stein i bez antibiotické terapie, která ještě čekala na svoje objevení, sepsi přežil. Coley jej na základě popsaného případu vyhledal a zjistil, že je stále naživu, bez známek aktivity nádorového onemocnění. Tato kazuistika vedla Coleyho k hypotéze, že streptokoková infekce vedla k remisi onemocnění a začal uvažovat nad tím, že by bakterie cíleně podával pacientům s nádory. Prvním pacientem, na kterém Coley v době působení v New York Cancer Hospital svoji hypotézu ověřil, byl italský přistěhovalec jménem Zola trpící zhoubným nádorem krku. Coley mu přímo do tumoru opakovaně vtíral bakterii *Streptococcus pyogenes*, u pacienta došlo k rozvoji těžké infekce, kterou následovala regrese tumoru. Tuto metodu Coley aplikoval na tisíce pacientů, bohužel v jeho době nebyla

známa role imunitního systému a tak i když léčba fungovala zejména u sarkomů, nebyl znám mechanismu jejího účinku. Řada odborníků včetně Jamese Ewinga se stavěla ke Coleyho metodám skepticky, po zavedení radioterapie a chemoterapie do léčby onkologických pacientů, se Coleyho toxiny (*Streptococcus pyogenes*, *Serratia marcescens*) v léčbě nádorů přestaly uplatňovat. William Bradley Coley předběhl svou dobu o více než 100 let, právem je považován za otce imunoterapie. (39,40,41)

V roce 1957 **Sir MacFarlane Burnet** formuloval hypotézu imunitního dohledu, roli imunitního systému je rozpoznat pro tělo potenciálně nebezpečné nádorové buňky a tyto buňky zničit pomocí jak vrozených, tak získaných mechanismů imunitního systému. (42)

V dnešní době ji nahradila **imunoeditační teorie** (teorie 3 E). Tato teorie rozlišuje tři fáze v boji proti nádoru. Fáze eliminace (*Elimination*) nádorové buňky jsou rozpoznány a imunitním systémem zničeny, nádorové onemocnění tedy vůbec nepropukne. Fáze ekvilibria (*Equilibrium*) imunitní systém a nádor žijí v jakési rovnováze, navenek se nádorové onemocnění neprojeví, tento stav může trvat několik desítek let. Fáze úniku (*Escape*) nádorové buňky uniknou imunitnímu systému a dojde k rozvoji nádorového onemocnění. (43,44)

Od roku 1976 se u pacientů s karcinomem močového měchýře začala uplatňovat v adjuvantním podání, po transuretrální resekcii instilace **BCG vakcíny** (*Bacillus Calmette-Guérin*). (45)

Dalším mezníkem bylo zavedení **interleukinu-2** do léčby solidních nádorů. Tato terapie získala využití zejména u chemorezistentních nádorů jako maligní melanom a karcinom ledviny. (46)

Kirkwood a kolektiv rozdělil vývoj imunoterapie v posledních 40. letech do tří fází: **fáze nadšení** (1978 -1985), **fáze skepse** (1985- 1997) a **fáze znovuzrození**, jejíž počátek klade do roku 1997 (zavedení rituximabu do praxe). (47) Podle mého názoru fázi znovuzrození imunoterapie představuje rok 2011.

Od roku 2011 do klinické praxe pronikají **checkpoint inhibitory**. Imunoterapie se vedle chirurgické léčby, radioterapie, chemoterapie a cílené léčby stává pátým pilířem v terapii nádorových onemocnění. Díky účinnosti napříč celým spektrem nádorů se rychle rozšiřuje množství indikací. (48) Významnost objevu checkpoint inhibitorů v terapii nádorových

onemocnění reprezentuje fakt, že již za sedm let po uvedení do praxe obdrželi James P. Allison a Tasuku Honjo Nobelovou cenou za fyziologii a medicínu.

Zavedení checkpoint inhibitorů do onkologie bezesporu představuje **bod zvratu**. Jsme na začátku nové éry v terapii nádorových onemocnění.

## 1.2.2 Klasifikace imunoterapie

### Aktivní specifická imunoterapie

Do této skupiny zařazujeme vakcíny. V onkologii se uplatňují zejména v primární prevenci karcinomu děložního čípku. V současné době je na trhu celá řada preparátů od bivalentních až po nonavalentní vakcíny (*Gardasil*). Dále sem můžeme zahrnout i očkování proti hepatitidě B. (49)

### Aktivní nespecifická imunoterapie

Cílem tohoto typu imunoterapie je nespecificky aktivovat imunitní systém. Příkladem může být podání BCG vakcíny v terapii časných forem karcinomu močového měchýře, podání cytokinů (IL-2, IFN- $\alpha$ ) nebo mifamurtidu u pacientů s osteosarkomem. Nespecifická imunoterapie ovlivňuje zejména mechanismy nespecifické (vrozené imunity) tedy monocyty a makrofágy. (21, 45)

V dnešní době víme, že existují dva typy makrofágů M1, M2. Makrofágy M1 vznikají pod vlivem prozánětlivého cytokinu interferonu- $\gamma$  a produkují IL-12, který stimuluje T-lymfocyty a NK buňky. M1 makrofágy tedy podporují zánět a mohou se tím podílet na eliminaci nádorových buněk. Naopak M2 makrofágy vznikají pod vlivem cytokinů IL-4 a IL-13, produkují protizánětlivé cytokiny IL-10 a TGF- $\beta$ . M2 makrofágy podporují hojení ran a regeneraci tkání. Právě tento typ makrofágů infiltruje nádory a tím, že napomáhají neoangiogenezi, mohou podporovat růst nádoru a metastazování. (50, 51) Regulační T-lymfocyty (TREG) ovlivňují diferenciaci M1 typu makrofágu, přítomného v časných fázích vývoje nádoru na M2 typ přítomného v pozdějších fázích růstu za přítomnosti nádorové hypoxie, právě M2 makrofágy se mohou podílet na podpoře růstu nádoru. (52) Přítomnost M2 makrofágů v nádoru je asociována se špatnou prognózou. (53) Tento jev demonstruje na **duální roli imunitního systému** v průběhu vývoje nádorového onemocnění.

## **Pasivní imunoterapie**

Mezi pasivní imunoterapii zařazujeme aplikaci monoklonálních protilátek. Od roku 1997 se užívá chimérická monoklonální protilátka Rituximab (anti-CD20) v léčbě nonHodgkinských lymfomů a chronické lymfatické leukémie. (54) Alemtuzumab (anti-CD52) se užívá v terapii chronické lymfatické leukémie a T-lymfomů. Dále sem můžeme zařadit například trastuzumab, pertuzumab (anti-HER2) humanizované monoklonální protilátky užívané pro léčbu pacientek s HER-2 pozitivním karcinomem prsu či žaludku, pro léčbu kolorektálního karcinomu se užívá panitumumab a cetuximab. Kromě přímé inhibice se uplatňuje i cytotoxicita zprostředkovaná buňkami. (49)

## **Adoptivní imunoterapie**

Jedná se o aplikaci lymfocytů, které jsou aktivovány a namnoženy ex vivo. Lymfocyty se mohou izolovat přímo z krve (LAK buňky) či z nádorového infiltrátu (TIL buňky). Dále sem můžeme zařadit aplikaci CAR T-lymfocytů využívající se zejména v hematologii.

## **Checkpoint inhibitory**

Do této kategorie zařadíme již zmiňované protilátky ovlivňující regulační mechanismy imunitní odpovědi.

### **1.2.3 Mechanismus účinku**

Checkpoint inhibitory inhibují inhibiční receptor (CTLA-4, PD-1) na T-lymfocytech nebo přímo v nádoru (PD-L1/L2). Dochází k prolomení imunitní tolerance vůči nádoru. Funkcí CTLA-4 receptoru je regulace časně fáze aktivace T-lymfocytů v lymfatických uzlinách, jeho fyziologickou funkcí je zabránit vzniku autoimunitních onemocnění. Ipilimumab působí spíše na úrovni lymfatické uzliny, kde blokováním inhibičního receptoru CTLA-4 zabraňuje inaktivaci T-lymfocytů. (55)

Primární funkcí PD-1 receptoru je regulace T-lymfocytů během efektorové fáze imunitní reakce v periferních tkáních. Tento receptor může tlumit aktivitu nádorově specifických T-lymfocytů v mikroprostředí nádoru. Nivolumab, pembrolizumab, atezolizumab, durvalumab a avelumab brání interakce mezi PD-1 a PD-L1/L2 přímo v nádorové tkáni. (56)

Nádorové buňky mohou exprimovat dva ligandy (PD-L1, PD-L2) a s jejich pomocí uniknout před imunitní reakcí. Tím, že dojde k navázání PD-L1 na PD-1 receptor na T-lymfocytech



dochází k jejich inaktivaci. Míra exprese PD-L1 se liší napříč nádorovým spektrem pravděpodobná je variabilita i mezi jednotlivými metastázami u téhož pacienta. (57)

#### **1.2.4 Indikace**

Mezi léky patřící do checkpoint inhibitorů řadíme ipilimumab, tremelimumab (anti-CTLA-4), dále protilátky proti receptoru programované buněčné smrti nivolumab, pembrolizumab a cemiplimab (anti-PD-1), atezolizumab, durvalumab, avelumab (anti-PD-L1), řada dalších preparátů je zkoušena v rámci klinických studií. V současnosti se neustále rozšiřuje spektrum indikací checkpoint inhibitorů, nejen v rámci první a druhé linie léčby, ale i v adjuvantním podání. Mezi nádorová onemocnění, kde checkpoint inhibitory zásadně změnily prognózu onemocnění, patří maligní melanom, karcinom ledviny, uroteliální karcinom, nemalobuněčný karcinom plic, karcinom z Merkelových buněk, Hodgkinův lymfom, nádory hlavy a krku, triple negativní karcinom prsu, kolorektální karcinom s vysokou mikrosatelitovou nestabilitou. (58) Imunoterapie se nepodává jen jako monoterapie, ale jako velmi účinné se jeví kombinované režimy, ipilimumab a nivolumab mají odlišný mechanismus účinku, působí synergicky a výrazně zvyšují počet objektivních odpovědí. (28) Dále probíhají studie kombinující imunoterapii s chemoterapií, při kombinaci imunoterapie a radioterapie byl popsán abskopální efekt, imunoterapie se také využívá i v kombinaci s chirurgickou léčbou v adjuvantním podání.

#### **1.2.5 Nežádoucí účinky checkpoint imunoterapie**

Vzhledem k odlišnému mechanismu účinku imunoterapie, na rozdíl od konvenční chemoterapie, se dají očekávat i odlišné nežádoucí účinky. Prolomení tolerance vůči nádoru však může být provázeno prolomením tolerance vůči normálním tkáním. Takto může dojít k napadení zdravých tkání T-lymfocyty, což může vést k nežádoucím účinkům napodobujícím autoimunitní onemocnění. Proto název imunitně podmíněné nežádoucí účinky (immune-related adverse events, ir-AEs). Imunitně podmíněné nežádoucí účinky mohou být i fatální, pokud nedojde k včasnému zahájení léčby systémovými kortikosteroidy. Ale vůbec nejdůležitější je vědět, že imunitně podmíněné nežádoucí účinky vůbec existují. Imunoterapie se používá relativně krátkou dobu, je třeba dbát na dostatečnou osvětu mezi lékaři neonkology, kteří se mohou s pacienty léčenými imunoterapií setkat při vzniku akutních komplikací. Pro svůj mechanismus účinku má ipilimumab vyšší četnost imunitně podmíněných nežádoucích účinků. V současné době se užívají kombinované režimy imunoterapie, na základě klinických studií víme, že při kombinované imunoterapii jsou

imunitně podmíněné účinky stupně 3 až 4 přítomny až u 59 % nemocných. Typické je postižení více než jednoho orgánu. (28) Aktuálně se imunitně podmíněné nežádoucí účinky klasifikují podle NCI-CTCAE verze 5.0 (National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events version 5.0). Mezi imunitně podmíněné nežádoucí účinky zahrnujeme kožní, gastrointestinální, hepatopatie, endokrinopatie a některé méně časté jako například neurologické či hematologické imunitně podmíněné nežádoucí účinky. (59)

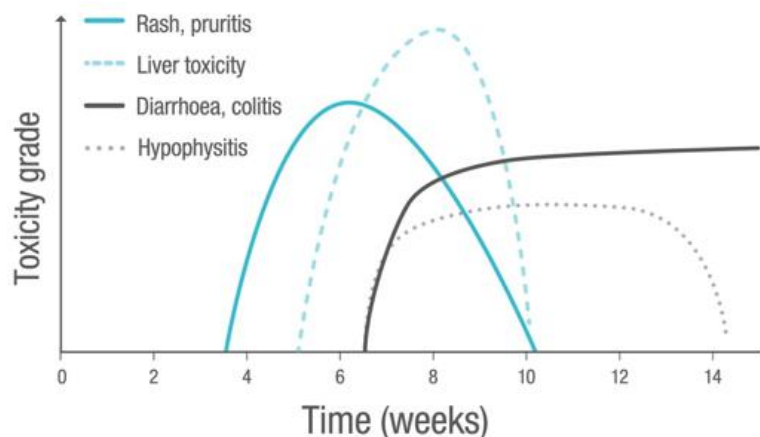
## Charakteristika imunitně podmíněných nežádoucích účinků

### 1) rozmanitost

Imunitně podmíněné nežádoucí účinky mohou postihnout v podstatě kterýkoli orgán a mohou se objevit i po ukončení imunoterapie. Můžeme je klasifikovat na **orgánově specifické** a **orgánově nespecifické**. Při kombinovaných imunoterapeutických režimech se můžeme setkat s mnohočetnými imunitně podmíněnými nežádoucími účinky, které se mohou prezentovat v jedné době nebo i sekvenčně.

### 2) kinetika nástupu

Nejdříve během prvních dvou týdnů se zpravidla setkáváme s kožními imunitně podmíněnými nežádoucími účinky, gastrointestinální imunitně podmíněné nežádoucí účinky se objevují okolo šestého týdne léčby, imunitně podmíněná hepatitida se objevuje s mediánem kolem pátého týdne. Toxicita ipilimumabu se projevuje v průměru okolo sedmého týdne léčby, u nivolumabu v průměru okolo desátého týdne. Podle času manifestace můžeme imunitně podmíněné nežádoucí účinky rozdělit na **časné** a **pozdní**.



**Obrázek 4: Incidence a stupeň závažnosti imunitně podmíněných nežádoucích účinků v závislosti na délce imunoterapie (62).** Převzato z: <https://www.esmo.org/guidelines/supportive-and-palliative-care/toxicities-from-immunotherapy>

### **3) nepředvídatelnost**

Imunitně podmíněné účinky mohou postihnout kterýkoli orgán a objevit se kdykoli během léčby, dokonce i po jejím ukončení. Průběh irAEs může být i fulminantní a pro pacienta potenciálně fatální, proto je důležitá promptní diagnostika a včasné zahájení kortikoterapie a multidisciplinární přístup. (60)

#### **1.2.6 Incidence imunitně podmíněných nežádoucích účinků**

Incidence jakéhokoli imunitně podmíněného nežádoucího účinku (grade 1 až grade 5) byla hlášena až u 72% pacientů léčených monoterapií ipilimumabem, a u 66% pacientů léčených monoterapií (anti PD-1/anti PD-L1), incidence imunitně podmíněných nežádoucích účinků u kombinovaných režimů je vyšší. (61)

Mezi fatální nežádoucí účinky patří nejčastěji kolitida u nemocných léčených ipilimumabem, u pacientů léčených anti PD-1/anti-PD-L1 je to hepatotoxicita, pneumonitida a neurotoxicita. U pacientů léčených kombinovanými režimy byla nejčastější příčinou úmrtí myokarditida či kolitida. Důležitý je fakt, že fatální imunitně podmíněné nežádoucí účinky nastupují při kombinované terapii brzy po zahájení léčby (**střední doba 14,5 dne**), pokud je pacient léčen monoterapií objevují se průměrně okolo 40. dne léčby. (63)

Mezi imunitně podmíněnými nežádoucími účinky můžeme zařadit:

#### **1.2.7.1 Vybrané imunitně podmíněné nežádoucí účinky a jejich management**

V této kapitole shrneme nejčastější imunitně podmíněné nežádoucí účinky a jejich terapii.

##### **1.2.7.1 Kožní imunitně podmíněné nežádoucí účinky**

Běžné kožní imunitně podmíněné nežádoucí účinky zahrnují rash, pruritus, vitiligo, vzácné Stevens-Johnsonův syndrom, psoriázu, bulózní pemfigus, toxickou epidermální nekrolýzu, DRESS syndrom. Kožní imunitně podmíněné nežádoucí účinky patří mezi nejčastější a obvykle se vyskytují jako první, po třetím týdnu léčby s vrcholem kolem šestého týdne.

Stupeň 1 zahrnuje exantém s postižením méně než 10 % povrchu těla, může být přítomen pruritus, suchá kůže, pálení. Pacient v imunoterapii pokračuje, je třeba vyloučit jinou etiologii, než imunitně podmíněný nežádoucí účinek, lokálně se používají emolienta, kůže se promazává, topicky se aplikují krémy s kortikosteroidy, systémově antihistaminika, dále režimová opatření jako ochrana před slunečním zářením, krémy s vysokým SPF.

Stupeň 2 zahrnuje exantém s postižením 10-30 % povrchu těla, postupuje se obdobně jako u stupně jedna, s rozdílem, že podání imunoterapie je na jeden až dva týdny přerušeno. Pokud dojde ke zlepšení do stupně jedna, pacient pokračuje s imunoterapií. Pokud dojde ke zhoršení potíží, nebo přetrvávají potíže, je třeba konzultovat dermatologa, při progresi do stupně 3 zvážit nasazení systémových kortikosteroidů (prednison 0,5-1mg/kg).

Stupeň 3 zahrnuje postižení na více než 30 % povrchu těla, imunoterapie je přerušena, zvážíme hospitalizaci a nasazujeme kortikosteroidy buď perorálně při mírných potížích (prednison 0,5-1 mg/kg) či v případě závažných potíží zahajujeme parenterálně kortikoterapii (methylprednisolon 0,5-1mg/kg). Pokud se stav pacientalepší do stupně jedna, může pacient s imunoterapií znovu pokračovat.

Stupeň 4 zahrnuje postižení více než 30 % povrchu těla s dalšími závažnými symptomy (pruritus, puchýře), dále sem patří vzácné formy Stevens-Johnsonův syndrom, toxická epidermální nekrolýza. Opět postupujeme jako u stupně 3, imunoterapie je ukončena, pacient je hospitalizován, zahajuje se kortikoterapie ve vyšších dávkách (methylprednisolon 1-2 mg/kg), pacient má plnou podpůrnou péči (péče o vnitřní prostředí, parenterální výživu pokud je omezen příjem per os, prevenci oportunní infekce při kortikoterapii), dále v rámci diferenciální diagnostiky zvažujeme biopsii kůže, samozřejmostí je úzká spolupráce s dermatologem.

#### **1.2.6.2 Gastrointestinální**

Mezi tyto imunitně podmíněné nežádoucí účinky zahrnujeme časté jako průjem, kolitida, hepatitida, vzácné enteritida či pankreatitida.

#### **Imunitně podmíněná kolitida a průjem**

Průjem je po kožních nežádoucích účincích druhý nejčastější imunitně podmíněný nežádoucí účinek, častěji se vyskytuje u nemocných léčených protilátkami anti-CTLA-4. Stupeň 1 hodnotíme jako více než 4 stolice/den nad baseline, pacient pokračuje v imunoterapii, doporučujeme upravit stravu (omezit mléčné výrobky, spíše lehká snadno stravitelná a nedráždivá jídla, zvýšit příjem tekutin), symptomaticky podáváme loperamid. Stupeň 2 zahrnuje 4-6 stolic nad baseline, imunoterapie je přerušena, vylučuje se infekční etiologie, dále terapie jako u předchozího stupně. Při stupni 3 a 4, počet stolic 7 a více se, při inkontinenci stolice, v případě horečky, bolesti břicha, či podezření na náhlou příhodu břišní (ileus, perforace), je imunoterapie trvale ukončena, pacient je hospitalizován na JIP, vylučuje

se infekční příčina (*Clostridium difficile*, adenoviry, noroviry, rotaviry, salmonely, shigelly, campylobacter, CMV), zvažuje se provedení koloskopie s biopsií, pacient je zajištěn kortikosteroidy v dávce 1-2mg/kg.

Pokud nedojde při kortikoterapii po třech až pěti dnech ke zlepšení stavu je třeba zvážit podání infliximabu v dávce 5mg/kg. Před podáním infliximabu musí být vyloučeny infekční fokusy a negativní sérologie pro infekční hepatitidy a tuberkulózu. Pokud by byla kolitida refrakterní vůči infliximabu i kortikosteroidům, v další linii probíhají studie s **vedolizumabem** či fekální mikrobiální transplantací. (63,64)

### **Autoimunitní hepatitida**

Patří mezi vzácnější imunitně podmíněné nežádoucí účinky, ale pokud je včas zachycena a adekvátně léčena pacienti mají velmi dobrou prognózu.

Stupeň 1 hodnotíme jako zvýšení ALT a AST nad horní hranici normy (až nad trojnásobek horní hranice normy), celkový bilirubin je menší nebo roven 1,5 násobku horní hranice normy. Pacient může pokračovat v imunoterapii, důležitá je pravidelná monitorace jaterních testů. Stupeň 2 klasifikujeme jako zvýšení sérových transamináz AST a ALT mezi 3 až 5 násobkem normy, celkový bilirubin je mezi 1,5-3 násobkem normy. Imunoterapie je přerušena na dobu 5-7 dní, je třeba vyloučit jinou etiologii, je indikována kortikoterapie prednison 1mg/kg, při zlepšení je možné pokračovat v imunoterapii. U stupně 3 (ALT až AST mezi 5 až 8 násobkem normy, bilirubin mezi 3 až 5 násobkem normy) je imunoterapie přerušena, je nutné vyloučit jinou příčinu hepatopatie (léky, hepatotropní viry), je indikována kortikoterapie (1-2mg/kg methylprednisolon). Pokud nedojde ke zlepšení je na zvážení podání mykofenolát mofetilu (500-1000mg 2x denně), infliximab se pro jeho možnou hepatotoxicitu v této indikaci neužívá. V diferenciální diagnostice hepatopatie vylučujeme infekční hepatitidy a dále alkoholickou hepatitidu, toxiny (houby, jiné léky), či progresi nádorového onemocnění v játrech. (64,65)

### **Pankreatitida**

Pankreatitida je méně častým nežádoucím účinkem, nicméně zejména v případě kombinovaných režimů na ni u pacientů s bolestmi břicha musíme pomyslet. Sledování amylázy a lipázy není u asymptomatických nemocných doporučeno, stejně jako léčba kortikoidy není u asymptomatických nemocných indikována. (66,67)

### 1.2.7.3 Endokrinní

Mezi časté patří hypotyreóza, hypertyreóza, hypofyzitida, vzácně se setkáváme s primární adrenální insuficiencí či panhypopituitarismem. Hypofyzitida se častěji vyskytuje při terapii ipilimumabem a poruchy funkce štítné žlázy při terapii PD-1/PD-L1 protilátkami. Diagnostika imunitně podmíněných nežádoucích účinků může být pro lékaře výzvou vzhledem k nespecifickým a variabilním příznakům. Na rozdíl od jiných imunitně podmíněných nežádoucích účinků jsou endokrinopatie trvalé a je nutná doživotní substituční léčba stejně jako úzká spolupráce s endokrinology.

#### Poruchy funkce štítné žlázy

Nejčastěji se setkáváme s hypotyreózou s nejvyšší incidencí u kombinovaných režimů. Většina pacientů je asymptomatická. Laboratorně nacházíme zvýšená TSH a nízké hodnoty FT3 a FT4. Pokud by bylo i TSH nízké, je nutné pomýšlet na centrální hypotyreózu. Pacienty s hypotyreózou léčíme substitucí hormonů štítné žlázy s postupnou titrací dávky.

Hypertyreóza by měla být léčena konzervativně (beta blokátory), laboratorními a zobrazovacími metodami by však měly být vyloučeny další příčiny tyreotoxikózy včetně Graves-Basedowovy choroby. Z retrospektivních studií vyplývá, že převážná část pacientů má nejprve tyreotoxikózu, ze které se později vyvine hypotyreóza. Laboratorně nacházíme nízké TSH, zvýšené hodnoty FT3 a FT4. Pacienti by měli mít vyšetřeny protilátky proti TSH receptorům, anti-TPO a anti-tyreoglobulinové, mezi další vyšetření v rámci diferenciální diagnostiky patří scintigrafie štítné žlázy. (64, 68)

#### Hypofyzitida

Je mnohem častější u pacientů léčených ipilimumabem, kde je závislá na dávce a nejčastěji se objevuje po podání třetí dávky, u pacientů léčených monoterapií PD-1/PD-L1 je velmi vzácná. Příznaky se liší v závislosti na postižené oblasti hypofýzy, nejčastěji se setkáváme s deficitem TSH a ACTH, hypogonadotropní hypogonadismus či diabetes insipidus jsou příznaky vzácné. Vždy vyšetřujeme TSH, FT4, ACTH, kortizol a provádíme magnetickou rezonanci se zaměřením na hypofýzu. (64,65)

#### Adrenální insuficience

Pokud je přítomna současně adrenální insuficience a hypotyreóza vždy musíme **nejprve podat steroidní hormony a až poté substituovat hormony štítné žlázy, abychom zabránili rozvoji adrenální krize**. Pacienti s adrenální insuficiencí musí být poučeni o vzniku

potenciálně život ohrožující adrenální krize a musí být vybaveni stresovými dávkami hydrocortisonu pro případ infekce, operace či traumatu. Při stresu (fyzickém, psychickém, zvracení či operaci) musí být podána dávka hydrocortison 100mg intravenózně nebo intramuskulárně s případným opakováním á 8 hodin dle klinického stavu. V případě horečky do 38°C dávku zdvojnásobujeme, při teplotě 38°C až 39°C dávku ztrojnásobujeme, při teplotě nad 39°C je dávka čtyřnásobná. Při stupni 1 pacient je asymptomatický, jsou známy jen lehké laboratorní odchylky, pacient pokračuje v imunoterapii. Při stupni 2 se léčba imunoterapii přerušuje, zvažujeme provedení MRI mozku se zaměřením na hypofýzu, konzultujeme endokrinologa, je třeba zahájit hormonální substituci (například hydrocortison 10mg 2-1-0) a zvážit nasazení prednisonu 0,5-1mg/kg. V případě závažných symptomů, hodnotíme jako stupeň 3, je indikováno MR hypofýzy, je nutné provést hormonální profil a konzultovat endokrinologa, zahájit hormonální substituci a zvážit kortikoterapii. Při ústupu symptomů a adekvátní hormonální substituci je možné v imunoterapii pokračovat. V případě stupně 4 (addisonská krize, závažná dehydratace, hypotenze) imunoterapii přerušujeme, je indikována hospitalizace na JIP, provádí se hormonální profil, MR zobrazení hypofýzy, je indikována hormonální substituce, kortikoterapie. (64,68,69)

#### **1.2.7.4 Pneumonitida**

Je vzácnou avšak potenciálně fatální komplikací, je třeba na ni myslet u každého pacienta s novými příznaky respirační insuficience. Vyskytuje se častěji při kombinované imunoterapii nebo při terapii PD-1/PD-L1 protilátkou ve srovnání s monoterapií ipilimumabem. Nejčastěji se vyskytuje u pacientů s NSCLC, příčinou zvýšené incidence může být preexistující plicní patologie (CHOPN, plicní fibróza). Příznaky pneumonitidy se odvíjí od její závažnosti a rychlosti nástupu. Nejčastěji se setkáváme s dušností, kašlem, bolestmi na hrudi a únavou. Část pacientů má asymptomatické onemocnění, které je náhodně odhaleno při provádění zobrazovacích vyšetření. Ve vzácných případech však pneumonitida může vyústit ve fulminantní respirační selhání. Doba nástupu je variabilní, na CT skenech se můžeme setkat s opacitami mléčného skla, nespecifickou intersticiální pneumonitidou, kryptogenní organizující se pneumonii či s hypersenzitivní pneumonií. Vzhledem k závažnosti tohoto nežádoucího účinku je třeba rychle zahájit terapii kortikoidy a pro případ infekce pacienta zajistit širokospektrými antibiotiky, také je důležité provést zobrazovací vyšetření, funkční vyšetření plic, konzultovat pneumologa eventuálně provést bronchoalveolární laváž. Pro léčbu pacientů rezistentních na kortikoidy je k dispozici pouze malé množství údajů, užívá se buď infliximab či mykofenolát mofetil. V diferenciální diagnostice zvažujeme pneumonii (včetně

atypické, či pneumocystové), karcinomatózní lymfangitidu, embolii plicní, edém plicní či sarkoidózu, doplňujeme CRP, D-dimery, NT-proBNP, EKG, eventuálně echokardiografii. Stupeň 1 náhodný radiografický nález, pacient nemá žádné klinické příznaky, vylučujeme infekční etiologii, imunoterapie je přerušena. Stupeň 2 jsou přítomny mírné klinické symptomy jako kašel, dušnost, bolesti na hrudníku, pokud je podezření na infekci zahajujeme podávání širokospektrých antibiotik, pokud do 48 hodin nedojde ke zlepšení, nasazujeme kortikoidy v dávce prednison 1mg/kg, dále zahajujeme profylaxi pneumocystové pneumonie Biseptolem. Při imunitně podmíněné pneumonitidě stupně 3 až 4 pacienta hospitalizujeme, provádíme HRCT, či bronchoskopii s BAL, podáváme methylprednisolon 2-4 mg/kg/den. Pokud nedojde ke zlepšení stavu, přidáváme další imunosupresivum infliximab či mykofenolát mofetil. (64) Byly popsány i případy rekurentní pneumonitidy navzdory ukončené imunoterapii. (70)

#### **1.2.7.5 Revmatologické imunitně podmíněné nežádoucí účinky**

Mezi revmatologické imunitně podmíněné nežádoucí účinky zahrnujeme časté atralgie, artritidy, myalgie, vzácné dermatomyozitidu, vaskulitidu či Sjögrenův syndrom. (71) Je nutné zvážit provedení MR postiženého kloubu, vyloučit metastatické postižení či septickou artritidu. Při stupni postižení stupně 2 a více by měli být pacienti léčeni prednisonem (10-20mg/den) ve spolupráci s revmatologem. V případě artritid refrakterních na léčbu steroidy je možné zvážit další imunosupresi (metotrexát, sulfasalazin, leflunomid). (64)

#### **1.2.7.6 Neurologické**

Do této skupiny můžeme zařadit časté imunitně podmíněné nežádoucí účinky jako senzomotorická neuropatie, ale i vzácné jednotky jako aseptickou meningitidu, encefalitidu, myastenii gravis či Guillain-Barrého syndrom. Klinická manifestace je různorodá zahrnuje postižení jak periferního, tak centrálního nervového systému. Můžeme se setkat s bolestí hlavy, zmateností, horečkou, cerebelární ataxií až poruchou vědomí. Myastenia gravis byla často spojena s myokarditidou a myositidou. (72) Diferenciální diagnostika u pacientů s neurologickými příznaky je široká, infekce, metastázy centrálního nervového systému, leptomeningeální postižení, paraneoplastické syndromy, diabetickou neuropatii či deficit vitamínu B12 či thiaminu. Nezbytné je provedení zobrazovací metody CNS, nejlépe magnetické rezonance s kontrastní látkou, neurologické vyšetření včetně lumbální punkce. Pokud pacienti s myastenii či Guillain-Barrého syndromem nereagují na kortikosteroidy, zvažujeme plazmaferézu či IVIG. (73)



V případě **aseptické meningitidy** se setkáváme s bolestí hlavy, světloplachostí, tuhnutí šíje, může být přítomna horečka, zvracení, na rozdíl od encefalitidy má pacient normální kognitivní funkce. Provádíme lumbální punkce a MR mozku k odlišení ložiskového postižení č leptomeningeální diseminace. U **encefalitidy** se setkáváme se zmateností, alterací kognitivních funkcí, bolestmi hlavy, alterací na škále Glasgow coma scale, motorickými či senzorickými deficity, dysartrií, může být přítomna i horečka. Opět by měla být provedena lumbální punkce včetně PCR na HSV, pacienti by měli být zajištěni preventivně acyklovirem dokud nebudou známy výsledky PCR. (64)

### 1.2.7.7 Renální

Klinická manifestace se může lišit od pouze laboratorních změn (iontová dysbalance, elevace kreatininu) až po oligurii či akceleraci hypertenze. Nejčastěji se setkáváme s **akutní intersticiální nefritidou**, dále lupusovou nefritidu či nemocí s minimálními změnami. V diferenciální diagnostice musíme pomýšlet na dehydrataci, sepsi či nefrotoxickou medikaci. Pokud do 72 hodin nedojde ke zlepšení, je nutné konzultovat nefrologa a zvážit biopsii ledviny, indikován je prednison v dávce 0,5-1mg/kg (stupeň 2) či methylprednisolon 1-2mg/kg (stupeň 3-4). (64)

### 1.2.7.8 Oftalmologické

Zahrnuje uveitidu, syndrom suchého oka, ulcerativní keratitidu, často bývá spojena s extraokulárními komplikacemi jako je kolitida. Pro stupeň 2 se využívají topické kortikoidy, pro stupeň 3 a 4 systémové kortikosteroidy. (74) Jedná se o komplikaci vzácnou, ale závažnou jelikož může být zrak ohrožující.

### 1.2.7.9 Kardiovaskulární

U pacientů s myokarditidou byly popsány kombinace dalších závažných imunitně podmíněných nežádoucích účinků jako myastenien gravis či myositida. Příznaky zahrnují dušnost, bolesti na hrudi, kašel, únavu, otoky. Kromě myokarditidy, která může být poměrně rychlá a fatální, sem dále můžeme zařadit perikarditidu, srdeční fibrózu, arytmií a nově vzniklé srdeční selhání. (64) Pacienti musí mít provedeno EKG vyšetření, ECHO, odebrán troponin, NT-proBNP. V případě podezření na myokarditidu je nutná multidisciplinární spolupráce, pacienti musí být léčeni vysokými dávkami kortikoidů (methylprednisolon 1g/den po dobu 3 až 5 dnů). (75) Při neúspěchu kortikoidů je třeba užít další imunosupresiva či abatacept (agonista CTLA-4). (76)

### **1.2.7.10 Hematologické**

Jsou velmi vzácné, nicméně byly popsány různé projevy, nejčastěji trombocytopenická purpura a hemolytická anémie, dále aplastická anémie, neutropenie, trombocytopenie, myelodysplazie. Právě neutropenie je velmi neočekávaná a zrádná kvůli komplikacím jako febrilní neutropenie, nasazení kortikoidů vede k dalšímu prohloubení imunosuprese a zvyšuje riziko rozvoje oportunních infekcí. Vždy je nezbytné vyšetření kostní dřeně, sternální punkcí či trepanobiopsií a konzultace hematologa. Diferenciální diagnostika zahrnuje progresi základního onemocnění s postižením kostní dřeně. V jedné z publikovaných metaanalýz byla imunitně podmíněná anémie zaznamenána u 9,8 % případů, neutropenie u 0,94 % případů a trombocytopenie u 2,84 % případů. (77)

Právě imunitně podmíněné agranulocytóze se budu podrobněji věnovat v praktické části, na naší klinice jsme zaznamenali jeden případ imunitně podmíněné agranulocytózy po podání nivolumabu.

### **1.2.8 Obecná doporučení pro terapii imunitně podmíněných nežádoucích účinků**

Management imunitně podmíněných nežádoucích účinků vychází ze souhrnných článků, metaanalýz, doporučení odborných společností (ASCO, ESMO, NCCN). U raritních nežádoucích účinků se musíme spolehnout na kazuistiky a soubory kazuistik. Pacienti by měli být během léčby pečlivě sledováni, aby se zjistily počáteční známky nežádoucích účinků.

Pokud je pacient asymptomatický (hodnotíme jako stupeň 1) je indikováno pouze sledování, pacient může pokračovat v imunoterapii. Pokud má pacient mírné symptomy (stupeň 2) imunoterapie by měla být přerušena a pokud symptomy nezmizí do týdne, měli bychom zahájit terapii systémovými kortikosteroidy (prednison 0,5-1mg/kg). Při dávce prednisonu 20mg a více je indikována profylaxe pneumocystové pneumonie (Biseptol 480mg 0-0-2 denně), dále podáváme inhibitory protonové pumpy, suplementujeme vápník a vitamín D.

V případě stupně 3 (závažné symptomy) další cyklus imunoterapie odložíme, zahájíme terapii kortikosteroidy (prednison 1-2mg/kg), pokud do 48-72 hodin nedojde ke zlepšení stavu, je indikována hospitalizace a zahájeno parenterální podávání kortikoidů (methylprednisolon 2-4mg/kg), dále zvažujeme jiné příčiny zhoršení stavu, vylučujeme progresi onemocnění, konzultujeme specialisty z jiných oborů, eventuálně zvažujeme provedení biopsie z postiženého orgánu.

U stupně 4 je nutná hospitalizace, ukončení imunoterapie, zahájení parenterálních kortikoidů. Pokud nedojde ke zlepšení stavu po třech dnech parenterálních kortikoidů, je možné zvážit užití jiného imunosupresiva buď infliximabu (5mg/kg) či mykofenolát mofetilu (2x 1G za monitorace hladin). (61,62)

U refrakterních imunitně podmíněných nežádoucích účinků byla zkoumána protilátka proti IL-6 tocilizumab. (63) Při dlouhodobém podávání vysokých dávek kortikoidů je třeba poskytovat maximální podpůrnou péči včetně prevence oportunní infekce. Kortikoidy vždy vysazujeme postupně (4-6 týdnů) pro riziko rekurence imunitně podmíněných nežádoucích účinků, u endokrinopatií je nutná doživotní substituce (64)

### **1.2.9 Vztah mezi imunitně podmíněnými nežádoucími účinky a efektem imunoterapie**

Některé práce naznačují, že pacienti s imunitně podmíněnými nežádoucími účinky vykazují lepší přežití bez progresu a celkové přežití. Zatím se jedná o desítky publikovaných prací u nádorů, kde jsou s imunoterapií největší zkušenosti (maligní melanom, nemalobuněčný karcinom plic a karcinom ledviny). Jedná se o retrospektivní studie s poměrně malými počty pacientů. Mezi takto dokumentované imunitně podmíněné nežádoucí účinky patří například vitiligo. V několika retrospektivních analýzách u pacientů s metastatickým maligním melanomem byl vznik vitiliga při terapii checkpoint inhibítorem spojen s delším přežitím bez progresu a celkovým přežíváním. (78,79,80)

V další práci u pacientů s nemalobuněčným karcinomem plic (n= 195) léčených nivolumabem byl vznik imunitně podmíněného nežádoucího účinku stupně dva a více silným prediktorem delšího přežití. (81) Další práce rovněž u pacientů s nemalobuněčným plicním karcinomem léčených nivolumabem potvrzují hypotézu, že vznik imunitně podmíněného nežádoucího účinku je spojen s lepším přežíváním nemocných, vyšší mírou objektivní odpovědi a delším přežitím bez progresu. (82,83, 84)

### **1. 2. 10 Hodnocení léčebné odpovědi u pacientů léčených imunoterapií**

Na rozdíl od chemoterapie, kde pro hodnocení léčebné odpovědi využíváme RECIST 1.1 kritéria a setkáváme se s jasně definovanými pojmy kompletní odpověď, parciální odpověď, stabilizace onemocnění, progresu onemocnění. U imunoterapie je situace složitější, díky infiltraci T-lymfocytů se mohou nádorové léze přechodně zvětšit (pseudoprogrese) nebo se mohou dokonce objevit nové léze a nemusí se jednat o progresi onemocnění. Léčebná odpověď se může projevit několika způsoby: okamžitá odpověď, stabilizace lézí s pomalým

zmenšováním, přechodné zvětšení lézí a následné postupné zmenšování, může se objevit nová léze s následným pomalým zmenšováním. Klíčové je řídit se klinickým stavem pacienta a tím, zda z léčby profituje. Nově se setkáváme s pojmem nepotvrzená progresie (unconfirmed progressive disease - iUPD). Pro potvrzení progresie vždy vyžadujeme konfirmační CT provedené za 4-8 týdnů od posledního vyšetření. Pro hodnocení léčebné odpovědi u pacientů léčených imunoterapií se využívají například irRC (85), iRECIST (86), irRECIST, imRECIST kritéria. (87) V současné době je předmětem klinických studií, která z výše uvedených kritérií se stanou standardem pro užívání v běžné klinické praxi.

### **1. 2. 11 Fenomén hyperprogrese**

Hyperprogrese po imunoterapii je definována jako neočekávaná výrazná progresie choroby po zahájení imunoterapie. Její definice je založena na srovnání kinetiky růstu nádoru před a po zahájení imunoterapie. Jedná se o jakýsi fenomén vzplanutí tumoru spojený se špatnou prognózou, může se jednat o zvláštní typ imunitně podmíněného nežádoucího účinku. Prediktivní faktory nejsou známy. (88) Patofyziologie tohoto procesu není dosud kompletně objasněna, blokáda PD-1 může posílit proliferaci vysoce suprimujících intratumorálních PD-1+ efektorových regulačních T-lymfocytů, která vede k hyperprogresi. Incidence u solidních nádorů se uvádí mezi 9 až 29%, je třeba hyperprogresi odlišit od pseudoprogrese. Tento fenomén byl popsán při imunoterapii uroteliálního karcinomu, nádorů hlavy a krku a nemalobuněčného plicního karcinomu, ale i u pacientů s metastatickým maligním melanomem léčených ipilimumabem. (89)

### **1. 2. 12 Biomarkery a imunoterapie**

Vzhledem ke stále rozšiřujícímu se spektru pacientů léčených imunoterapií je kladen stále větší důraz na hledání prediktivních biomarkerů. V posledních letech také výrazně stoupá význam nádorového mikroprostředí tvořeného nejen tumor infiltrujícími lymfocyty, ale řadou dalších buněk, například makrofágy, monocyty, dendritickými buňkami či fibroblasty. Mezi stávající a potenciální biomarkery imunoterapie můžeme zařadit charakteristiky pacienta (věk, pohlaví, kouření, střevní mikrobiom), charakteristiky nádoru a nádorového mikroprostředí (mutační nálož, mikrosatelitová nestabilita, přítomnost neoantigenů, zánětlivé fenotypy, tumor infiltrující lymfocyty, signatury imunitní odpovědi) a PD-L1 expresi.

## **Prediktivní markery**

### **PD-L1 exprese**

Využití PD-L1 exprese jako prediktivního biomarkeru je komplikováno několika problémy. Exprese PD-L1 v nádoru je vysoce heterogenní, existuje jak intratumorová, tak intermetastatická a intrametastatická heterogenita. PD-L1 je dynamický marker, jehož hladina se v čase mění. Stále neexistuje konsenzus o tom, kdy by měl být nádor hodnocen jako PD-L1 pozitivní respektive, kde by měla být stanovena hranice „cut off“ pro hodnocení nádoru jako PD-L1 pozitivní. (90) Exprese PD-L1 se nejčastěji hodnotí imunohistochemicky, nicméně metody stanovení PD-L1 se v rámci klinických studií liší (různé protilátky 22C3 pro léčbu pembrolizumabem a 28-8 pro léčbu nivolumabem). PD-L1 exprese je vysoká u nádorů asociovaných s přítomností virových antigenů (anální karcinom, cervikální karcinom, spinocelulární karcinomy hlavy a krku, karcinom z Merkelových buněk). (57) Jednou z možností je hodnocení PD-L1 exprese pomocí Tumor Proportion Score (TPS). Tumor proportion score je procento viabilních nádorových buněk s intenzitou vyšší nebo rovno jedné k celkovému počtu viabilních nádorových buněk. Vzorek vykazuje PD-L1 expresi pokud je  $TPS \geq 1$ ,  $TPS 1-49 \%$  se hodnotí jako PD-L1 pozitivní,  $TPS \geq 50 \%$  je hodnoceno jako silně pozitivní. Combined Positive Score (CPS) se uvádí jako číselná hodnota bez dalšího komentáře.

Prognostický význam PD-L1 exprese se napříč spektrem nádorů významně liší. U některých nádorů vysoká PD-L1 exprese koreluje se špatnou prognózou (hepatocelulárním karcinom, ovariální a uroteliální karcinom, karcinom žaludku), u některých nádorů je naopak spojen s dobrou prognózou (karcinomu prsu a karcinomu z Merkelových buněk), prognostická hodnota PD-L1 exprese je u kolorektálního karcinomu, melanomu a nádorů plic kontroverzní. (91)

### **Nádorová mutační nálož**

Nádorová mutační nálož představuje kumulovaný počet somatických mutací v nádorovém genomu na 1 megabázi. Obecně se předpokládá, že nádory s vysokou mutační náloží mají zvýšenou pravděpodobnost vzniku neoantigenů, které zvyšují pravděpodobnost rozpoznání imunitním systémem a zahájení imunitní odpovědi. Nádory s vysokou mutační náloží bývají často spojeny s vlivem mutagenů (například kouření, vliv UV záření). Mezi nádory s největší mutační náloží patří melanom a karcinom plic, na opačném konci spektra jsou pediatrické

nádory. Typickým příkladem nádorů s velmi vysokou mutační náloží jsou nádory vykazující mikrosatelitovou nestabilitu (MSI high nádory). (57)

Mutační nálož stanovená pomocí sekvenování nové generace, nám může pomoci identifikovat řídicí mutace, pro které je možné nalézt odpovídající terapii. Nádor již nebudeme léčit pouze na základě histologického obrazu a místa primární lokalizace, ale na základě jeho molekulárně genetického profilu. (92) V budoucnu pacienti s odlišnými primárními tumory, ale stejnými genetickými alteracemi, budou léčeni stejnými léky (respektive inhibitory příslušných mutací). Toto je jeden z rysů personalizované a precizní onkologie 21. století.

PD-L1 exprese a nádorová mutační nálož jsou dva nezávislé prediktivní biomarkery, jejich vzájemnou kombinací můžeme získat přesnější data pro výběr pacientů, kteří budou nejvíce profitovat z léčby checkpoint inhibitory. Tyto biomarkery nám pomohou definovat specifické nádorové mikroprostředí a pomoci identifikovat pacienty rezistentní k imunoterapii.

### **Tumor infiltrující lymfocyty**

Jsou velmi intenzivně zkoumány pro jejich možný prediktivní i prognostický význam. Například u karcinomu prsu je vysoký počet tumor infiltrujících lymfocytů spojen s lepší odpovědí na neoadjuvantní chemoterapii. Ukazuje se, že nádory s přítomností vysokého počtu efektorových T-lymfocytů vykazují lepší odpověď na terapii checkpoint inhibitory. Nádory můžeme podle charakteru tumor infiltrujících lymfocytů rozdělit do tří skupin. V první skupině se vyskytuje fenotyp se zánětlivou celulizací (**immune-inflamed**), zde přítomny CD<sup>4+</sup> a CD<sup>8+</sup> T-lymfocyty, monocyty, buňky jsou v přímém kontaktu s nádorovými strukturami. U tohoto fenotypu je pravděpodobná odpověď na imunoterapii. Druhým fenotypem (**immune-excluded**) je typická přítomnost TIL na periferii nádoru, odpověď na podání imunoterapie je vzácná. Pro třetí poslední fenotyp (**immune-desert**) je typická absence nebo pouze minimální přítomnost TIL, která je znakem nepřítomnosti protinádorové imunity. Hodnocení TIL však samo o sobě nestačí k hodnocení odpovědi na imunoterapii, zdá se, že bude nutné kombinovat další faktory například míru PD-L1 exprese. (93)

### **Stanovení populace cirkulujících lymfocytů - poměr neutrofilů k lymfocytům**

Tento marker byl zatím zkoumán jako prognostický u řady nádorových onemocnění, ale zcela jistě bude mít svou roli i v průběhu imunoterapie, je potřeba dalších prospektivních studií, které jeho roli definitivně potvrdí. Velkou výhodou je, že se jedná o velmi dostupné parametry, které jde snadno získat retrospektivně s minimálními ekonomickými náklady.

NLR je nezávislý prognostický marker pro karcinom prsu. Některé práce naznačují, že pacientky s karcinomem prsu s vyšším NLR léčený neoadjuvantní terapií měly horší prognózu, kratší dobu do progresu a kratší celkové přežití. (94) Jedním z mechanismů, který toto může vysvětlit je produkce vaskulárního endoteliálního růstového faktoru (VEGF) neutrofilů. Právě VEGF se může podílet na progresi nádoru a metastazování.

Toto je jen jeden z dalších příkladů, který demonstruje duální roli imunitního systému při vzniku a progresi nádorového onemocnění a rovněž zdůrazňuje úlohu nádorového mikroprostředí, respektive složení vlastního nádorového infiltrátu na průběh nemoci.

### **Složení a diverzita fekálního mikrobiomu**

Složení střevního mikrobiomu hraje důležitou roli nejen při iniciaci některých druhů nádorů, ale také při odpovědi na chemoterapii či imunoterapii. (93) Řada studií prokázala, že střevní mikrobiom může ovlivnit protinádorovou imunitní odpověď prostřednictvím vrozené a adaptivní imunity. Jednou z možností, jak ovlivnit složení střevního mikrobiomu je fekální mikrobiální transplantace od pacienta odpovídajícího na léčbu checkpoint inhibitory. (95) Také užívání širokospektrých antibiotik ovlivňuje složení střevního mikrobiomu a v klinických studiích byl prokázán negativní vliv užívání antibiotik na protinádorovou odpověď. Užívání antibiotik tedy představuje nezávislý marker nereagování na terapii checkpoint inhibitory. (96)

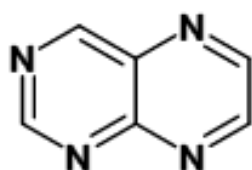
## 1.3 NEOPTERIN

### 1.3.1 Úvod

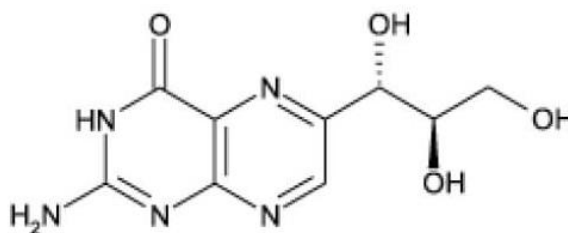
Neopterin je tvořen převážně makrofágy pod kontrolou interferonu gamma. Neopterin je považován za indikátor systémové imunitní aktivity, respektive odráží aktivitu buněk produkujících interferon gamma (T-lymfocytů a NK buněk). Neopterin tedy představuje spojení mezi získanou a vrozenou imunitou. Zvýšená exkrece neopterinu je přítomna u celé řady patologických stavů, které souvisejí s aktivací buněčné imunity, například virové infekce, autoimunitní onemocnění, malignity. V současné době je velká pozornost věnována právě výzkumu biomarkerů, neopterin je velmi senzitivní ukazatel aktivity buněčné imunity, který v souvislosti s širším kontextem může být velmi užitečný v diferenciální diagnostice některých patologických stavů a u řady onemocnění má význam prognostický.

### 1.3.2 Chemická struktura pteridinů

Pteridiny jsou heterocyklické sloučeniny s pyrimidinovým jádrem kondenzovaným s jádrem pyrazinovým. Byly objeveny v roce 1889 Frederickem Gowlandem Hopkinsem, kdy izoloval žlutý pigment z křídel motýla. (97) Název pteridiny je odvozen od řeckého slova (Πτερον – pteron – křídlo). Deriváty pteridinů lze rozdělit na nekonjugované (biopterin, neopterin) a konjugované (kyselina listová). Neopterin byl poprvé izolován v roce 1963 z včelích dělnic, o čtyři roky později byl poprvé izolován z lidské moči 1967. (98)



**Pteridin**



**Neopterin**



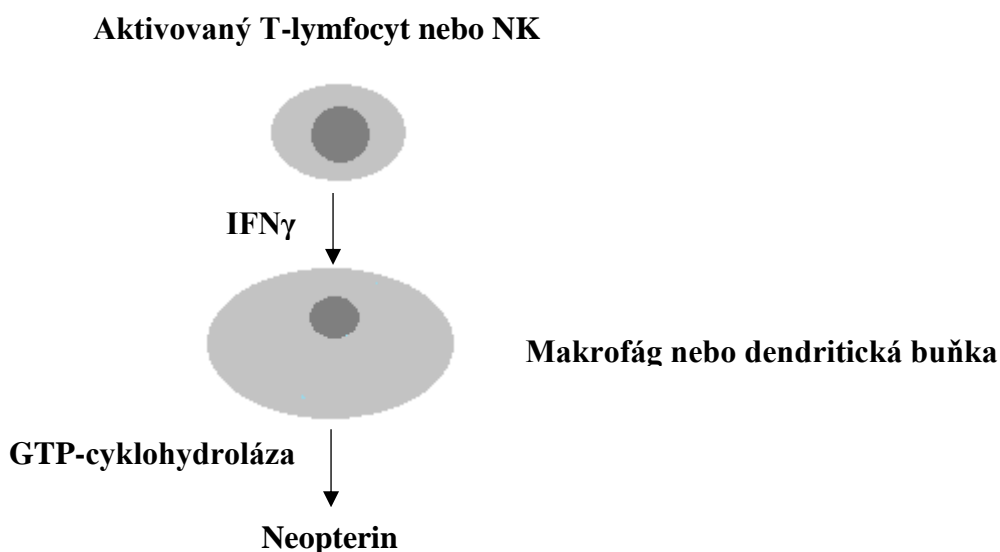
Obrázek 5: Chemická struktura pteridinu a neopterinu (99) Převzato z: [www.neopterin.net](http://www.neopterin.net)

### 1.3.3 Neopterin a jeho syntéza in vivo

Neopterin patří mezi nekonjugované pteridiny. Pokud aktivovaný T-lymfocyt (subtyp Th-1) rozpozná cizí nebo vlastní modifikované buněčné struktury, začne produkovat různé cytokiny,

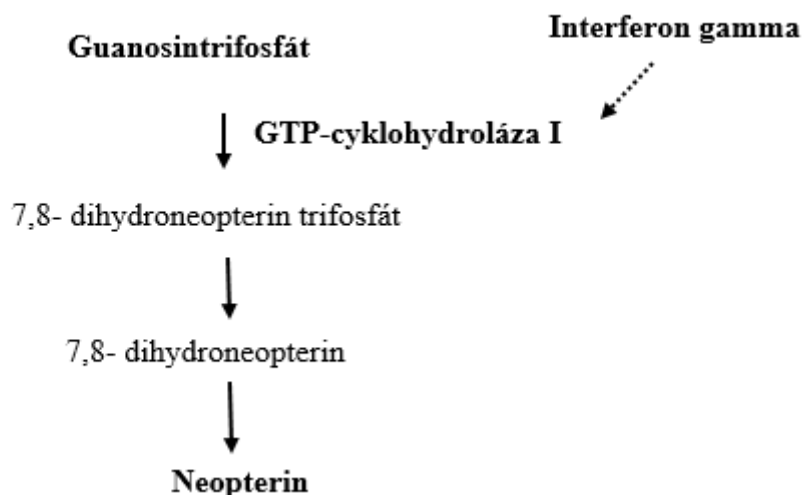


například interferon gamma. V dalším kroku interferon gamma stimuluje makrofágy k produkci neopterinu. Toto schéma je znázorněno na obrázku 6. Látky, které zvyšují aktivity T-lymfocytů (například IL-2, IL-12), mohou nepřímo zvýšit hladinu neopterinu. Naopak imunosupresivně působící látky (například cyklosporin A), který inhibuje produkci cytokinů T-lymfocyty tvorbu neopterinu snižuje. (100) Množství neopterinu v tělních tekutinách koreluje s hladinou interferonu gamma a odráží aktivitu T- buněk. Monitorování hladiny neopterinu je snazší než rutinní monitorování interferonu gamma, kvůli jeho omezené biologické dostupnosti.



**Obrázek 6: Syntéza neopterinu při imunitní reakci (99) Převzato z: [www.neopterin.net](http://www.neopterin.net)**

Neopterin je syntetizován z guanosin trifosfátu (GTP) pomocí enzymu GTP cyklohydrolázy I, tento enzym štěpí guanosin trifosfát na 7,8 - dihydroneopterin trifosfát, který je dále oxidován na neopterin. Interferon gamma je nejúčinnějším induktorem aktivity GTP cyklohydrolázy v makrofázích a tím ovlivňuje produkci neopterinu. Syntéza 7,8 – dihydroneopterinu trifosfátu představuje důležitý mezikrok metabolické dráhy, který vede k syntéze tetrahydrobiopterinu, důležitého kofaktoru pro syntézu oxidu dusnatého, katecholaminů a serotoninu. (102)



Obrázek 7: Tvorba neopterinu v makrofágu pod vlivem interferonu gamma. (103)

### 1.3.4 Neopterin a jeho chemické vlastnosti

Neopterin je nízkomolekulární látka, která je biologicky i chemicky stabilní v tělních tekutinách (moč, sérum, mozkomíšni mok). Neopterin je vylučován ledvinami, změny koncentrace neopterinu v séru korelují s koncentracemi neopterinu v moči, pokud není přítomná renální insuficience. (104) Neopterin je citlivý na přímé ozáření slunečním světlem, proto musí být vzorky během skladování a přepravy chráněny před světlem.

### 1.3.5 Neopterin v tělních tekutinách

Neopterin můžeme stanovovat v séru, plazmě a v tělních tekutinách obsahujících protein (moč, mozkomíšni mok, ascites, sliny, pankreatická šťáva). Obsah neopterinu v moči je stabilní jeden den při pokojové teplotě, 5 dní při teplotě 4 až 8 °C a 60 měsíců při teplotě -20 °C. Obsah neopterinu v séru či plazmě je stabilní při pokojové teplotě do tří dnů, pokud je třeba vzorek uchovat jeden týden musí se chladit na 4 °C, pokud bude vzorek zmražen na -20 °C, je možné jej uchovat po dobu tří měsíců. Vzorky nesmí být opakovaně zmrazovány a rozmrazovány, protože by mohlo dojít ke snížení hladiny neopterinu ve vzorku. (104, 105)

### 1.3.6 Metoda stanovení neopterinu

Byly vypracovány postupy pro stanovení neopterinu v moči a v séru, ale také v dalších tekutinách (ascites, sekret z rány, plodová voda). Analytické techniky úpravy vzorku před stanovením neopterinu zahrnují, deproteinace, extrakce na tuhé fázi, centrifugaci, oxidační

metody vedoucí k přeměně redukováných forem na formu oxidovanou, která vykazuje fluorescenci). (106)

#### Stanovení chromatografickými metodami

##### **Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC)**

Ke stanovení neopterinu v moči se využívá vysokoučinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography). Neopterin je detekován měřením jeho přirozené fluorescence (excitační vlnová délka 353 nm, emisní vlnová délka 438 nm). Velkou výhodou této metody je neinvazivnost, není nutné provádět opakované venepunkce, jednoduchost, stačí vzorek první ranní moči, není třeba provádět sběr moči za 24 hodin, tato metoda je vhodná k longitudinálnímu sledování. Provádí se výpočet poměru koncentrací neopterin versus kreatinin v moči, který lze užít jako vnitřní standard, protože kreatinin je vylučován v relativně konstantním množství během dne. Poměr neopterin/kreatinin je vyjádřen v  $\mu\text{mol}$  neopterin/mol kreatininu. (105,106)

#### Stanovení imunochemickými metodami

Tyto metody jsou založené na reakci antigen protilátka, užívají se protilátky monoklonální, polyklonální nebo rekombinantní a detekuje se protilátka nebo značený antigen.

##### **ELISA**

Pro stanovení neopterinu v séru je dostupná celá řada Neopterin ELISA komerčních kitů (například DRG International, BRAHMS, IBL International GmbH). Využívá se ke stanovení neopterinu v séru, plazmě a moči. (106)

##### **Radioimunoanalýza**

Velmi citlivá metoda, využívá značení antigenu pomocí radioaktivních izotopů. Existuje celá řada komerčně vyráběných kitů (RIA Neopterin kit od firmy BRAHMS), pomocí tohoto kitu lze stanovit hladinu neopterinu v séru, plazmě, moči a likvoru. (106, 107)

##### **1.3.7 Normální hodnoty neopterinu**

Hodnota neopterinu v séru je stejná jako hodnota neopterinu v plazmě. U zdravých osob se hladina pohybuje od 5 do 10 nmol/l. Koncentrace neopterinu v séru je závislá na renálních funkcích, snížená exkrece ledvinami způsobuje hromadění neopterinu (například u pacientů

s velmi těžkým poškozením ledviny můžeme zjistit neměřitelné hladiny neopterinu v séru). (108, 109)

Hodnoty neopterinu v moči závisí na věku a pohlaví. Nejvyšších hodnoty neopterinu v moči jsou u novorozenců několik dnů po porodu, poté dochází k poklesu neopterinu přibližně do 20. roku života, kdy dochází k opětovnému postupnému nárůstu neopterinu v séru. U normální zdravé populace se hodnoty pohybují od **50 do 220  $\mu\text{mol/mol}$  kreatininu**. Při patologických stavech se prakticky vždy setkáváme se vzestupem neopterinu nad horní hranici normálního rozmezí. Renální clearance neopterinu je podobná jako u kreatininu, poměr neopterin/kreatinin v moči tedy není ovlivněn poškozením ledvin. (99, 109)

Neopterin v moči ( $\mu\text{mol/mol}$ kreatininu)				
Věk	Muži	97,5%	Ženy	97,5%
19-25	123 $\pm$ 30	195	128 $\pm$ 33	208
26-35	101 $\pm$ 33	182	124 $\pm$ 33	209
36-45	109 $\pm$ 28	176	140 $\pm$ 39	239
46-55	105 $\pm$ 36	197	147 $\pm$ 32	229
56-65	119 $\pm$ 39	218	156 $\pm$ 35	249
$\geq 66$	113 $\pm$ 38	229	151 $\pm$ 40	251

**Tabulka 5:** Normální hodnoty neopterinu v moči u zdravých mužů a žen v závislosti na věku. Převzato z [www.pteridines.net](http://www.pteridines.net) (99)

Neopterin v séru (nmol/l)		
Věk	Muži i ženy	97,5%
19-75	5,3 $\pm$ 2,7	8,7
$\geq 75$	9,7 $\pm$ 5	19

**Tabulka 6:** Normální hodnoty neopterinu v séru. Převzato z [www.pteridines.net](http://www.pteridines.net) (99)

### 1.3.8 Využití neopterinu v klinické medicíně

Neopterin má význam u patologických stavů, u nichž hraje roli buněčná imunita. (110) Koncentrace neopterinu v tělních tekutinách korelují s klinickým průběhem onemocnění a u některých nemocí má význam i prognostický. (111,112) Zde je přehled nemocí, u nichž se stanovení neopterinu využívá.

### **1.3.9.1 Virové infekce**

Téměř u všech pacientů s akutní virovou infekcí dochází k výraznému zvýšení hladiny neopterinu, zvýšená hladina neopterinu bývá pozorována ještě před nástupem klinických příznaků.

U pacientů s pneumonií se využívá neopterin v moči v kombinaci s dalšími laboratorními a klinickými ukazateli jako užitečný parametr pro diferenciální diagnostiku mezi virovým a bakteriálním původem infekce. (113,114)

Zvýšená hladina neopterinu byla zjištěna u infekce způsobené cytomegalovirem, jednalo se o soubor dárců krve, kde byl zaznamenán vzestup neopterinu u akutní CMV infekce ještě před tím, než byly detekovatelné protilátky. (115) V některých zemích se provádí rutinně vyšetření neopterinu u dárců krve, zejména z důvodu detekce infekční hepatitidy či HIV infekce.

Právě u HIV infekce hraje neopterin velmi důležitou roli, zvýšené hladiny neopterinu byly popsány téměř u 100 % HIV pozitivních pacientů. Ve fázi akutní infekce dochází k vzestupu hladiny neopterinu, ale po sérokonverzi na rozdíl od ostatních virových infekcí, zůstává hladina neopterinu nad horní hranicí normy. (112, 116) V průběhu propuknutí vlastního AIDS dochází k dalšímu vzestupu neopterinu. U HIV pozitivních pacientů hladina neopterinu negativně koreluje s množstvím CD4<sup>+</sup> T-lymfocytů a pozitivně s množstvím virové nálože. (117, 118) Po zahájení léčby antivirotiky dochází k poklesu neopterinu. Již v časně fázi infekce poskytuje neopterin významné prognostické informace pro budoucí průběh infekce a riziko vzniku AIDS. (119)

### **1.3.9.2 Infekce centrálního nervového systému**

Neopterin proniká hematoencefalickou bariérou, existuje tedy lineární vztah mezi koncentrací neopterinu v séru a v mozkomíšním moku. (120) U infekcí CNS dochází k intratékální syntéze neopterinu, což se projeví zvýšenou hladinou neopterinu v likvoru, která odráží aktivitu onemocnění. Při úspěšné terapii dochází k poklesu neopterinu v likvoru. (121)

### **1.3.9.3 Tuberkulóza**

Hladina neopterinu koreluje s rozsahem a aktivitou onemocnění. Při úspěšné terapii dochází k poklesu neopterinu, naopak při progresi onemocnění dochází k opětovnému vzestupu neopterinu. (122, 123) Zvýšené hladiny neopterinu byly popsány i u pacientů s malárií, kde zvýšení hladin neopterinu předcházelo horečnatým stavům. (124)

#### **1.3.9.4 Kardiovaskulární onemocnění**

U pacientů s ischemickou chorobou srdeční byly zjištěny zvýšené hodnoty neopterinu v séru, neopterin je prognostický marker pro nestabilitu aterosklerotického plátu, zvýšená hladina signalizuje vyšší riziko závažné kardiovaskulární příhody. (125) Neopterin je také důležitý marker u pacientů s akutním koronárním syndromem, kde vysoká hladina neopterinu může predikovat horší outcome po prodělané epizodě akutního infarktu myokardu s elevací ST úseku. Zvýšené hladiny neopterinu jsou zaznamenány také u pacientů se srdečním selháním, kde je elevace neopterinu spojena se závažností onemocnění a je nezávislým prediktorem prognózy (126), neopterin byl také sledován u pacientů s dilatační kardiomyopatií. (127) Po akutní cévní mozkové příhodě jsou rovněž zaznamenány vyšší hodnoty neopterinu, zajímavé je, že hladina neopterinu koreluje s množstvím mozkové tkáně postižené při ischemii. (128)

#### **1.3.9.5 Polytrauma**

U pacientů po polytraumatu dochází ke zvýšení neopterinu ve všech tělních tekutinách (sérum, plazma, moč, likvoru). Koncentrace neopterinu koreluje se stupněm závažnosti poranění a skórovacími škálami v akutní medicíně (APACHE II, ISS), neopterin tedy může pomoci kvantifikovat závažnost poranění. V průběhu léčby opakované měření koncentrace neopterinu může predikovat další závažné komplikace jako syndromu multiorgánové dysfunkce (MODS) a sepsi. (129)

#### **1.3.9.6 Význam monitorování neopterinu u kriticky nemocných pacientů na jednotkách intenzivní péče**

Tradiční klinické a laboratorní příznaky pro diagnózu sepse (tělesná teplota, leukocytóza, CRP) mají poměrně nízkou diagnostickou přesnost. Onkologický pacient s těžkou infekcí po chemoterapii nebude mít leukocytózu a nemusí mít ani horečku, naopak CRP bývá u pacientů s diseminovanými malignitami často zvýšené. Z těchto důvodů jsou hledány citlivější parametry pro diagnostiku sepse jako například prokalcitonin či neopterin. Neopterin je velmi senzitivní marker sepse, ale je méně specifický než prokalcitonin. Neopterin často předchází rozvoji klinických příznaků či sérokonverzi. U pacientů hospitalizovaných na JIP pro sepsi, septický šok, syndrom multiorgánové dysfunkce (MODS) či syndrom systémové zánětlivé odpovědi (SIRS) byly hodnoty neopterinu v moči významně vyšší ve skupině s nepříznivou prognózou ve srovnání s pacienty s příznivým průběhem onemocnění, vyšší hodnoty neopterinu byly spojeny se vznikem závažných komplikací či úmrtím. (130,131) Biomarkery jsou užitečné nástroje v diagnostice sepse, protože umožňují rozlišit etiologii infekce a

posoudit závažnost zánětlivého procesu. Navzdory své senzitivitě se však neopterin v současné době standardně pro diagnostiku sepse a predikce komplikací na jednotkách intenzivní péče nevyužívá, nicméně společně s prokalcitoninem představuje biomarker s velkým potenciálem v intenzivní péči.

### **1.3.9.7 Transplantace**

U pacientů, kteří podstoupili orgánovou transplantaci, se neopterin využívá ke včasnému zjištění rejekce transplantátu (jeho výhodou je zejména možnost neinvazivního vyšetření v moči). Právě elevace neopterinu nás může včas upozornit na riziko rejekce štěpu, tento fenomén byl popsán u transplantací ledvin, jater i srdce. Časný vzestup neopterinu mezi 2. až 7. dnem po transplantaci by měl být chápán jako varovný signál a vést k provedení dalších laboratorních a zobrazovacích vyšetření, naopak úspěšná terapie rejekce imunosupresivy vede ke snížení hladiny neopterinu. Vyšší hladiny neopterinu během pooperačního období predikují kratší přežití štěpu. (132) Monitorace neopterinu může také včas odhalit nástup virové oportunní infekce. (133)

### **1.3.9.8 Autoimunitní choroby**

Hladiny neopterinu korelují s kolísajícím průběhem onemocnění a odrážejí závažnost onemocnění. Monitorace neopterinu může složit k časně detekci relapsu onemocnění.

#### **Revmatoidní artritida**

U pacientů s revmatoidní artritidou byla pozorována korelace mezi neopterinem a aktivitou onemocnění podle škály DAS 28. (134) Neopterin měřený v synoviální tekutině je přesnějším ukazatelem aktivity onemocnění než neopterin v séru. (135)

#### **Sarkoidóza**

U pacientů se sarkoidózou byl neopterin stanovován v kondenzátu vydechovaného vzduchu, což je neinvazivní metoda sloužící k získání sekretu z dýchacích cest u respiračních onemocnění. Výzkum ukázal zvýšení neopterinu u pacientů s aktivní sarkoidózou oproti zdravým kontrolám. (136)

#### **Morbus Crohn a ulcerózní kolitida**

Koncentrace neopterinu v stolici je zvýšena u pacientů s klinicky aktivní Crohnovou chorobou a u pacientů s klinicky aktivní ulcerózní kolitidou ve srovnání s kontrolami, stanovení neopterinu ve stolici představuje další možnost neinvazivního monitorování aktivity

nespecifických střevních zánětů. (137) Fekální neopterin je nový spolehlivý marker pro predikci závažnosti postižení střevní sliznice. (138)

### **Roztroušená skleróza**

U pacientů s roztroušenou sklerózou je v době akutní ataky zvýšena hladina neopterinu v séru. Zvýšené hladiny neopterinu byly zaznamenány i u systémového lupus erythematoses či Wegenerovy granulomatózy, vzhledem k nízké incidenci těchto chorob obsahují soubory maximálně desítky pacientů, což do značné míry limituje interpretaci výsledků. (139)

### **1.3.9.9 Vyšetření zdravých dárců**

Neopterin je vysoce senzitivní, ale málo specifický test pro zjištění aktivace buněčné imunity. Vzhledem k tomu, že elevace neopterinu je přítomna ještě před vznikem specifických protilátek, je velmi vhodný pro testování dárců krve. Hladina neopterinu se zvýší nejen v případě HIV infekce, infekční hepatitidy, CMV infekce ale i u některých autoimunitních chorob a v případě některých maligních tumorů. (140) Jedná se tedy o velmi citlivý test vhodný k rutinnímu užití.

### **1.4.1 Význam neopterinu v onkologii**

Vyšší hodnoty neopterinu v moči u nemocných s nádory byly popsány Wachterem již v roce 1976. (109) Neopterin není tumor markerem v pravém slova smyslu, není produkován vlastními nádorovými buňkami. Nádorové buňky aktivují T-lymfocyty, které produkcí interferonu gamma indukují v makrofázích syntézu neopterinu. V současné době máme k dispozici řadu prací, které potvrzují vyšší tvorbu neopterinu u pacientů napříč mezi solidními i hematoonkologickými malignitami. Obecně zvýšené koncentrace neopterinu v moči a v séru u pacientů s nádory korelují s rozsahem onemocnění a naznačují vyšší riziko progresu choroby a horší prognózu.

#### **1.4.1.1 Monitorace buněčné imunitní odpovědi**

V dnešní době již víme, že imunitní systém v boji proti nádorům zastává duální roli. Na jedné straně se snaží imunitní systém nádor z hostitelského organismu eliminovat či eradikovat zbytkovou nádorovou populaci, na straně druhé byla v některých případech demonstrována podpůrná role imunitního systému, který umožňuje přežití či růst nádorových buněk. Makrofágy představují důležitou buněčnou subpopulaci v mikroprostředí nádoru. Existují dva typy aktivovaných makrofágů, M1 makrofágy vznikající pod vlivem prozánětlivého cytokinu interferonu gamma. M1 makrofágy produkují interleukin-12, který stimuluje T-lymfocyty a



NK buňky a tím podporuje zánětlivý proces. M2 makrofágy vznikají pod vlivem interleukinu-4 a interleukinu-13, jejich hlavní funkcí je napomáhat regeneraci a hojení. M2 makrofágy produkují protizánětlivé cytokiny jako například TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ). Makrofágy infiltrující nádory patří většinou mezi M2 makrofágy, jejich role je spíše negativní, podporují růst nádoru, angiogenezi a metastazování. Právě schopnost vyhnout se akutnímu zánětu, který by nádor eliminoval a schopnost vyvolat zánět chronický jsou další z vlastností nádorové buňky definované v roce 2011 Hanahanem a Weinbergem. (141) Makrofágy můžeme studovat přímo pomocí průtokové cytometrie či imunohistochemie nebo nepřímo prostřednictvím produktů jejich metabolismu. Neopterin je produkován makrofágy po stimulaci interferonem gamma. U pacientů s nádory je produkce neopterinu výsledkem chronické stimulace makrofágů a odráží selhání imunitního systému pacienta při kontrole nádoru.

#### 1.4.1.2 Prognostický význam neopterinu u nemocných s nádory

Koncentrace neopterinu v moči nebo v séru zpravidla koreluje s rozsahem nádorového onemocnění bez ohledu na primární lokalizaci nádoru a má negativní prognostický význam.

Zvýšené hodnoty neopterinu v likvoru byly popsány u pacientů s **primárním lymfomem mozku**. (142,143) U pacientů s **karcinomem hlavy a krku** zvýšené koncentrace neopterinu v moči a snížený retinol v séru predikují špatnou prognózu. (144)

U pacientek s **karcinomem prsu** byly zjištěny zvýšené hodnoty neopterinu v moči u méně než 20 % případů, do jisté míry je to ovlivněno fenotypem nádoru, ale také dalšími faktory například věkem či přítomností komorbidit. Neopterin v moči byl vyšší zejména ve skupině pacientek s přítomností 2 a více komorbidit (například diabetes mellitus, ischemická choroba srdeční, porucha funkce štítné žlázy či hyperlipidémie), které se podílejí na systémové imunitní aktivaci. (145) Míru prognostického významu neopterinu v moči ovlivňuje i fenotyp nádoru, v souboru 456 pacientek s karcinomem prsu byl zaznamenán prognostický význam neopterinu v moči v případě hormonálně dependentního karcinomu prsu nebo u pacientek s karcinomem prsu exprimujícím HER2, u pacientek s triple negativním karcinomem prsu neměl neopterin v moči prognostický význam. (146)

V souboru pacientů s pokročilým **karcinomem žaludku**, neopterin v séru koreloval s dalšími prognostickými znaky (jako věk, stadium, počet postižených lymfatických uzlin, hladina CRP) a celkovým přežitím jako nezávislý prognostický indikátor. Vysoké hladiny neopterinu

v době diagnózy mohou být použity k predikci přežití pacientů s pokročilým karcinomem žaludku. (147)

U pacientů s **primárními i sekundárními nádory jater** byl také potvrzen prognostický význam zvýšených hladin neopterinu v moči, stejně jako u pacientek s karcinomem prsu, byla opět potvrzena signifikantní korelace mezi hladinou neopterinu v moči a věkem pacientů a také negativní korelace mezi koncentrací neopterinu a hemoglobinu. (148)

U karcinomu **slinivky břišní** byly publikovány práce, které využívaly neopterin v séru ke zpřesnění diferenciální diagnostiky pankreatických lézí společně s CA 19-9. Hladina neopterinu korelovala s velikostí tumoru, přítomností vzdálených metastáz a postižením lymfatických uzlin. (149, 150)

U pacientů s **adenokarcinomem rekta** léčených chemoradioterapií byla zvýšená koncentrace neopterinu v séru spojena se statisticky významným nižším přežitím bez relapsu (RFS) a kratším celkovým přežíváním. (151) Další práce, která potvrdila prognostický význam neopterinu v moči zkoumala pacienty s metastatickým kolorektálním karcinomem léčených kombinací cetuximabu s režimem FOLFIRI (5- fluorouracilu, leukovorin, irinotekan). Přežití pacientů s koncentrací neopterinu v moči nad 214  $\mu\text{mol} / \text{mol}$  kreatininu bylo významně nižší ve srovnání s pacienty s počátečním močovým neopterinem pod 214  $\mu\text{mol} / \text{mol}$  kreatininu (medián 10,1 vs. 17,7 měsíců,  $p < 0,05$ ). (152)

### **Gynekologické tumory**

Roli neopterinu napříč spektrem gynekologických malignit sledovalo několik studií, které potvrdily jeho negativní prognostický význam. (153, 154) Neopterin nebyl sledován jen v séru a v moči, byly publikovány i práce, které zkoumaly zvýšení koncentrace neopterinu po intraperitoneálním podání rekombinantního IL-12 v ascitu. (155)

U pacientek s **karcinomem cervixu** byla prokázána významná souvislost mezi koncentrací neopterinu rizikem relapsu či vzdáleného metastazování. (156) Koncentrace neopterinu, hemoglobinu a počtu leukocytů před léčbou společně s věkem v době diagnózy nejlépe předpovídá přežití. Stanovení neopterinu v moči by mohlo být vhodné jako neinvazivní marker pro longitudinální sledování rámci follow up. U pacientek s **karcinomem ovaria** prokázalo longitudinální sledování negativní dopad zvýšené hladiny neopterinu v moči na celkové přežití. Společně s CA 125 nám může stanovení neopterinu před operací pomoci zvýšit senzitivitu pro diagnostiku povahy ovariální léze. (157, 158) U pacientek

s **karcinomem endometria** byla dokumentovaná závislost mezi koncentrací neopterinu v moči a stadiem nemoci (stadium I, II vs. III a IV), neopterin společně s CA 125 má význam prognostický. (159)

Inhalační podávání IL-2 u pacientů s **karcinomem ledviny** a plicními metastázami nevedlo k signifikantnímu zvýšení neopterinu v moči ani k systémové toxicitě, opět byl potvrzen negativní prognostický význam vysokých hodnot neopterinu v moči. (160)

Neopterin byl také hodnocen u pacientů s biochemickým relapsem **karcinomu prostaty** po radikální prostatektomii, kde vyšší hodnoty neopterinu v séru byly spojeny s vyšší úmrtností na progresi onemocnění, tato studie podporuje stanovení neopterinu v séru v rámci follow up, kdy pomůže stratifikovat pacienty do rizikových skupin. (161)

## **Melanom**

U pacientů s kožním melanomem byl dosud neopterin zkoumán jen v souvislosti s léčbou cytokiny či chemoterapií, data u pacientů s metastatickým melanomem léčeným ipilimumabem jsou uvedena v praktické části. V souladu s ostatními malignitami i u této diagnózy byl popsán negativní prognostický význam vyšší hladiny neopterinu v séru. (163) Další práce se zabývala sledováním neopterinu v moči jako markeru imunitní aktivace u pacientů léčených kombinovanou intraarteriální chemoterapií posílenou o podávání cytokinů. (164) Zvýšená koncentrace neopterinu v séru i v moči byla popsána nejen u pacientů s kožním melanomem, ale i u pacientů s uveálním melanomem. (165)

### **1.3.9.3 Využití neopterinu ke sledování účinku protinádorové terapie**

Při dobré odpovědi na protinádorovou terapii dochází k poklesu neopterinu v séru i v moči. V rámci follow up pacientů po léčbě by zvýšené hodnoty neopterinu měly vést k dalším diagnostickým vyšetřením zaměřeným na případnou detekci recidivy.

### **1.3.9.4 Využití neopterinu k monitoraci toxicity protinádorové terapie**

U pacientů s nádory hlavy a krku léčených chemoradioterapií vzestup koncentrace neopterinu v moči predikuje rozvoj toxicity radioterapie. Horní GIT toxicita se rozvinula v průměru za šest dní po vzestupu neopterinu v moči, nauzea se rozvinula v průměru za osm dní. (166)

### **1.3.9.5 Využití neopterinu jako prediktoru vzniku imunitně podmíněných nežádoucích účinku u pacientů léčených checkpoint inhibitory**

Imunoterapie je v současné době nejrychleji se rozvíjející se oblastí onkologie, během posledních několika let se počet indikací imunoterapie prudce zvyšuje. Dá se říct, že se tato metoda v onkologii již plně emancipovala. S rostoucím počtem léčených pacientů, jdou ruku v ruce nežádoucí účinky, stále „objevujeme“ nové a nové imunitně podmíněné nežádoucí účinky, neustále se učíme, jak je nejlépe a nejrychleji diagnostikovat a jak je účinně léčit. A právě v diagnostice imunitně podmíněných nežádoucích účinků našel neopterin, své další, možná nevýznamnější, uplatnění. Jak ukazujeme v praktické části, vzestup hladiny neopterinu predikuje vznik imunitně podmíněných nežádoucích účinků dříve, než se klinicky projeví. Zároveň po zaléčení dochází rovněž poklesu neopterinu v séru, což je důležité zejména při longitudinálním sledování, kdy může předpovědět rekurenci imunitně podmíněných nežádoucích účinků. Podrobněji je tato problematika rozebrána v praktické části.

### **1. 3. 9.6 Závěr**

Přestože od objevení zvýšených koncentrací neopterinu u pacientů s maligními nádory uběhly více než čtyři desetiletí, dosud nebyl plně využit potenciál neopterinu jako biomarkeru v onkologii. Jak je demonstrováno v praktické části zvyšující se koncentrace neopterinu také doprovázejí vedlejší účinky protinádorové léčby a mohou předpovídat následné komplikace.

## PRAKTICKÁ ČÁST

### 2.1. Využití neopterinu jako biomarkeru toxicity imunoterapie

V současné době probíhá velmi intenzivní výzkum na poli prediktivních biomarkerů léčebné odpovědi na imunoterapii. Už daleko méně pozornosti je věnováno možnostem predikce toxicity imunoterapie. V našem souboru využíváme neopterin jako prediktor vzniku imunitně podmíněných nežádoucích účinků.

#### 2.1.1. Pilotní studie - Kazuistika neočekávaný nežádoucí účinek nivolumabu

Prezentujeme zde případ 44letého muže, kterému byl v únoru 2017 diagnostikován karcinom jazyka, na základě zobrazovacích metod, klinického vyšetření a histologické verifikace byla stanovena diagnóza invazivní rohovějící spinocelulární karcinom jazyka T1N0M0, stadium I, grade 2. V únoru 2017 pacient podstoupil radikální operaci, která zahrnovala parciální glosektomii a ipsilaterální disekci spádových lymfatických uzlin, rovněž byla zavedena perkutánní endoskopická gastrostomie. V říjnu 2017 CT vyšetření potvrdilo lokální relaps onemocnění, pacient byla provedena resekce recidivy tumoru v oblasti pravé podčelistní krajiny. Od listopadu 2017 do prosince 2017 byl léčen radikální chemoradioterapií, celková ložisková dávka 70Gy, konkomitantně byla podávána cisplatina v dávce 100mg/m<sup>2</sup> v intervalu á 21 dnů. V únoru 2018 CT vyšetření prokázalo lokální perzistenci onemocnění. V březnu 2018 došlo k masivnímu krvácení z metastáz v krčních uzlinách, pacient podstoupil akutní chirurgický výkon, který zahrnoval parciální resekci recidivy tumoru a založení tracheostomie.

I přes akutní operační výkon, byl pacient v dobrém klinickém stavu (performance status 1), neměl závažné komorbidity, vzhledem k rychlé progresi onemocnění po chemoradioterapii s platinovým derivátem a na základě výsledků klinických studií s imunoterapií ve 2. linii u pacientů s nádory hlavy a krku, byla podána žádost reviznímu lékaři o schválení nivolumabu v první linii. V dubnu 2018 byl podán 1. cyklus nivolumabu v dávce 3mg/kg v intervalu á 21 dnů. Pacient měl hodnoty krevního obrazu v normě (leukocyty 5,29x10<sup>9</sup>/l, ANC 4,57x10<sup>9</sup>/l), hodnota neopterinu v séru byla 5,32 ug/l. V den podání 2. cyklu nivolumabu byl neopterin v séru byl 11,80 ug/l.

Pět dnů po podání druhého cyklu nivolumabu byl pacient přijatý pro zhoršení celkového stavu, při přijetí byl pacient hypotenzní TK 90/60, puls 134/min, teplota 38,3°C performance status 2. V krevním obraze dominovala hluboká neutropenie (leukocyty 0,28 x10<sup>9</sup>/l, ANC

0,01x10<sup>9</sup>/l), dále bylo zvýšené CRP (294 mg/l) a prokalcitonin (5,18 ug/l). Na základě klinického vyšetření a laboratorních nálezů byla stanovena diagnóza febrilní neutropenie, MASCC high risk (13 bodů). Pacientovi byly odebrány hemokultury, stěry z dutiny ústní a okolí gastrostomie, odebrána moč na kultivaci, byl proveden rentgen hrudníku, bez průkazu zánětlivé infiltrace. Byla zahájena empirická antibiotická léčba kombinací piperacilin/tazobaktam (3x4,5g) a gentamicin (1x240mg), a začaly být podávány růstové faktory myeloidní řady (Zarzio 48MU).

Třetí den hospitalizace na základě pozitivních výsledků hemokultur (*Escherichia coli*) byla upravena cílená antibiotická terapie na meropenem (3x1g), jako profylaxe kandidových infekcí u pacientů s prolongovanou neutropenií bylo do medikace přidáno antimykotikum flukonazol (1x200mg). V krevním obraze byla stále hluboká neutropenie a leukopenie, pro anémii stupně čtyři (Hb58g/l) byl podány tři jednotky erymasy, nově se objevila trombocytopenie stupně tři (33x10<sup>9</sup>/l). Nadále byly podávány růstové faktory myeloidní řady.

Pátý den hospitalizace se objevil ikterus, celkový bilirubin 102 μmol/l, v diferenciální diagnostice byla zvažována imunitně podmíněná hepatitida či reaktivace infekce v terénu hluboké neutropenie, byly odebrány sérologie na infekční hepatitidy (hepatitida B, hepatitida C), dále na cytomegalovirus a Epstein-Barrové virus. Pro podezření na imunitně podmíněnou hepatitidu bylo zahájeno podávání metylprednisolonu v dávce 2mg/kg.

V rámci diferenciální diagnostiky protrahované hematologické toxicity nereagující na podávání růstových faktorů myeloidní řady, byla provedena sternální punkce, s nálezem těžce hypocelulární kostní dřeně, prekuzory granulopoézy nebyly nalezeny, megakaryopoéza téměř nebyla nezastižena, erytropoéza byla zastoupena. Na základě některých publikovaných prací byla zvažována imunitně podmíněná agranulocytóza jako vzácný imunitně podmíněný nežádoucí účinek. (77) Pro suspektní cytomegalovirovou infekci (pozitivní sérologie) byl do medikace přidán ganciklovir (2x5mg/kg).

Patnáctý den hospitalizace se objevila opět horečka, laboratorně došlo k elevaci CRP (204,3mg/l) antibiotická léčba byla změněna na tigecyklin (2x100mg), hladina bilirubinu se normalizovala, v krevním obraze přetrvávala hluboká neutropenie a leukopenie. Pacient stále dostával methylprednisolon (2mg/kg) a růstové faktory myeloidní řady.

Osmnáctý den hospitalizace byl v séru detekován galaktomanan, ve sputu byl potvrzen nález vláknité houby identifikované jako *Aspergillus flavus* a do medikace byl přidán vorikonazol 2x4mg/kg (nasyčovací dávka 2x6mg/kg). Devatenáctý den byla provedena trepanobiopsie

s nálezem normo, místy i hypercelulární kostní dřeně, granulopoéza vyžrávala pouze ložiskově, počet prekurzorových CD 34<sup>+</sup> elementů byl v normě. Nález byl uzavřen jako myelodysplastický syndrom s multilineální dysplazií.

Dvacátý den došlo v krevním obraze k mírnému zlepšení hematologické toxicity ze stupně čtyři na stupeň tři (ANC 0.67x10<sup>9</sup>/l , leukocyty 1.10<sup>9</sup>/l ), trombocyty v mezích normy (162x10<sup>9</sup>/l ). Časová souvislost mezi podáním nivolumabu a rozvojem neutropenie a rovněž zlepšení nálezu v krevním obraze po podávání kortikoidů nás nutí pomýšlet na autoimunitě podmíněnou inhibici myelopoézy.

Dvacátý první den hospitalizace pacient zemřel na akutní krvácení při recidivujícím karcinomu jazyka. Pitevní nález potvrdil rekurenci spinocelulárního karcinomu s metastaticky postiženými regionální uzlinami, které měly intimní vztah k pravé arterii carotis communis. Jako bezprostřední příčinu úmrtí pitva stanovila masivní aspiraci krve, při krvácení z arodované tepny. Vedlejší nálezem byla invazivní plicní aspergilóza, způsobující nekrotizující pneumonii, mikroskopicky nález byl typický pro aspergilózu, v preparátu byly přítomny typická septovaná vlákna s dichotomickým větvením (barvení dle Grocotta).

## **Diskuze**

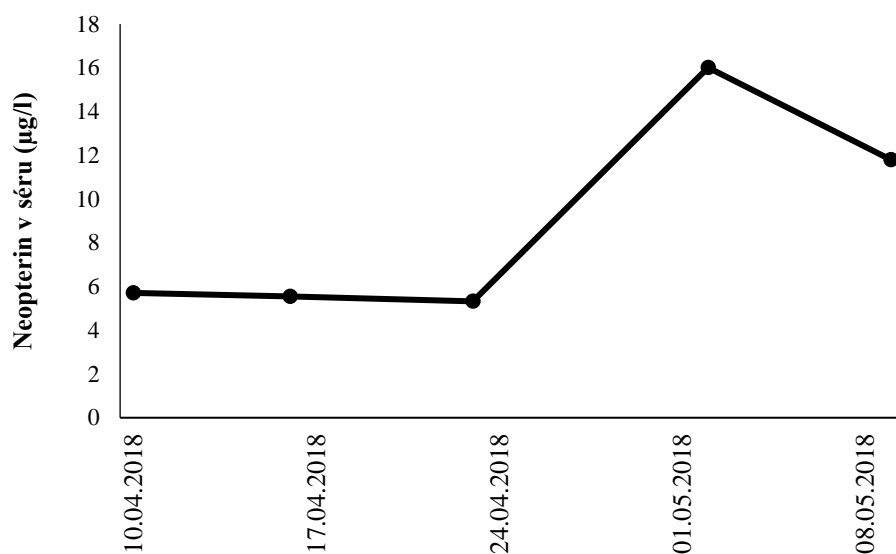
Neutropenie je očekávaným nežádoucím účinek při léčbě cytostatiky, ale při léčbě imunoterapií se jedná o raritní nežádoucí účinek. Metaanalýza zahrnující 9324 pacientů léčených ve 47 studiích, zaznamenala incidenci neutropenie stupně tři až pět u 0,94 % pacientů, incidence febrilní neutropenie byla 0,45 %. Incidence imunitně podmíněné neutropenie bývá vyšší u kombinovaných režimů (4 % vs. 1 %), objevuje se časně po zahájení imunoterapie a bývá často sdružena s jinými imunitně podmíněnými nežádoucími účinky.

(77) Mezi další imunitně podmíněné hematologické nežádoucí účinky, které byly publikovány, patří například čistá aplazie červené řady či aplastická anémie. (167, 168, 169)

Patogeneze imunitně podmíněné neutropenie zůstává nejasná. Aktivované T-lymfocyty mohou napadat hematopoetické kmenové buňky, tato skutečnost se projeví obrazem hypocelulární kostní dřeně při sternální punkci či trepanobiospii. Kortikosteroidy jsou hlavním lékem při terapii imunitně podmíněných nežádoucích účinků. V případě terapie neutropenie byla publikována i práce s podáním intravenózních imunoglobulinů, jednalo se ovšem o pacienta s hematoonkologickou malignitou. (170) Na základě našich zkušeností se jeví, že k odpovědi na kortikoidy dochází až po delší době. Fakt, že pacient je dlouhodobě neutropenický klade velký důraz na podpůrnou péči, při dlouhodobé kortikoterapii je nutné

podávat profylaxi *Pneumocytis jiroveci*. Je pravděpodobné, že s rostoucím počtem indikací imunoterapie a s příchodem kombinovaných imunoterapeutických režimů se budeme s vzácnými imunitně podmíněnými nežádoucími účinky setkávat mnohem častěji. Zatím máme pouze omezené množství informací, která vycházejí většinou z kazuistických sdělení. Pacient byl léčen v minulosti chemoradioterapií s cisplatinou. Souvislost mezi předchozím poškozením kostní dřeně indukovaným chemoradioterapií a následným poškozením aktivovanými T-lymfocyty nelze vyloučit.

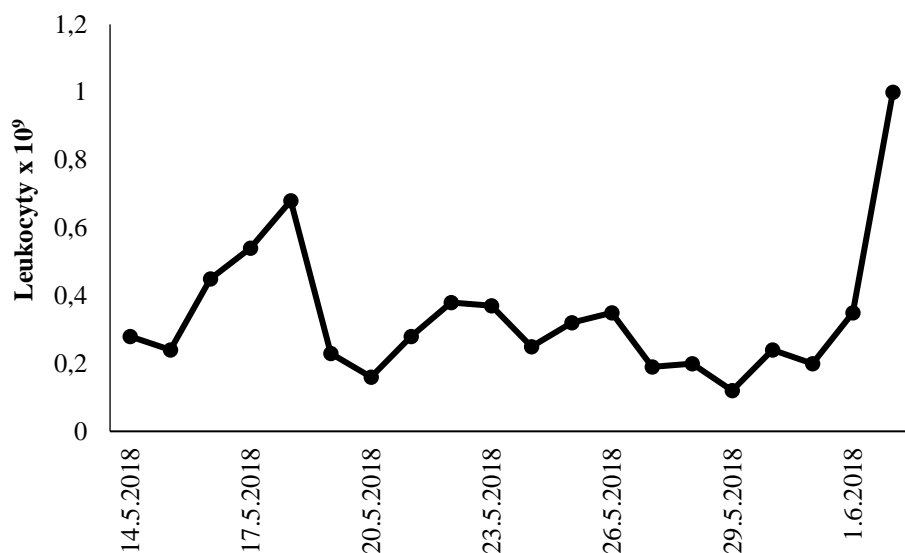
Biomarkery mají klíčovou roli v léčbě onkologicky nemocných, tato práce naznačuje, že by mohly identifikovat ty pacienty, kteří mají vyšší riziko vzniku imunitně podmíněných nežádoucích účinků ještě před tím, než se budou klinicky či laboratorně manifestovat. Souvislost mezi podáním nivolumabu a vzestupem neopterinu v séru, který předcházel vývoji neutropenie a faktem, že hladina neopterinu je zvýšena u autoimunitních onemocnění jsme došli k závěru, že neopterin by mohl predikovat vznik imunitně podmíněných nežádoucích účinků. Tuto hypotézu jsme dále rozpracovali v dalším souboru pacientů.



**Graf 1: Vzestup neopterinu v séru po podání nivolumabu předchází rozvoji agranulocytózy.**

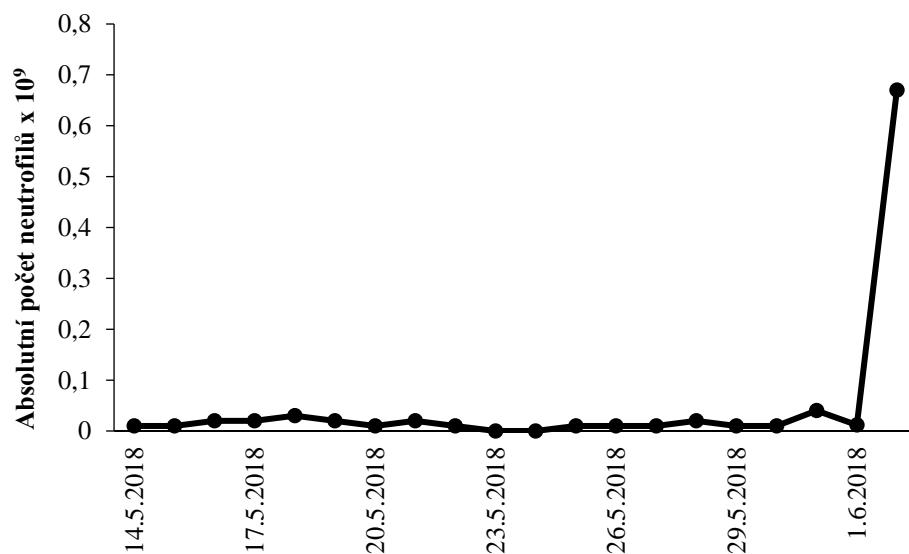
Převzato z: Febrile neutropenia complicating nivolumab therapy: a case report and review of the literature.





**Graf 2: Vývoj leukopenie v průběhu terapie kortikosteroidy. Dvacátý den hospitalizace dochází k nárůstu počtu leukocytů.**

Převzato z: Febrile neutropenia complicating nivolumab therapy: a case report and review of the literature.



**Graf 3: Absolutní počet neutrofilů v průběhu terapie kortikosteroidy. Dvacátý den hospitalizace dochází k nárůstu absolutního počtu neutrofilů.**

Převzato z: Febrile neutropenia complicating nivolumab therapy: a case report and review of the literature.

### **Případ 2.1.2 Kazuistika - Neopterin a imunitně podmíněné nežádoucí účinky postihující více orgánů u pacienta léčeného kombinovanou imunoterapií**

Následující kazuistika prezentuje případ 59letého pacienta s pokročilým světlobuněčným renálním karcinomem pravé ledviny s nádorovým trombem vena renalis a s masivní lymfadenopatií interaortokaválně. Pacient podstoupil v září 2019 neradikální operaci, kdy byl proveden cytoredukční výkon, s trombektomií a parciální lymfadenektomií. Nález byl klasifikován jako pT3b pN1, grade 4. Následující CT vyšetření prokázalo progredující lymfadenopatii v retroperitoneu, scintigrafie skeletu prokázala zvýšení kostní přestavby v sedací kosti vlevo suspektní z metastatického postižení. Jednalo se o pacienta se střední prognózou dle IMDC kritérií.

Pacient byl indikován k 1. linii léčby kombinovanou imunoterapií. Dne 16. 10. 2019 byla podána první dávka kombinované imunoterapie (ipilimumab 3mg/kg, nivolumab 1mg/kg), před zahájením a v průběhu imunoterapie byl pravidelně odebírán neopterin v séru.

Dne 4. 12. 2019 po třetí dávce kombinované imunoterapie, byl pacient hospitalizován na jednotce intenzivní péče pro akutní kolitidu stupně tři a akutní pankreatitidu (dle CT Balthazar B, laboratorně alfa-amyláza 7,54  $\mu$ kat/l a lipáza  $\geq 50$   $\mu$ kat/l). Stav uzavřen jako mnohočetné imunitně podmíněné nežádoucí účinky při kombinované imunoterapii, u pacienta byla zahájena kortikoterapie prednisonem v dávce 1mg/kg, během několika dnů došlo k normalizaci laboratorních nálezů a zlepšení klinického stavu, pacient byl propuštěn na perorální kortikoterapii (prednison 60mg 1x denně).

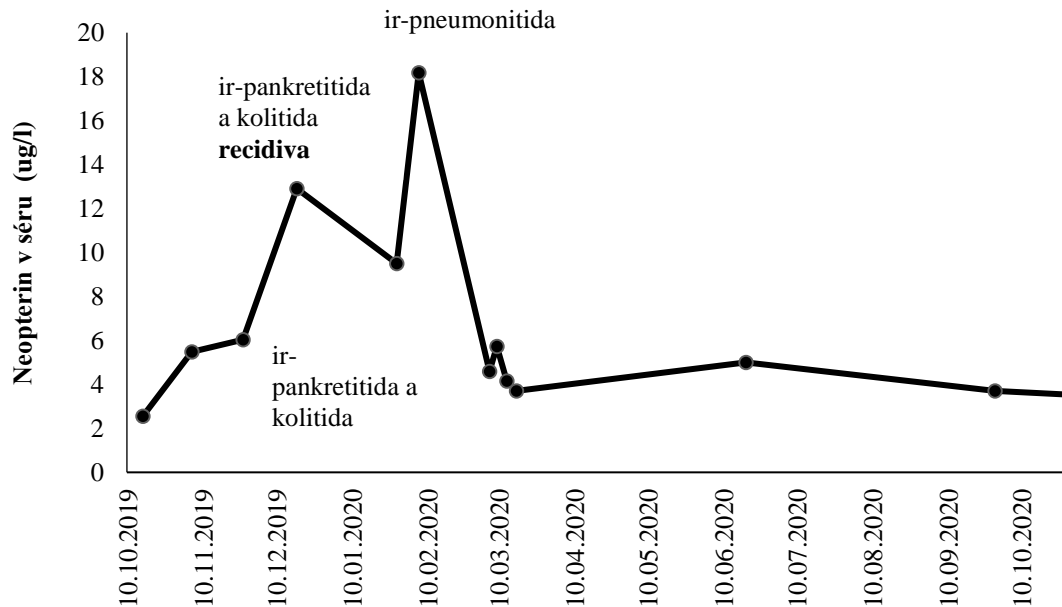
Dne 26. 12. 2019 byl pacient opět hospitalizován na jednotce intenzivní péče pro recidivu kolitidy (15 stolic/den) a pankreatitidy (alfa-amyláza 7,8  $\mu$ kat/l a lipáza 32,24  $\mu$ kat/l) při snižování kortikoterapie. Pacient podstoupil koloskopii, která prokázala pankolitidu s maximem v levém tračníku. Pacient byl zaléčen solumedrolem v dávce 2mg/kg. Během několika dní opět došlo ke zlepšení klinického stavu a normalizaci laboratorních parametrů.

Dne 6. 3. 2020 byl pacient přijat pro nově vzniklou dušnost, v diferenciální diagnostice byly vyloučeny infekční příčiny (včetně atypických agens), kardiální etiologie (EKG bez známek ischemie, negativní troponin a nízké NT-pro BNP), dále byla zvažována imunitně podmíněná pneumonitida, bylo doplněno HRCT, kde byly popsány splývající opacity mléčného skla, převaha změn byla centrilobulárně. Vzhledem k diagnóze imunitně podmíněné pneumonitidy a recidivě imunitně podmíněných nežádoucích účinků byla zahájena terapie imunosupresivy druhé linie (mykofenolát mofetil 2x 1G) za monitorace hladin, dále byl do medikace nasazen

Biseptol jako profylaxe pneumocystová pneumonie. Po zahájení podávání mykofenolát mofetilu došlo k rychlému ústupu potíží.

Dne 19. 6. 2020 CT vyšetření prokázalo patologicky zvětšenou lymfatickou uzlinu v oblasti vena subclavia, následná biopsie potvrdila metastázu světlobuněčného renálního karcinomu.

Dne 4. 9. 2020 byla zahájena druhá linie terapie cabozantinibem (60mg 1x denně).



**Graf 4: Opakované vzestupy neopterinu v séru po podání kombinované imunoterapie předchází rozvoji imunitně podmíněných nežádoucích účinků, po zalečení kortikoidy a mykofenolát mofetilem vidíme pokles neopterinu v séru.**

Tato kazuistika prezentuje senzitivitu neopterinu v predikci imunitně podmíněných nežádoucích účinků a zároveň demonstruje rozmanitost a nepředvídatelnost komplikací imunoterapie stejně jako význam podpůrné léčby. Navzdory imunitně podmíněným nežádoucím účinkům postihujícím více orgánů, nebyla léčebná odpověď u toho pacienta dlouhodobá a sedm měsíců po ukončení imunoterapie došlo k progresi nádorového onemocnění.

## **2.1.3 Neopterin jako biomarker imunitně podmíněných nežádoucích účinků**

### **Úvod**

Imunoterapie se poslední dekádě stala velmi významnou součástí protinádorové léčby. V současné době se imunoterapie používá u celého spektra nádorových onemocnění buď v monoterapii nebo v kombinacích s jinými modalitami protinádorové léčby (cílená terapie, chemoterapie). Na rozdíl od konvenční chemoterapie se imunoterapie vyznačuje jiným mechanismem účinku i jinými nežádoucími účinky (imunitně podmíněné nežádoucí účinky). S rostoucím počtem pacientů léčených imunoterapií, zejména kombinovanými režimy (monoklonální protilátky proti PD-1/PD-L1 v kombinaci s monoklonální protilátkou proti CTLA-4 receptoru) narůstá i počet pacientů, kteří trpí imunitně podmíněnými nežádoucími účinky. Právě management toxicity imunitně podmíněných nežádoucích účinků a jejich eventuální predikce představuje v onkologii velkou výzvu. Neopterin je sice nespecifickým biomarkerem aktivace imunitního systému, ale v souvislosti s podáním imunoterapie se zdá být velmi cenným prediktorem toxicity.

#### **2.1.3.1 Charakteristika souboru a metodika**

V našem souboru bylo 35 pacientů léčených na Onkologické klinice Fakultní nemocnice Olomouc od roku 2011 dosud. Pacienti byli léčeni checkpoint inhibitory jako standardní léčbou, léčbou v rámci klinické studie či v rámci programu rozšířeného přístupu. V průběhu léčby byla zaznamenána alespoň jedna epizoda imunitně podmíněného nežádoucího účinku. Imunitně podmíněné nežádoucí účinky byly hodnoceny podle NCI-CTCAE 5.0. Dále byl stanovován neopterin v séru pomocí imunoeseje. První hodnota neopterinu byla u většiny pacientů (n = 31) stanovena před zahájením imunoterapie a následně byl stanovován neopterin v průběhu léčby. V našem souboru bylo 10 žen a 25 mužů. V souboru bylo nejvíce pacientů s renálním karcinomem (n = 14), dále s maligním melanomem (n = 13), čtyři pacienti s nemalobuněčným karcinomem plic, jedna pacientka měla triple negativní karcinom prsu, jeden pacient měl kolorektální karcinom a dva pacienti měli nádor hlavy a krku. Průměrný věk byl 64 let. Nejvíce pacientů bylo léčeno nivolumabem v monoterapii (n = 19), dále ipilimumabem v monoterapii (n = 5), dva pacienti byli léčeni pembrolizumabem, sedm pacientů bylo léčeno kombinací ipilimumabu a nivolumabu, jeden pacient byl léčen kombinací axitinibu s pembrolizumabem, jeden kombinací cabozantinibu s nivolumabem.

Jako kontrolní skupina sloužili pacienti s podobným spektrem solidních nádorů odpovídajícího věku a pohlaví. V kontrolní skupině bylo 12 žen a 23 mužů. Nejvíce pacientů

mělo renální karcinom (n =13), dále maligní melanom (n = 20), dva pacienti měli nemalobuněčný karcinom plic. Pacienti byli léčeni nivolumabem v monoterapii. Průměrný věk byl 65 let. Výzkum byl součástí projektu schváleného Etickou komisí Fakultní nemocnice Olomouc a pacienti podepsali informovaný souhlas.

	Imunitně podmíněné nežádoucí účinky (n=35)	Kontrolní skupina (n=35)
Věk ( průměrný věk ± SD v letech)	64 ± 10	65 ± 13
Ženy (n; %)	10 (29)	12 (34)
Primární nádor (n; %)		
<b>Renální karcinom</b>	14 (40)	13 (37)
<b>Melanom</b>	13 (37)	20 (57)
<b>Nemalobuněčný karcinom plic</b>	4 (11)	2 (6)
<b>Karcinom prsu</b>	1 (3)	0
<b>Kolorektální karcinom</b>	1 (3)	0
<b>Nádory hlavy a krku</b>	2 (6)	0

**Tabulka 7: Charakteristika souboru pacientů s imunitně podmíněnými nežádoucími účinky a pacientů z kontrolní skupiny (dle věku, pohlaví a primárního tumoru).**

<b>lék</b>	<b>N</b>
nivolumab	19
ipilimumab	5
pembrolizumab	2
ipilimumab plus nivolumab	7
axitinib plus pembrolizumab	1
cabozantinib plus nivolumab	1

**Tabulka 8: Charakteristika souboru pacientů s imunitně podmíněnými nežádoucími účinky (dle léčebného režimu).**

### 2.1.3.2 Výsledky

Dvanáct pacientů mělo imunitně podmíněné nežádoucí účinky stupně jedna až dva, dvacet tři pacientů mělo imunitně podmíněné nežádoucí účinky stupně tři až pět, dva pacienti zemřeli na následky toxicity imunoterapie. Mezi nejčastější imunitně podmíněné nežádoucí účinky patřily průjmy (n = 9), dále pneumonitida (n = 5), artritida (n = 4), nefritida (n = 3), hypotyreóza (n = 3), pruritus (n = 3), v jednom případě byla diagnostikována hepatitida, agranulocytóza, hypertyreóza, hypotyreóza, hypokortikalismus, hypopituitarismus a psoriáza. Dva pacienti léčeni kombinovaným režimem (ipilimumab plus nivolumab) měli

multiorgánové postižení (v jednom případě hypotyreóza, artritida, hepatitida, u druhého pacienta se objevila kolitida, pankreatitida a pneumonitida). (tabulka 9)

Imunitně podmíněný nežádoucí účinek	Celkový počet	Stupeň 1-2	Stupeň 3-5
průjmy	9	1	8
pneumonitida	5	2	3
artritida	4	1	3
nefritida	3	0	3
hypotyreóza	3	3	0
pruritus	3	2	1
hepatitida	1	0	1
neutropenie	1	0	1
hypertyreóza	1	1	0
hypokortikalismus	1	1	0
hypopituitarismus	1	0	1
psoriasis	1	1	0
postižení více než jednoho orgánu	2	0	2
Všichni pacienti	35	12	23

**Tabulka 9. Typy imunitně podmíněných nežádoucích účinků.**

Ve srovnání s kontrolami byla významně zvýšena koncentrace neopterinu v séru u pacientů s imunitními nežádoucími účinky. Významné zvýšení bylo patrné jak u pacientů s imunitně podmíněnými nežádoucími účinky stupně 1 až 2, tak u pacientů s imunitně podmíněnými nežádoucími příhodami stupně 3 až 5 (tabulka 10). Sérový neopterin v době imunitně podmíněných nežádoucích účinků byl významně vyšší u pacientů se stupněm 3 až 5 ve srovnání s událostmi stupně 1 až 2 ( $p < 0,025$ ). Byla pozorována slabá, ale statisticky významná korelace mezi koncentrací neopterinu v séru v době události a stupně události ( $r_s = 0,349$ ;  $p < 0,05$ ). Koncentrace neopterinu v době imunitně podmíněných nežádoucích účinků byly významně vyšší u pacientů, kteří byli hospitalizováni ( $13,7 \pm 8,2$  vs.  $6,6 \pm 6,3$   $\mu\text{g} / \text{l}$ ;  $p < 0,003$ ).

Z 35 pacientů s imunitními nežádoucími účinky bylo u 31 pacientů k dispozici dřívější měření neopterinu v séru před zahájením imunoterapie. Ve srovnání s tímto základním měřením byla koncentrace neopterinu v séru významně zvýšena v době vzniku imunitně podmíněné nežádoucí příhody ( $11,1 \pm 8,6$  vs.  $5,0 \pm 4,9$   $\mu\text{g} / \text{l}$ ;  $p < 0,00001$ ). Zvýšení bylo patrné u pacientů s příhodami stupně 3 až 5 ( $12,1 \pm 8,7$  vs.  $5,6 \pm 5,8$   $\mu\text{g} / \text{l}$ ;  $p < 0,0001$ ) a také u pacientů s příhodami stupně 1 až 2 ( $7,7 \pm 7,5$  vs.  $4,1 \pm 3,0$   $\mu\text{g} / \text{l}$ ;  $p < 0,025$ ).

U celkem 22 pacientů došlo k zotavení z imunitně podmíněného nežádoucího účinku. Střední doba do zotavení byla 315 dní. Sedmnáct pacientů, kteří se zotavili, mělo v době zotavení stanovenou hodnotu neopterinu v séru. Ve srovnání s koncentracemi neopterinu v době imunitně podmíněného nežádoucího účinku bylo pozorováno snížení hraniční významnosti pouze u 7 pacientů s toxicitou stupně 3 až 5 ( $8,3 \pm 8,9$  vs.  $12,4 \pm 8,5$   $\mu\text{g/l}$ ;  $p = 0,05$ ), zatímco u pacientů s příhodami stupně 1 až 2 ( $4,6 \pm 1,7$  vs.  $5,2 \pm 2,4$   $\mu\text{g/l}$ ) a u všech 17 pacientů ( $6,1 \pm 5,9$  vs.  $8,2 \pm 6,6$   $\mu\text{g/l}$ ) nebyl pozorován žádný významný rozdíl.

U pacientů s dostupnými měřeními byly koncentrace neopterinu v době zotavení významně zvýšeny v době zotavení ve srovnání se zahájením léčby ( $6,2 \pm 6,3$  vs.  $4,6 \pm 6,6$   $\mu\text{g/l}$ ;  $p < 0,005$ ). Tento nárůst byl patrný jak u pacientů s příhodami stupně 3 až 5 ( $8,5 \pm 9,8$  vs.  $7,1 \pm 10,3$   $\mu\text{g/l}$ ;  $p < 0,05$ ), tak i u pacientů s příhodami stupně 1 ( $4,7 \pm 1,8$  vs.  $3,0 \pm 1,3$   $\mu\text{g/l}$ ;  $p < 0,05$ ).

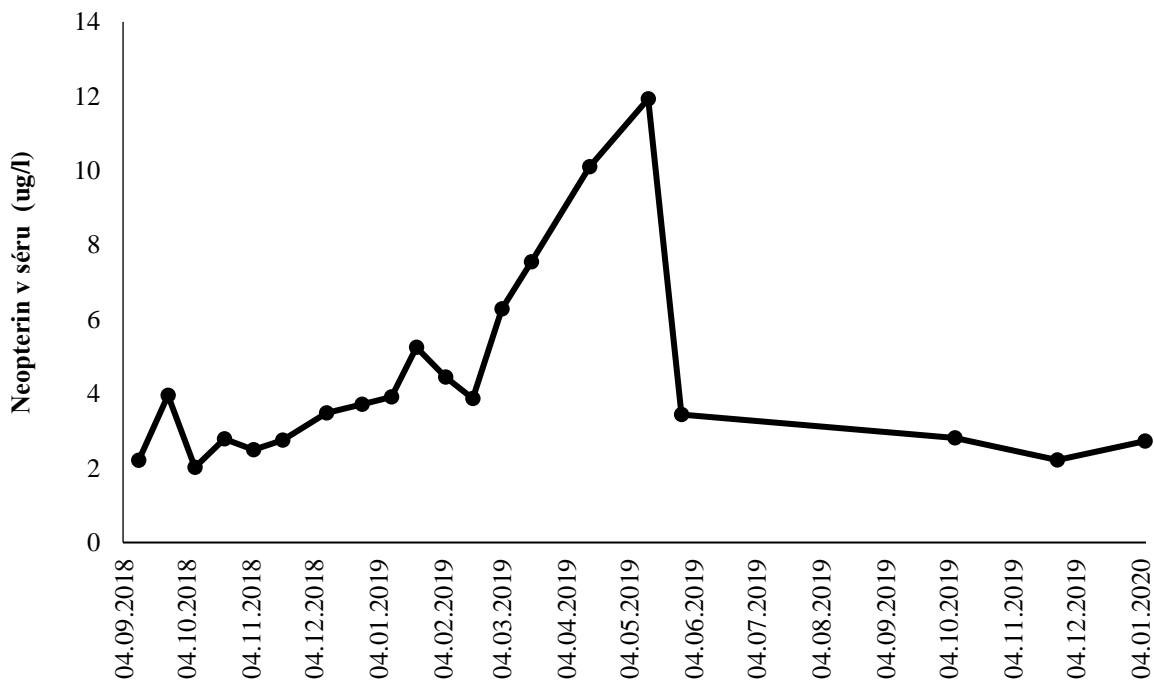
Medián celkového přežití od začátku léčby byl 19,7 měsíce. Nebyl pozorován žádný statisticky významný rozdíl mezi pacienty se stupněm toxicity 1 až 2 ve srovnání s toxicitou stupně 3 až 5 (medián 19,6 vs. 23,5 měsíce).

Kohorta	neopterin v séru (průměr $\pm$ SD; $\mu\text{g/l}$ )	p srovnání s kontrolní skupinou
Kontrolní skupina	$4.0 \pm 2.9$	
Před zahájením léčby		
Imunitně podmíněné nežádoucí účinky (n=31)	$5.0 \pm 5.0$	0.298
stupeň 1-2 (n=11)	$4.1 \pm 3.0$	0.718
stupeň 3-5 (n=20)	$5.6 \pm 5.8$	0.245
V době vzniku imunitně podmíněného nežádoucího účinku		
všichni pacienti (n=35)	<b><math>10.5 \pm 8.1</math></b>	<b>0.00001</b>
stupeň 1-2 (n=13)	<b><math>7.5 \pm 7.1</math></b>	<b>0.034</b>
stupeň 3-5 (n=22)	<b><math>12.3 \pm 8.3</math></b>	<b>0.000004</b>
V čase zotavení		
Imunitně podmíněné nežádoucí účinky (n=15)	<b><math>6.5 \pm 6.2</math></b>	<b>0.019</b>
stupeň 1-2 (n=8)	$4.9 \pm 1.8$	0.101
stupeň 3-5 (n=7)	<b><math>8.3 \pm 8.9</math></b>	<b>0.048</b>

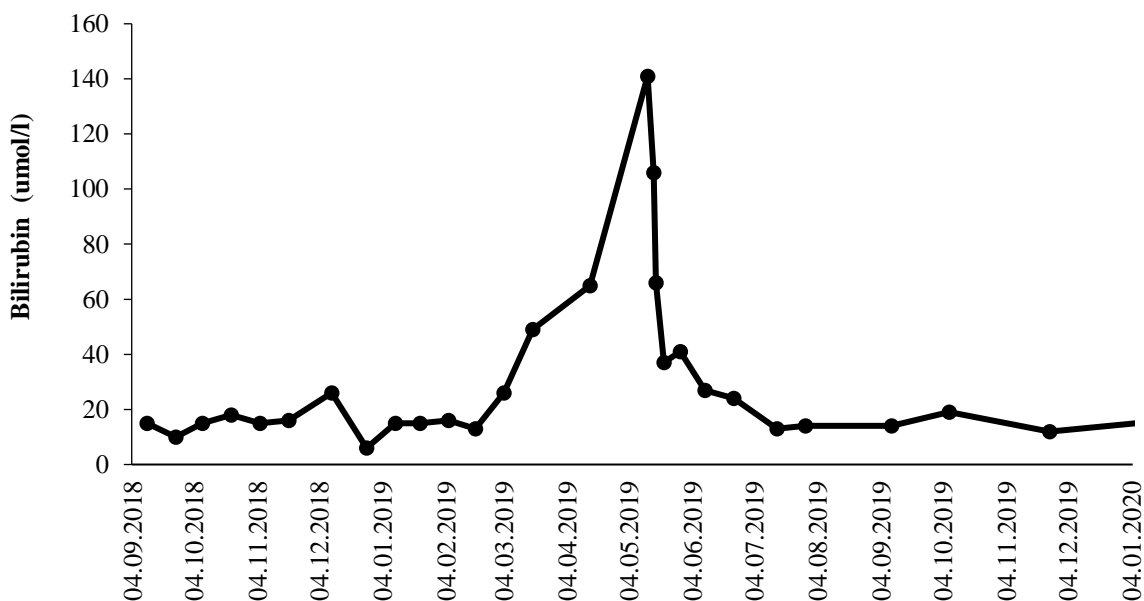
**Tabulka 10: Srovnání neopterinu v séru u pacientů s imunitně podmíněnými nežádoucími účinky a kontrolní skupinou v průběhu imunoterapie. Statisticky významné rozdíly jsou zvýrazněny.**

## Následující grafy zobrazují dynamiku neopterinu u jednotlivých pacientů

Pacient s metastatickým maligním melanomem, primárně melanom meningů, BRAF wild type. Byl léčen nivolumabem od 11. 9. 2018 do 13. 5. 2019. Léčba byla trvale ukončena pro imunitně podmíněnou hepatitidu.



Graf 5: Vzestup neopterinu v době vzniku imunitně podmíněné hepatitidy a následný pokles po zaléčení kortikoidy.



Graf 6: Vzestup vzestup bilirubinu při vzniku imunitně podmíněné hepatitidy s postupnou normalizací po zaléčení kortikoidy.

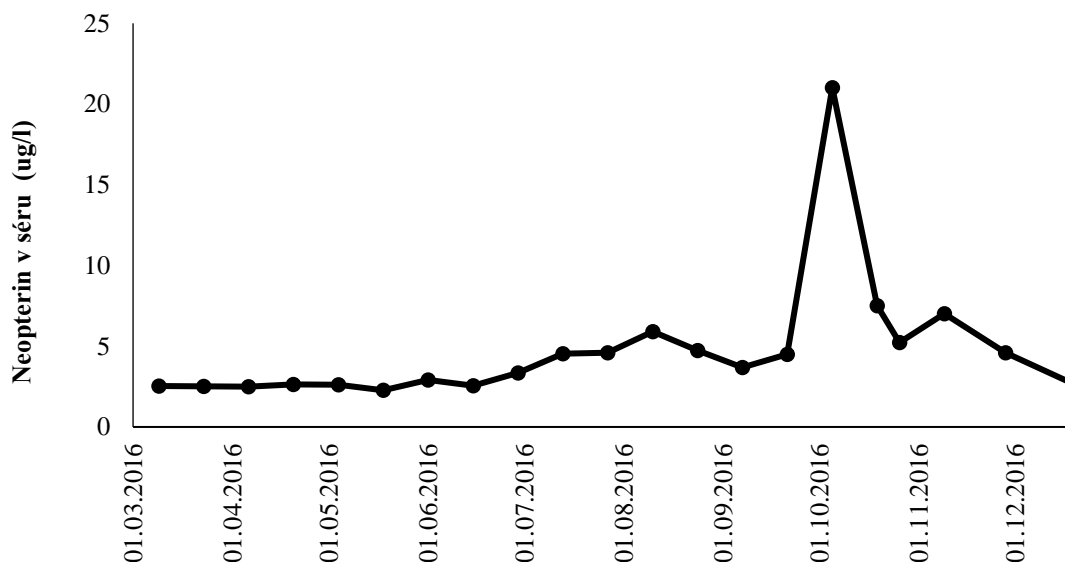


Pacientka s metastatickým BRAF mutovaným melanomem levého bérce. V první linii léčena kombinací BRAF a MEK inhibitoru. Ve druhé linii léčena od 9. 5. 2018 do 26. 6. 2019 nivolumabem. Ve třetí linii od 12. 8. 2019 léčena ipilimumabem v rámci klinické studie, po 3. cyklu terapie hospitalizována pro průjmy stupně 3.



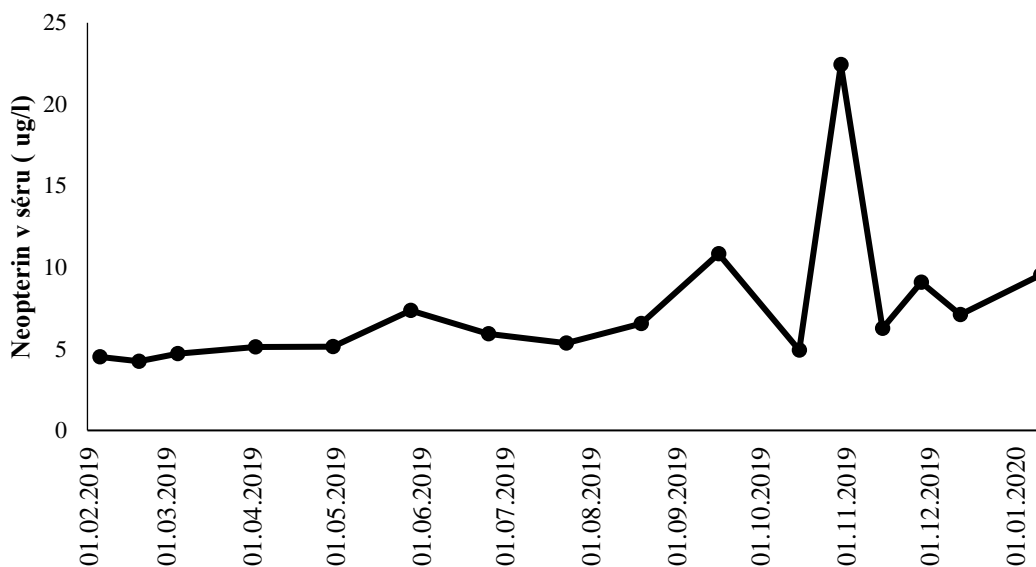
**Graf 7: Vzestup neopterinu po 3. dávce ipilimumabu při vzniku imunitně podmíněného nežádoucího účinku a následnou normalizaci po zaléčení kortikoidy.**

Pacientka s adenokarcinomem pravé plíce T3N3M1, od 9. 3. 2016 léčena nivolumabem, léčba ukončena pro imunitně podmíněnou kolitidu, které předcházel významný vzestup neopterinu v séru.



**Graf 8: Znázorňuje výrazný vzestup neopterinu v době vzniku imunitně podmíněných průjmů, následný pokles po zaléčení kortikoidy.**

Pacientka s metastatickým BRAF mutovaným maligním melanomem pravé horní končetiny, od 22. 5. 2018 léčena PD-1 inhibítorem, v průběhu léčby opakovaně rozvoj imunitně podmíněné artritidy. I přes ukončení imunoterapie, poslední dávka 16. 9. 2019 dochází opakovaně k relapsu imunitně podmíněných nežádoucích účinků - artritidy s nutností podávání kortikoidů. Stran onkologického onemocnění je pacientka v kompletní remisi.



**Graf 9:** Opakované vzestupy neopterinu u pacientky s recidivující imunitně podmíněnou artritidou, 1. epizoda od 22. 9. 2019 (neopterinu na 10,83) zaléčena kortikoterapií, 2. epizoda 30. 10. 2019 (neopterin 22,43), 3. epizoda 10. 1. 2020 (neopterin 9,54).

### 2.1.3.3 Diskuze a závěr

Současná data naznačují, že neopterin v séru může být potenciálním biomarkerem pro detekci a monitorování imunitních nežádoucích účinků. Je třeba zmínit omezení této studie. Nejprve se jednalo o retrospektivní pilotní studii. Vzhledem k omezenému počtu pacientů, bude jistě třeba výsledky ověřit na větším vzorku pacientů.

Z výsledků vyplývá, že v době vzniku imunitně podmíněného nežádoucího účinku dochází ke strmému vzestupu neopterinu, tento vzestup neopterinu může být doprovázen například vzestupem bilirubinu, ALT, AST (v případě imunitně podmíněné hepatitidy), či vzestupu kreatininu (v případě imunitně podmíněné nefritidy). Jak ukazují grafy u jednotlivých pacientů po zaléčení kortikoidy, dochází k poklesu neopterinu a normalizaci dalších laboratorních parametrů. Velmi důležitý je poznatek, že k nárůstu neopterinu v séru dochází dříve, než se imunitně podmíněné účinky klinicky projeví. Zvýšená hodnota neopterinu oproti

baseline nás tedy může upozornit na zvýšené riziko vzniku imunitně podmíněných nežádoucích účinků. V praxi si můžeme pacienta pozvat na časnější kontrolu, můžeme oddálit podání další dávky imunoterapie. V našem souboru u pacientů, u kterých docházelo opakovaně k relapsu imunitně podmíněných nežádoucích účinků, vidíme opakované vzestupy neopterinu v séru, které předbíhali rozvoj klinických potíží, opětovný vzestup neopterinu nás tedy může upozornit na riziko relapsu imunitně podmíněných nežádoucích účinků.

Závěrem se zdá, že neopterin v séru představuje slibný biomarker imunitních nežádoucích účinků. Potenciál neopterinu při diagnostice a monitorování imunitních nežádoucích účinků by měl být zkoumán v prospektivních klinických studiích.

## **2. 2 Využití sledování hladin neopterinu v séru a v moči při hodnocení horečky u pacientů léčených kombinací BRAF a MEK inhibitoru**

Přibližně 50% primárně kožních melanomů vykazuje přítomnost BRAF mutace. U těchto pacientů, zejména v případě nutnosti dosáhnout rychlé odpovědi, využíváme kombinovanou cílenou terapii (kombinace BRAF a MEK inhibitoru). Mezi časté nežádoucí účinky BRAF inhibitorů patří horečka, zimnice, noční pocení, dehydratace či hypotenze. V klinické praxi může být obtížné odlišit, zda se jedná o nežádoucí účinek cílené léčby či infekci. Právě v této diferenciálně diagnostické nejistotě může hrát monitorování hladiny neopterinu v séru a v moči důležitou roli.

### **2.2.1. Popis případu**

Následující kazuistika prezentuje případ 47leté pacientky s BRAF mutovaným metastatickým melanomem léčené kombinovanou cílenou terapií. V červnu 2014 byla pacientka hospitalizována pro život ohrožující anémii (Hb 25g/l), při klinickém vyšetření byl zjištěn primární tumor velikosti 6cm na levém bérce a v oblasti levého třísla byl přítomný exulcerovaný paket metastaticky postižených lymfatických uzlin velikosti 15 cm, který intermitentně spontánně krvácel. Provedená biopsie potvrdila maligní melanom. V rámci stagingu onemocnění bylo doplněno CT vyšetření, které prokázalo přítomnost vzdálených metastáz (levé ovarium velikosti 100 x 65 mm, exulcerovaný paket uzlin v třísle velikosti 163 x 105 x 150 mm). Po doplnění mutační analýzy, byla zjištěna přítomnost BRAF mutace. Vzhledem k rychlé progresi (pacientka pozorovala změny na bérce a v třísle po dobu dvou měsíců) a rozsahu onemocnění byla indikována kombinovaná terapie BRAF a MEK inhibitorem s cílem dosáhnout rychlé regrese lokálního nálezu v třísle.

Dne 4. července 2014 byla zahájena léčba kombinací dabrafenibu ( 2x150mg) a trametinibu (1x2mg). V průběhu hospitalizace byl neopterin v moči stanovován denně od 3. července 2014 do 11. srpna 2014, poté byl hodnocen v týdenních intervalech. Neopterin v séru byl stanovován denně od 3. července 2014 do 8. července 2014, dále byl stanovován v týdenních intervalech.

Dne 28. července (dvacátý pátý den léčby) došlo k rapidnímu zhoršení stavu. Pacientka byla somnolentní, měla vysoké horečky okolo 40 stupňů Celsia, laboratorně byl patrný pokles CRP 65 g/l, ale neopterin v séru byl neměřitelný ( $\geq 28,10 \mu\text{g/l}$ ), rovněž došlo ke vzestupu neopterinu v moči. V diferenciální diagnostice byla zvažována progresse onemocnění

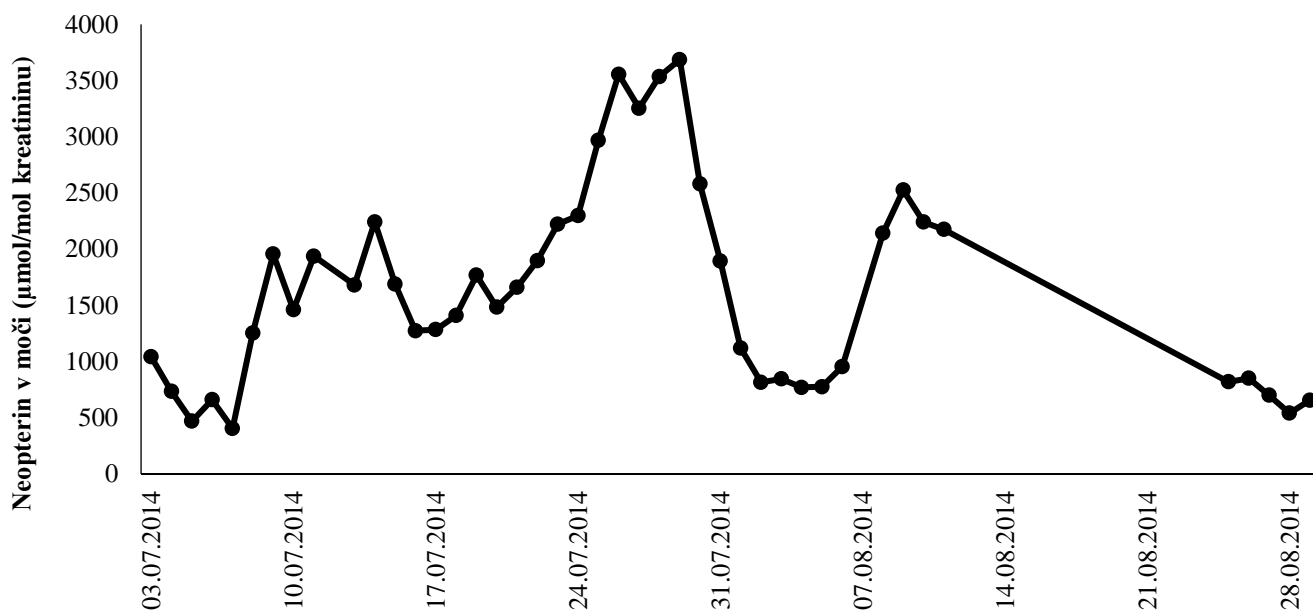
(metastázy do CNS), septický stav při velkém nekrotickém tumoru v třísle či imunitně podmíněná horečka při kombinované cílené terapii. Bylo provedeno CT mozku s kontrastní látkou, které vyloučilo intracerebrální patologii. Pacientce byla léčena symptomaticky, dostala antipyretika (paracetamol), kortikosteroidy (Prednison 10mg), profylakticky byla zajištěna cefuroximem (2x500mg), kombinovaná cílená terapie byla přerušena.

O dva dny později se stav pacientky zlepšil, laboratorně došlo k poklesu neopterinu v séru (17  $\mu\text{g/l}$ ) i v moči a od 30. července 2014 pacientka opět pokračovala v kombinované cílené terapii, kterou v dalším průběhu již dobře tolerovala. V průběhu hospitalizace byly denně prováděny převazy a débridement rány, během prvních tří týdnů kombinované cílené terapie došlo k velmi rychlé regresi tumorózních hmot v třísle.

Neopterinu v moči/kreatinin (graf 10) zobrazuje, že po zahájení kombinované cílené léčby dochází k poklesu neopterinu v moči, poté od čtvrtého dne terapie dochází k vzestupu neopterinu v moči. Po dobu 14 dnů je hodnota neopterinu v moči přibližně stacionární, poté dochází k dalšímu prudkému vzestupu, po dobu 4 dnů dosahuje neopterin v moči maximálních hodnot, poté v korelaci s klinickým zlepšením stavu prudce klesá na počáteční hodnoty. V grafu vidíme ještě jeden vzestup ve dnech 8. srpna až 11. srpna 2014, který koreluje s hladinou neopterin v séru.

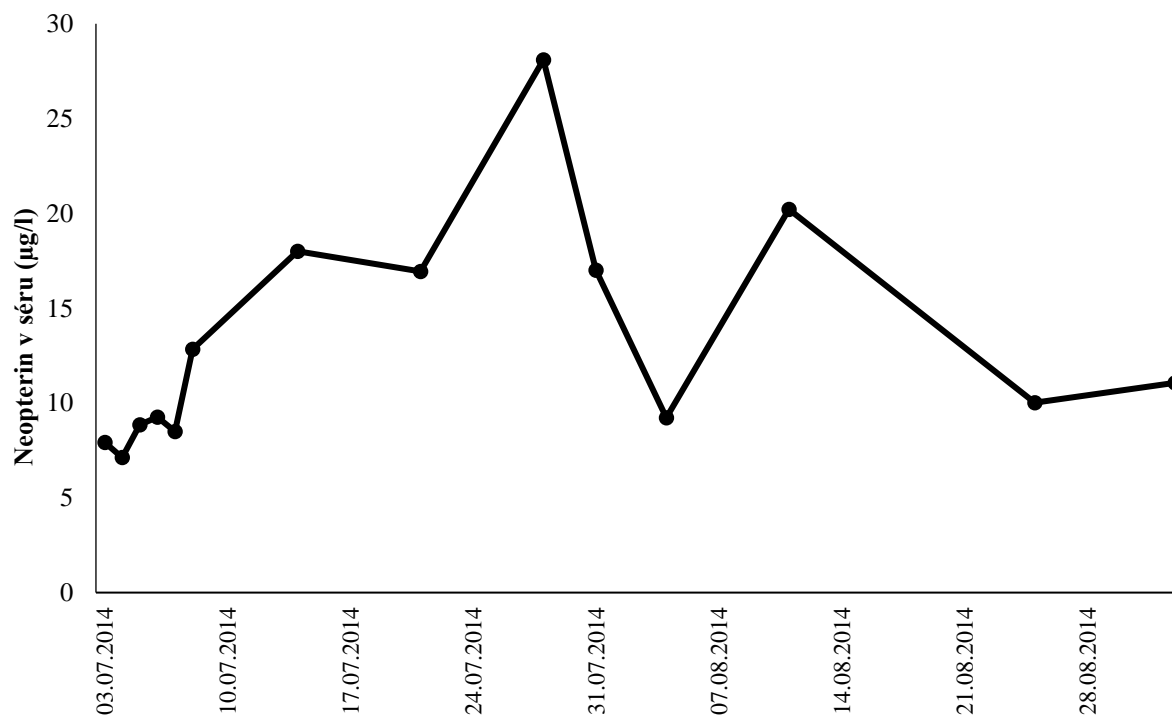
Neopterin v séru (graf 11) je první čtyři dny po zahájení terapie stacionární, poté od 8. července 2014 dochází k nárůstu neopterinu v séru. Dne 28.červenc 2014 v době výrazné deteriorace klinického stavu dosahuje neopterin v séru neměřitelné hodnoty, poté dochází k prudkému poklesu v korelaci s neopterinem v moči. Graf opět zaznamenává ještě jeden vzestup neopterinu dne 11. srpna 2014.

V únoru 2015 CT vyšetření potvrdilo trvání parciální dopovědi. V dubnu 2015 pacientka z důvodu lokální progresy v třísle pacientka podstoupila paliativní radioterapii s celkovou ložiskovou dávkou 24Gy ve třech frakcích. V červnu 2015 došlo k rychlé progresi onemocnění a pacientka zemřela téměř rok po zahájení onkologické terapie pro metastatické onemocnění. Příčinou úmrtí byl septický stav komplikovaný syndromem diseminované intravaskulární koagulopatie.



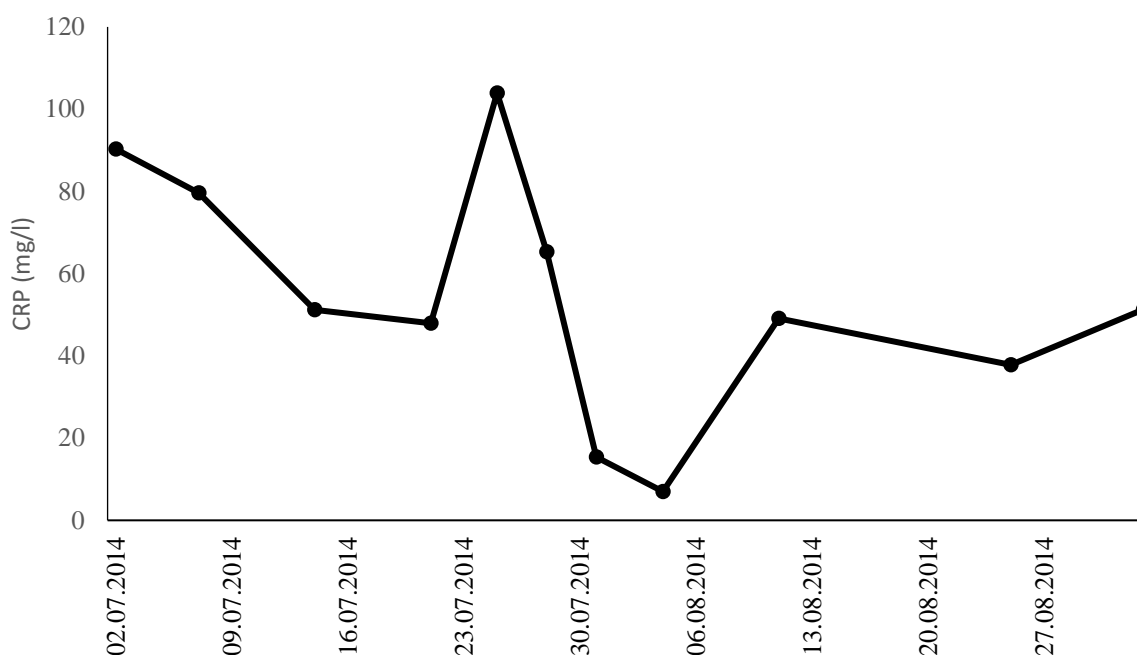
**Graf 10: Poměr hodnoty neopterin v moči/ kreatinin v průběhu cílené léčby.**

Převzato z: Potential utilization of neopterin measurements in the assessment of pyrexia in metastatic melanoma treated with combined targeted therapy: a case report.



**Graf 11: Neopterin v séru v průběhu cílení léčby. V období zhoršení klinického stavu je zde patrný výrazný vzestup neopterinu na neměřitelnou hodnotu způsobený pravděpodobně aktivací imunitního systému v průběhu cílené léčby.**

Převzato z: Potential utilization of neopterin measurements in the assessment of pyrexia in metastatic melanoma treated with combined targeted therapy: a case report.



**Graf 12: Znázorňuje CRP v průběhu cílené terapie, v době zhoršení klinického stavu vykazuje již klesající tendenci.**

Převzato z: Potential utilization of neopterin measurements in the assessment of pyrexia in metastatic melanoma treated with combined targeted therapy: a case report.

### 2.2.2. Závěr

Tato kazuistika prezentuje účinnost kombinované cílené léčby u pacientky s BRAF mutovaným melanomem a využití monitorování neopterinu v moči a v séru pro predikci nežádoucích účinků cílené terapie. Horečka společně se zimnicí, nočním pocením či hypotenzí patří mezi časté nežádoucí účinky léčby kombinací BRAF a MEK inhibitoru. Mechanismus vzniku horečky indukované dabrafenibem a trametinibem nebyl dosud jednoznačně objasněn, jedním z mechanismů může být paradoxní aktivace MAPK dráhy v lymfocytech. (172, 173) Prezentovaná data demonstrují, že horečka u pacientů léčených kombinací dabrafenibu a trametinibu je doprovázena vzestupem markeru imunitní aktivace neopterinu, vzestup jsme zaznamenali jak u neopterinu v séru, tak v moči. Denní monitorování hladiny neopterinu v moči v průběhu prvních šesti týdnů léčby se ukázalo jako velmi cenná neinvazivní metoda, která nám pomohla rozlišit mezi horečkou infekční etiologie a neinfekční febrilií, která je nežádoucím účinkem kombinované cílené terapie. Po iniciálním poklesu neopterinu v moči, došlo k postupnému vzestupu ilustrujícímu aktivaci imunitního systému. Další zaznamenaný vzestup neopterinu v moči se objevil asi týden před výrazným

zhoršením klinického stavu, kdy hladina neopterinu v moči dosahovala maxima pod dobu čtyř dnů. Poté v korelaci se zlepšením klinického stavu dochází k poklesu neopterinu v séru i v moči. Právě dynamika vzestupu neopterinu a poklesu hladiny CRP (65g/l) v době febrilní epizody naznačuje, že se nejednalo o infekční příčinu. Pro tento argument dále svědčí i to, že hladina neopterinu klesla po zahájení podpůrné léčby. Tato kazuistika ukazuje, že monitorování neopterinu by se dalo využít k predikci vzniku horečky při kombinované cílené terapii (vzestup byl zaznamenán již týden před febrilní epizodou) a rovněž ke sledování efektivity podpůrné léčby pro pacienty s pyrexii indukovanou kombinací BRAF a MEK inhibitoru.

Bude ještě potřeba předkládané hypotézy potvrdit na větším počtu pacientů. Nicméně předkládaná data naznačují, nový potenciál hodnocení dynamiky neopterinu, který společně s dynamikou dalších biomarkerů (CRP, prokalcitonin, presepsin) může hrát významnou roli v rozlišení mezi horečkou vyvolanou infekcí či horečkou vyvolanou kombinací BRAF a MEK inhibitoru.



## **2.3. Neopterin u pacientů s metastatickým maligním melanomem léčených ipilimumabem**

### **2.3.1 Charakteristika souboru**

V souboru bylo celkem 28 pacientů (14 mužů, 14 žen) s metastatickým maligním melanomem, průměrný věk pacientů byl 59 let. Pacienti byli léčeni ipilimumabem v rámci specifického léčebného programu. U 19 pacientů se jednalo o primárně kožní melanom, čtyři pacienti měli melanom choroidey, jeden pacient měl primární melanom tenkého střeva, ve čtyřech případech se jednalo o generalizovaný maligní melanom neznámé primární lokalizace. U pěti pacientů byla přítomna BRAF mutace, devět pacientů bylo BRAF wild type, u 14 pacientů nebyla BRAF mutace stanovena. Všichni pacienti byli předléčení. 26 z nich bylo léčeno dakarbazinem, v jednom případě byl podáván intralezionální IL-2, jeden pacient s melanomem choroidey s izolovaným hepatálním postižením absolvoval intraarteriální chemoterapii melfalanem. Jedna pacientka s melanomem choroidey, byla léčena dakarbazinem, poté v rámci specifického léčebného programu ipilimumabem, dále intraarteriální chemoterapii s melfalanem, absolvovala také léčbu v rámci klinické studie s avelumabem a byla léčena v rámci specifického léčebného programu pembrolizumabem. Čtyři pacienti s prokázanou BRAF mutací byli následně léčeni BRAF inhibitorem. Celkem 20 pacientů dostalo 4 dávky ipilimumabu, u jednoho pacienta byla léčba po 3. dávce ukončena pro klinickou progresi, u tří pacientů byla léčba ukončena pro klinickou progresi po 2. dávce, 4 pacienti dostali pouze jednu dávku ipilimumabu. Tři pacienti měli imunitně podmíněné nežádoucí účinky (průjmy stupně 2, stupně 3 a 5). Jedna pacientka je v remisi onemocnění, poslední dávka ipilimumabu byla podána v červnu 2011, poslední PET/CT (prosinec 2020) bez nálezu relapsu onemocnění.

### **Metodika**

U pacientů léčených na Onkologické klinice Fakultní nemocnice Olomouc v roce 2011, byl stanovován neopterin v séru, citrulin v plazmě, hemoglobin, leukocyty, neutrofil-to-lymphocyte ratio (NLR), lymphocyte-to-monocyte ratio (LMR), platelet-to-lymphocyte ratio (PLR) a systemic inflammatory index (součin NLR a počtu destiček; SII) před zahájením a v průběhu léčby ipilimumabem. Výzkum byl součástí projektu schváleného Etickou komisí Lékařské fakulty Univerzity Palackého a všichni zúčastnění pacienti podepsali informovaný souhlas. Korelace byla zkoumána pomocí Spearmanova korelačního koeficientu. Změny

během léčby byly studovány pomocí Wilcoxonova párového testu. Multivariabilní analýza přežití byla provedena pomocí Coxova testu. Ke statistice byl použit program NCSS.

### 2.3.2 Výsledky

Všechny 4 plánované cykly ipilimumabu byly podány u 17 nemocných. Hodnoty neopterinu v séru i moči i ostatní sledované parametry před zahájením léčby vykazovaly velký rozptyl. V Tabulce 11 jsou ukázány korelace biomarkerů zánětlivé odpovědi neopterin v séru a CRP s ostatními laboratorními parametry a přežitím. V moment analýzy přežívala jediná pacientka, jejíž přežití vysoce převyšovala přežití nejdéle žijících zemřelých pacientů, proto hodnocení neparametrickým korelačním testem bylo smysluplné. Dle očekávání byla zřejmá významná korelace mezi neopterinem a CRP. Oba parametry významně korelovaly s aktivitou LDH, tedy biomarkeru nádorové masy a poměrem NLR. V případě neopterinu byla pozorována statisticky významná negativní korelace s absolutním počtem lymfocytů a přežitím. Negativní korelace mezi CRP a přežitím nebyla statisticky významná, CRP významně korelovalo s počtem trombocytů, leukocytů a neutrofilů.

Studium závislost přežití pomocí Spearmanovy korelace mělo samozřejmě pouze explorativní charakter, kromě neopterinu byla pozorována významná korelace s LDH (-0.751,  $p=0.00006$ ), NLR (-0.503,  $p=0.014$ ) a LMR (0.547,  $p=0.007$ ). V multivariabilní Coxově analýze se ukázaly jako významné prediktivní parametry přežití (při zkoumání jako kontinuální proměnné) neopterin, LDH a koncentrace hemoglobinu (Tabulka 12).

Sledování biomarkerů během léčby bylo komplikováno klesajícím počtem pacientů i nepravidelnostmi v návštěvách způsobených nežádoucími událostmi způsobených pokročilým onemocněním nebo léčbou. Z tohoto důvodu jsou prezentována data prvních 4 návštěv, kdy byl vyšetřen významnější počet pacientů. Ze sledovaných parametrů byl patrný statisticky významný vzestup neopterinu v moči (vyjádřeného jako poměr neopterin/kreatinin), změny neopterinu v séru a citrulinu nebyly statisticky významné (Tabulka 13).

	<b>Neopterin v séru</b>	<b>CRP</b>
Neopterin v séru	-	<b>0.523 (0.010)</b>
Citrulin	0.081 (0.685)	-0.321 (0.134)
LDH	<b>0.558 (0.006)</b>	<b>0.576 (0.004)</b>
Hemoglobin	-0.385 (0.070)	-0.265 (0.221)
Trombocyty	-0.074 (0.737)	<b>0.440 (0.036)</b>
Leukocyty	0.098 (0.665)	<b>0.587 (0.004)</b>
Neutrofily	0.173 (0.430)	<b>0.516 (0.011)</b>
Lymfocyty	<b>-0.579 (0.004)</b>	-0.142 (0.519)

Monocyty	0.090 (0.684)	<b>0.418 (0.047)</b>
NLR	<b>0.448 (0.032)</b>	<b>0.446 (0.033)</b>
LMR	<b>-0.535 (0.009)</b>	-0.362 (0.089)
PLR	0.360 (0.092)	0.366 (0.086)
SII	0.274 (0.206)	<b>0.546 (0.007)</b>
přežití	<b>-0.624 (0.005)</b>	-0.330 (0.144)

**Tabulka 11: Korelace mezi neopterinem a CRP v séru s dalšími sledovanými parametry. Tabulka ukazuje Spearmanovy korelační koeficienty (v závorce je hodnota p). Statisticky významné rozdílly jsou zvýrazněny.**

parametr	Poměr rizika (hazard ratio)	P
neopterin	<b>2.48</b>	<b>0.0004</b>
LDH	<b>1.25</b>	<b>0.002</b>
hemoglobin	<b>1.05</b>	<b>0.008</b>

**Tabulka 12: Výsledky Coxovy regrese**

Návšteva	Počet pacientů	Interval návštěv ve dnech	Hodnoty neopterinu v séru	Hodnoty neopterinu v moči	Hodnoty citrulinu v plazmě
1	28	0	3,69±3,25	280±193,35	36,2±20,77
2	26	17±12	3,46±2,07	317±215,89*	34,53±14,8
3	23	50±82	3,56±2,73	331±214,38*	35,05±20,3
4	21	48±19	3,85±3,27	312±232,09*	33,55±16,71

**Tabulka 13: Hodnoty biomarkerů (neopterin v séru, neopterin v moči, citrulin v plazmě) před léčbou a během prvních 3 návštěv.**

### 2.3.3 Diskuze

Výše uvedená data ukazují na prognostický význam neopterinu u pacientů s metastatickým maligním melanom léčenými ipilimumabem. Již dříve byla publikována řada studií, které demonstrovaly prognostický význam neopterinu u nemocných s nádory. (163) Zvýšené koncentrace neopterinu v séru a v moči v důsledku chronické stimulace imunitního systému signalizují špatnou prognózu napříč spektrem nádorových onemocnění. Zvýšení hladin neopterinu může ukazovat, že imunitní systém přestal být schopný kontrolovat růst nádoru. Toto naznačují i výše uvedená data. Koncentrace neopterinu vykazovala silnou korelaci s aktivitou laktát dehydrogenázy, která je ukazatelem nádorové masy. Současně byla pozorována významná negativní korelace mezi koncentrací neopterinu a absolutním počtem

lymfocytů. Pozoruhodné je, že v předchozích studiích u nemocných s karcinomem prsu, většinou nemocných vyšetřených v etapě hormonální léčby nebo následného sledování nebyla pozorována korelace mezi NLR a neopterinem, zatímco u relativně malé skupiny nemocných s velmi pokročilým maligním melanomem byla přítomna korelace těchto dvou biomarkerů, které jsou spojeny s prognózou nádorových onemocnění. NLR je vlastně jakýsi relativní ukazatel počtu lymfocytů, vztažený na počet neutrofilů, který se v současné době ukazuje užitečným biomarkerem celé řady patologických stavů.

Interpretace změn neopterinu během léčby je obtížná vzhledem ke skutečnosti, že řada pacientů nedokončila plánovaný cyklus léčby a došlo zde k určité selekci. V případě neopterinu v moči byl pozorován vzestup, který může reflektovat aktivaci imunity u nemocných s nízkými výchozími hodnotami.

## ZÁVĚR

Zde prezentovaná data ukazují široké využití stanovení neopterinu v séru nebo v moči u nemocných léčených cílenou léčbou nebo imunoterapií. Ve skupině nemocných léčených ipilimumabem byl neopterin nezávislým prognostickým ukazatelem. Další data naznačují, že během léčby dochází k vzestupu hladiny neopterinu, což však může být ovlivněno určitou selekcí, která vede k detekci vzestupu u nemocných s iniciálně nižší koncentrací.

Na základě výchozích kasuistik byla provedena analýza neopterinu u nemocných s toxicitou vyvolanou protilátkami proti kontrolním bodům imunitní odpovědi. Tato data ukazují, že stanovení neopterinu může být vhodné k monitorování toxicity léčby. Další prospektivní studie by měly ukázat, zda se potvrdí možná role neopterinu jako biomarkeru toxicity imunoterapie či zda dokonce změny neopterinu budou moci predikovat následnou manifestaci toxicity a vést k časně intervenci.

## Seznam použitých pramenů a literatury

1. Povýšil, C., & Šteiner, I. (c2007). *Speciální patologie* (2., dopl. a přeprac. vyd). Galén
2. Melichar, B. (c2007). *Úloha farmakoterapie v komplexní léčbě nádorů jater*. Galén.
3. Dušek, L., Mužík, J., Kubásek, M., Koptíková, J., Žaloudík, J., & Vyzula, R. *Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice*. Retrieved September 15, 2020, from <http://www.svod.cz>
4. Klener, P. (c2002). *Klinická onkologie*. Galén.
5. Foretová, L., Macháčková, E., Šachlová, M., Petráková, K., & Palácová, M. (2009). Syndrom familiárního melanomu (s dysplastickými naevy či bez nich). *Klinická Onkologie*, 22(Supplement 1), S32-S33. <https://www.linkos.cz/casopis-klinicka-onkologie/2009-06-10-supplement-1/syndrom-familiarniho-melanomu-s-dysplastickymi-naevy-ci-bez-nich/>
6. Novotný, J., Vitek, P., & Kleibl, Z. (2019). *Onkologie v klinické praxi: standardní přístupy v diagnostice a léčbě vybraných zhoubných nádorů* (3., přepracované a doplněné vydání). Mladá fronta.
7. Pizinger, K. (2010). Kožní metastázy. *Onkologie*, 4(4), 237-240.
8. Ryška, A., Horký, O., Berkovcová, J., Tichá, I., Kalinová, M., Matějčková, M., Bóday, A., Drábek, J., Martínek, P., Šimová, J., Siegllová, K., & Vošmiková, H. (2017). Malignant Melanoma – from Classical Histology towards Molecular Genetic Testing. *Klinická Onkologie*, 30(3), 182-189. <https://doi.org/10.14735/amko2017182>
9. Brierley, J., Gospodarowicz M.K., Wittekind, C et al., *TNM: klasifikace zhoubných novotvarů*. Česká verze 2018. Praha: [Ústav zdravotnických informací a statistiky České republiky], 2018. ISBN 978-80-7472-173-1
10. Staněk, L., Tesařová, P., & Gürlich, R. ([2017]). *Molekulární onkologie v kasuistikách*. Current Media.
11. Kirkwood, J. M., Strawderman, M. H., Ernstoff, M. S., Smith, T. J., Borden, E. C., & Blum, R. H. (1996). Interferon alfa-2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma: the Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 14(1), 7–17. <https://doi.org/10.1200/JCO.1996.14.1.7>

12. Eggermont, A. M., Chiarion-Sileni, V., Grob, J. J., Dummer, R., Wolchok, J. D., Schmidt, H., Hamid, O., Robert, C., Ascierto, P. A., Richards, J. M., Lebbé, C., Ferraresi, V., Smylie, M., Weber, J. S., Maio, M., Bastholt, L., Mortier, L., Thomas, L., Tahir, S., Hauschild, A., ... Testori, A. (2016). Prolonged Survival in Stage III Melanoma with Ipilimumab Adjuvant Therapy. *The New England journal of medicine*, 375(19), 1845–1855.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1611299>
13. Weber, J., Mandala, M., Del Vecchio, M., Gogas, H. J., Arance, A. M., Cowey, C. L., Dalle, S., Schenker, M., Chiarion-Sileni, V., Marquez-Rodas, I., Grob, J. J., Butler, M. O., Middleton, M. R., Maio, M., Atkinson, V., Queirolo, P., Gonzalez, R., Kudchadkar, R. R., Smylie, M., Meyer, N., ... CheckMate 238 Collaborators (2017). Adjuvant Nivolumab versus Ipilimumab in Resected Stage III or IV Melanoma. *The New England journal of medicine*, 377(19), 1824–1835. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1709030>
14. Kiss, I., (2020). *Modrá kniha České onkologické společnosti* (26.aktualizace). Masarykův onkologický ústav. <https://www.linkos.cz/files/modra-kniha/19.pdf>
15. Eggermont, A., Kicinski, M., Blank, C. U., Mandala, M., Long, G. V., Atkinson, V., Dalle, S., Haydon, A., Khattak, A., Carlino, M. S., Sandhu, S., Larkin, J., Puig, S., Ascierto, P. A., Rutkowski, P., Schadendorf, D., Koornstra, R., Hernandez-Aya, L., Di Giacomo, A. M., van den Eertwegh, A., ... Suci, S. (2020). Association Between Immune-Related Adverse Events and Recurrence-Free Survival Among Patients With Stage III Melanoma Randomized to Receive Pembrolizumab or Placebo: A Secondary Analysis of a Randomized Clinical Trial. *JAMA oncology*, 6(4), 519–527. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2019.5570>
16. Maio, M., Lewis, K., Demidov, L., Mandalà, M., Bondarenko, I., Ascierto, P. A., Herbert, C., Mackiewicz, A., Rutkowski, P., Guminski, A., Goodman, G. R., Simmons, B., Ye, C., Yan, Y., Schadendorf, D., & BRIM8 Investigators (2018). Adjuvant vemurafenib in resected, BRAF<sup>V600</sup> mutation-positive melanoma (BRIM8): a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre, phase 3 trial. *The Lancet. Oncology*, 19(4), 510–520.  
[https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30106-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30106-2)
17. Long, G. V., Hauschild, A., Santinami, M., Atkinson, V., Mandalà, M., Chiarion-Sileni, V., Larkin, J., Nyakas, M., Dutriaux, C., Haydon, A., Robert, C., Mortier, L., Schachter, J., Schadendorf, D., Lesimple, T., Plummer, R., Ji, R., Zhang, P., Mookerjee, B., Legos, J., ... Kirkwood, J. M. (2017). Adjuvant Dabrafenib plus Trametinib in Stage III BRAF-Mutated Melanoma. *The New England journal of medicine*, 377(19), 1813–1823.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1708539>

18. Cowan, D. H., & Bergsagel, D. E. (1971). Intermittent treatment of metastatic malignant melanoma with high-dose 5-(3,3-dimethyl-1-triazeno)imidazole-4-carboxamide (NSC-45388). *Cancer chemotherapy reports*, 55(2), 175–181
19. Lui, P., Cashin, R., Machado, M., Hemels, M., Corey-Lisle, P. K., & Einarson, T. R. (2007). Treatments for metastatic melanoma: synthesis of evidence from randomized trials. *Cancer treatment reviews*, 33(8), 665–680. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2007.06.004>
20. Atkins, M. B., Lotze, M. T., Dutcher, J. P., Fisher, R. I., Weiss, G., Margolin, K., Abrams, J., Sznol, M., Parkinson, D., Hawkins, M., Paradise, C., Kunkel, L., & Rosenberg, S. A. (1999). High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 17(7), 2105–2116. <https://doi.org/10.1200/JCO.1999.17.7.2105>
21. Jiang, T., Zhou, C., & Ren, S. (2016). Role of IL-2 in cancer immunotherapy. *Oncoimmunology*, 5(6), e1163462. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1163462>
22. Hodi, F. S., O'Day, S. J., McDermott, D. F., Weber, R. W., Sosman, J. A., Haanen, J. B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J. C., Akerley, W., van den Eertwegh, A. J., Lutzky, J., Lorigan, P., Vaubel, J. M., Linette, G. P., Hogg, D., Ottensmeier, C. H., Lebbé, C., Peschel, C., ... Urban, W. J. (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *The New England journal of medicine*, 363(8), 711–723. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1003466>
23. Robert, C., Thomas, L., Bondarenko, I., O'Day, S., Weber, J., Garbe, C., Lebbe, C., Baurain, J. F., Testori, A., Grob, J. J., Davidson, N., Richards, J., Maio, M., Hauschild, A., Miller, W. H., Jr, Gascon, P., Lotem, M., Harmankaya, K., Ibrahim, R., Francis, S., ... Wolchok, J. D. (2011). Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *The New England journal of medicine*, 364(26), 2517–2526. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1104621>
24. Comin-Anduix, B., Escuin-Ordinas, H., & Ibarondo, F. J. (2016). Tremelimumab: research and clinical development. *OncoTargets and therapy*, 9, 1767–1776. <https://doi.org/10.2147/OTT.S65802>
25. Weber, J. S., D'Angelo, S. P., Minor, D., Hodi, F. S., Gutzmer, R., Neyns, B., Hoeller, C., Khushalani, N. I., Miller, W. H., Jr, Lao, C. D., Linette, G. P., Thomas, L., Lorigan, P.,



Grossmann, K. F., Hassel, J. C., Maio, M., Sznol, M., Ascierto, P. A., Mohr, P., Chmielowski, B., ... Larkin, J. (2015). Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *The Lancet. Oncology*, *16*(4), 375–384.

[https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)70076-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)70076-8)

26. Robert, C., Long, G. V., Brady, B., Dutriaux, C., Maio, M., Mortier, L., Hassel, J. C., Rutkowski, P., McNeil, C., Kalinka-Warzocha, E., Savage, K. J., Hernberg, M. M., Lebbé, C., Charles, J., Mihalciou, C., Chiarion-Sileni, V., Mauch, C., Cognetti, F., Arance, A., Schmidt, H., ... Ascierto, P. A. (2015). Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *The New England journal of medicine*, *372*(4), 320–330.

<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1412082>

27. Larkin, J., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Grob, J. J., Rutkowski, P., Lao, C. D., Cowey, C. L., Schadendorf, D., Wagstaff, J., Dummer, R., Ferrucci, P. F., Smylie, M., Hogg, D., Hill, A., Márquez-Rodas, I., Haanen, J., Guidoboni, M., Maio, M., Schöffski, P., Carlino, M. S., ... Wolchok, J. D. (2019). Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *The New England journal of medicine*, *381*(16), 1535–1546.

<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1910836>

28. Hodi, F. S., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Grob, J. J., Rutkowski, P., Cowey, C. L., Lao, C. D., Schadendorf, D., Wagstaff, J., Dummer, R., Ferrucci, P. F., Smylie, M., Hill, A., Hogg, D., Marquez-Rodas, I., Jiang, J., Rizzo, J., Larkin, J., & Wolchok, J. D. (2018). Nivolumab plus ipilimumab or nivolumab alone versus ipilimumab alone in advanced melanoma (CheckMate 067): 4-year outcomes of a multicentre, randomised, phase 3 trial. *The Lancet. Oncology*, *19*(11), 1480–1492. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30700-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30700-9)

29. Lebbé, C., Meyer, N., Mortier, L., Marquez-Rodas, I., Robert, C., Rutkowski, P., Menzies, A. M., Eigentler, T., Ascierto, P. A., Smylie, M., Schadendorf, D., Ajaz, M., Svane, I. M., Gonzalez, R., Rollin, L., Lord-Bessen, J., Saci, A., Grigoryeva, E., & Pigozzo, J. (2019). Evaluation of Two Dosing Regimens for Nivolumab in Combination With Ipilimumab in Patients With Advanced Melanoma: Results From the Phase IIIb/IV CheckMate 511 Trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, *37*(11), 867–875. <https://doi.org/10.1200/JCO.18.01998>

30. Ribas, A., Puzanov, I., Dummer, R., Schadendorf, D., Hamid, O., Robert, C., Hodi, F. S., Schachter, J., Pavlick, A. C., Lewis, K. D., Cranmer, L. D., Blank, C. U., O'Day, S. J.,

Ascierto, P. A., Salama, A. K., Margolin, K. A., Loquai, C., Eigentler, T. K., Gangadhar, T. C., Carlino, M. S., ... Daud, A. (2015). Pembrolizumab versus investigator-choice chemotherapy for ipilimumab-refractory melanoma (KEYNOTE-002): a randomised, controlled, phase 2 trial. *The Lancet. Oncology*, *16*(8), 908–918.

[https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00083-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00083-2)

31. Robert, C., Ribas, A., Schachter, J., Arance, A., Grob, J. J., Mortier, L., Daud, A., Carlino, M. S., McNeil, C. M., Lotem, M., Larkin, J., Lorigan, P., Neyns, B., Blank, C. U., Petrella, T. M., Hamid, O., Su, S. C., Krepler, C., Ibrahim, N., & Long, G. V. (2019). Pembrolizumab versus ipilimumab in advanced melanoma (KEYNOTE-006): post-hoc 5-year results from an open-label, multicentre, randomised, controlled, phase 3 study. *The Lancet. Oncology*, *20*(9), 1239–1251. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(19\)30388-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30388-2)

32. Chapman, P. B., Robert, C., Larkin, J., Haanen, J. B., Ribas, A., Hogg, D., Hamid, O., Ascierto, P. A., Testori, A., Lorigan, P. C., Dummer, R., Sosman, J. A., Flaherty, K. T., Chang, I., Coleman, S., Caro, I., Hauschild, A., & McArthur, G. A. (2017). Vemurafenib in patients with BRAFV600 mutation-positive metastatic melanoma: final overall survival results of the randomized BRIM-3 study. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, *28*(10), 2581–2587.

<https://doi.org/10.1093/annonc/mdx339>

33. Hauschild, A., Grob, J. J., Demidov, L. V., Jouary, T., Gutzmer, R., Millward, M., Rutkowski, P., Blank, C. U., Miller, W. H., Jr, Kaempgen, E., Martín-Algarra, S., Karaszewska, B., Mauch, C., Chiarion-Sileni, V., Martin, A. M., Swann, S., Haney, P., Mirakhur, B., Guckert, M. E., Goodman, V., ... Chapman, P. B. (2012). Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet (London, England)*, *380*(9839), 358–365. [https://doi.org/10.1016/S0140-](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60868-X)

[6736\(12\)60868-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60868-X)

34. Long, G. V., Flaherty, K. T., Stroyakovskiy, D., Gogas, H., Levchenko, E., de Braud, F., Larkin, J., Garbe, C., Jouary, T., Hauschild, A., Chiarion-Sileni, V., Lebbe, C., Mandalà, M., Millward, M., Arance, A., Bondarenko, I., Haanen, J., Hansson, J., Utikal, J., Ferraresi, V., ... Grob, J. J. (2017). Dabrafenib plus trametinib versus dabrafenib monotherapy in patients with metastatic BRAF V600E/K-mutant melanoma: long-term survival and safety analysis of a phase 3 study. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, *28*(7), 1631–1639. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx176>

35. Hodi, F. S., Corless, C. L., Giobbie-Hurder, A., Fletcher, J. A., Zhu, M., Marino-Enriquez, A., Friedlander, P., Gonzalez, R., Weber, J. S., Gajewski, T. F., O'Day, S. J., Kim, K. B., Lawrence, D., Flaherty, K. T., Luke, J. J., Collichio, F. A., Ernstoff, M. S., Heinrich, M. C., Beadling, C., Zukotynski, K. A., ... Fisher, D. E. (2013). Imatinib for melanomas harboring mutationally activated or amplified KIT arising on mucosal, acral, and chronically sun-damaged skin. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, *31*(26), 3182–3190. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.47.7836>
36. Gutzmer, R., Stroyakovskiy, D., Gogas, H., Robert, C., Lewis, K., Protsenko, S., Pereira, R. P., Eigentler, T., Rutkowski, P., Demidov, L., Manikhas, G. M., Yan, Y., Huang, K. C., Uyei, A., McNally, V., McArthur, G. A., & Ascierto, P. A. (2020). Atezolizumab, vemurafenib, and cobimetinib as first-line treatment for unresectable advanced BRAF<sup>V600</sup> mutation-positive melanoma (IMspire150): primary analysis of the randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet (London, England)*, *395*(10240), 1835–1844. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30934-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30934-X)
37. National Library of Medicine (U.S.). (2014, August - ). Dabrafenib and Trametinib Followed by Ipilimumab and Nivolumab or Ipilimumab and Nivolumab Followed by Dabrafenib and Trametinib in Treating Patients With Stage III-IV BRAFV600 Melanoma. DREAMseq (Doublet, Randomized Evaluation in Advanced Melanoma Sequencing) a Phase III Trial. Identifier NCT02224781. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02224781>
38. National Library of Medicine (U.S.). (2015, December - ). Sequential Combo Immuno and Target Therapy (SECOMBIT) Study (SECOMBIT). A Three Arms Prospective, Randomized Phase II Study to Evaluate the Best Sequential Approach With Combo Immunotherapy (Ipilimumab/Nivolumab) and Combo Target Therapy (LGX818/MEK162) in Patients With Metastatic Melanoma and BRAF Mutation. Identifier NCT02631447. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02631447>
39. Vernon L. F. (2018). William Bradley Coley, MD, and the phenomenon of spontaneous regression. *ImmunoTargets and therapy*, *7*, 29–34. <https://doi.org/10.2147/ITT.S163924>
40. Dobosz, P., & Dzieciatkowski, T. (2019). The Intriguing History of Cancer Immunotherapy. *Frontiers in immunology*, *10*, 2965. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02965>

41. McCarthy E. F. (2006). The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *The Iowa orthopaedic journal*, 26, 154–158.
42. Sir Frank MacFarlane Burnet (1899- ). (1976). *CA: a cancer journal for clinicians*, 26(2), 116–118. <https://doi.org/10.3322/canjclin.26.2.116>
43. Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, 21(2), 137–148. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.07.017>
44. Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature immunology*, 3(11), 991–998. <https://doi.org/10.1038/ni1102-991>
45. Meyer, J. P., Persad, R., & Gillatt, D. A. (2002). Use of bacille Calmette-Guérin in superficial bladder cancer. *Postgraduate medical journal*, 78(922), 449–454. <https://doi.org/10.1136/pmj.78.922.449>
46. Jiang, T., Zhou, C., & Ren, S. (2016). Role of IL-2 in cancer immunotherapy. *Oncoimmunology*, 5(6), e1163462. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1163462>
47. Kirkwood, J. M., Butterfield, L. H., Tarhini, A. A., Zarour, H., Kalinski, P., & Ferrone, S. (2012). Immunotherapy of cancer in 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*, 62(5), 309–335. <https://doi.org/10.3322/caac.20132>
48. Alexander W. (2016). The Checkpoint Immunotherapy Revolution: What Started as a Trickle Has Become a Flood, Despite Some Daunting Adverse Effects; New Drugs, Indications, and Combinations Continue to Emerge. *P & T : a peer-reviewed journal for formulary management*, 41(3), 185–191.
49. Závadová, E. (2015). *Onkologická imunologie*. Mladá fronta.
50. Hořejší V. (2015). Protinádorové zbraně imunitního systému [Antitumour Weapons of the Immune System]. *Klinická onkologie : casopis Ceske a Slovenske onkologicke spolecnosti*, 28 Suppl 4, 4S15–4S22. <https://doi.org/10.14735/amko20154s15>
51. Chen, Y., Song, Y., Du, W., Gong, L., Chang, H., & Zou, Z. (2019). Tumor-associated macrophages: an accomplice in solid tumor progression. *Journal of biomedical science*, 26(1), 78. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0568-z>

52. Klabusay M. (2015). Úloha regulačních T buněk v protinádorové imunitní odpovědi [The Role of Regulatory T-cells in Antitumor Immune Response]. *Klinická onkologie : casopis Ceske a Slovenske onkologicke spolecnosti*, 28 Suppl 4, 4S23–4S27.  
<https://doi.org/10.14735/amko20154s23>
53. Fridman, W. H., Zitvogel, L., Sautès-Fridman, C., & Kroemer, G. (2017). The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nature reviews. Clinical oncology*, 14(12), 717–734. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2017.101>
54. Grillo-López, A. J., White, C. A., Varns, C., Shen, D., Wei, A., McClure, A., & Dallaire, B. K. (1999). Overview of the clinical development of rituximab: first monoclonal antibody approved for the treatment of lymphoma. *Seminars in oncology*, 26(5 Suppl 14), 66–73.
55. Wolchok, J. D., Hodi, F. S., Weber, J. S., Allison, J. P., Urban, W. J., Robert, C., O'Day, S. J., Hoos, A., Humphrey, R., Berman, D. M., Lonberg, N., & Korman, A. J. (2013). Development of ipilimumab: a novel immunotherapeutic approach for the treatment of advanced melanoma. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1291(1), 1–13.  
<https://doi.org/10.1111/nyas.12180>
56. Guo, L., Zhang, H., & Chen, B. (2017). Nivolumab as Programmed Death-1 (PD-1) Inhibitor for Targeted Immunotherapy in Tumor. *Journal of Cancer*, 8(3), 410–416.  
<https://doi.org/10.7150/jca.17144>
57. Yarchoan, M., Albacker, L. A., Hopkins, A. C., Montesin, M., Murugesan, K., Vithayathil, T. T., Zaidi, N., Azad, N. S., Laheru, D. A., Frampton, G. M., & Jaffee, E. M. (2019). PD-L1 expression and tumor mutational burden are independent biomarkers in most cancers. *JCI insight*, 4(6), e126908. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.126908>
58. Vaddepally, R. K., Kharel, P., Pandey, R., Garje, R., & Chandra, A. B. (2020). Review of Indications of FDA-Approved Immune Checkpoint Inhibitors per NCCN Guidelines with the Level of Evidence. *Cancers*, 12(3), 738. <https://doi.org/10.3390/cancers12030738>
59. Myers G. (2018). Immune-related adverse events of immune checkpoint inhibitors: a brief review. *Current oncology (Toronto, Ont.)*, 25(5), 342–347. <https://doi.org/10.3747/co.25.4235>
60. Liu, Y. H., Zang, X. Y., Wang, J. C., Huang, S. S., Xu, J., & Zhang, P. (2019). Diagnosis and Management of Immune Related Adverse Events (irAEs) in Cancer Immunotherapy. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 120, 109437.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109437>

61. Michot, J. M., Bigenwald, C., Champiat, S., Collins, M., Carbonnel, F., Postel-Vinay, S., Berdelou, A., Varga, A., Bahleda, R., Hollebecque, A., Massard, C., Fuerea, A., Ribrag, V., Gazzah, A., Armand, J. P., Amellal, N., Angevin, E., Noel, N., Boutros, C., Mateus, C., ... Lambotte, O. (2016). Immune-related adverse events with immune checkpoint blockade: a comprehensive review. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, *54*, 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2015.11.016>
62. Haanen, J., Carbonnel, F., Robert, C., Kerr, K. M., Peters, S., Larkin, J., Jordan, K., & ESMO Guidelines Committee (2017). Management of toxicities from immunotherapy: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, *28*(suppl\_4), iv119–iv142. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx225>
63. Kennedy, L. B., & Salama, A. (2020). A review of cancer immunotherapy toxicity. *CA: a cancer journal for clinicians*, *70*(2), 86–104. <https://doi.org/10.3322/caac.21596>
64. Brahmer, J. R., Lacchetti, C., Schneider, B. J., Atkins, M. B., Brassil, K. J., Caterino, J. M., Chau, I., Ernstoff, M. S., Gardner, J. M., Ginex, P., Hallmeyer, S., Holter Chakrabarty, J., Leighl, N. B., Mammen, J. S., McDermott, D. F., Naing, A., Nastoupil, L. J., Phillips, T., Porter, L. D., Puzanov, I., ... National Comprehensive Cancer Network (2018). Management of Immune-Related Adverse Events in Patients Treated With Immune Checkpoint Inhibitor Therapy: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, *36*(17), 1714–1768. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.77.6385>
65. Darnell, E. P., Mooradian, M. J., Baruch, E. N., Yilmaz, M., & Reynolds, K. L. (2020). Immune-Related Adverse Events (irAEs): Diagnosis, Management, and Clinical Pearls. *Current oncology reports*, *22*(4), 39. <https://doi.org/10.1007/s11912-020-0897-9>
66. Eigentler, T. K., Hassel, J. C., Berking, C., Aberle, J., Bachmann, O., Grünwald, V., Kähler, K. C., Loquai, C., Reinmuth, N., Steins, M., Zimmer, L., Sendl, A., & Gutzmer, R. (2016). Diagnosis, monitoring and management of immune-related adverse drug reactions of anti-PD-1 antibody therapy. *Cancer treatment reviews*, *45*, 7–18. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2016.02.003>
67. Wang, P. F., Chen, Y., Song, S. Y., Wang, T. J., Ji, W. J., Li, S. W., Liu, N., & Yan, C. X. (2017). Immune-Related Adverse Events Associated with Anti-PD-1/PD-L1 Treatment for



Malignancies: A Meta-Analysis. *Frontiers in pharmacology*, 8, 730.

<https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00730>

68. Simeone, E., Grimaldi, A. M., Festino, L., Trojaniello, C., Vitale, M. G., Vanella, V., Palla, M., & Ascierto, P. A. (2019). Immunotherapy in metastatic melanoma: a novel scenario of new toxicities and their management. *Melanoma management*, 6(4), MMT30.

<https://doi.org/10.2217/mmt-2019-0005>

69. Chang, L. S., Barroso-Sousa, R., Tolaney, S. M., Hodi, F. S., Kaiser, U. B., & Min, L. (2019). Endocrine Toxicity of Cancer Immunotherapy Targeting Immune Checkpoints.

*Endocrine reviews*, 40(1), 17–65. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00006>

70. Asher, N., Marom, E. M., Ben-Betzalel, G., Baruch, E. N., Steinberg-Silman, Y., Schachter, J., Shapira-Frommer, R., & Markel, G. (2019). Recurrent Pneumonitis in Patients with Melanoma Treated with Immune Checkpoint Inhibitors. *The oncologist*, 24(5), 640–647.

<https://doi.org/10.1634/theoncologist.2018-0352>

71. Ellithi, M., Elnair, R., Chang, G. V., & Abdallah, M. A. (2020). Toxicities of Immune Checkpoint Inhibitors: Itis-Ending Adverse Reactions and More. *Cureus*, 12(2), e6935.

<https://doi.org/10.7759/cureus.6935>

72. Sanchis-Borja, M., Ricordel, C., Chiappa, A. M., Hureaux, J., Odier, L., Jeannin, G., Descourt, R., Gervais, R., Monnet, I., Auliac, J. B., & Chouaïd, C. (2020). Encephalitis related to immunotherapy for lung cancer: Analysis of a multicenter cohort. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 143, 36–39.

<https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2020.03.006>

73. Reynolds, K. L., & Guidon, A. C. (2019). Diagnosis and Management of Immune Checkpoint Inhibitor-Associated Neurologic Toxicity: Illustrative Case and Review of the Literature. *The oncologist*, 24(4), 435–443. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2018-0359>

74. Abdel-Rahman, O., Oweira, H., Petrusch, U., Helbling, D., Schmidt, J., Mannhart, M., Mehrabi, A., Schöb, O., & Giryes, A. (2017). Immune-related ocular toxicities in solid tumor patients treated with immune checkpoint inhibitors: a systematic review. *Expert review of anticancer therapy*, 17(4), 387–394.

<https://doi.org/10.1080/14737140.2017.1296765>

75. Johnson, D. B., Balko, J. M., Compton, M. L., Chalkias, S., Gorham, J., Xu, Y., Hicks, M., Puzanov, I., Alexander, M. R., Bloomer, T. L., Becker, J. R., Slosky, D. A., Phillips, E. J., Pilkinton, M. A., Craig-Owens, L., Kola, N., Plautz, G., Reshef, D. S., Deutsch, J. S., Deering, R. P., ... Moslehi, J. J. (2016). Fulminant Myocarditis with Combination Immune

Checkpoint Blockade. *The New England journal of medicine*, 375(18), 1749–1755.

<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1609214>

76. Salem, J. E., Allenbach, Y., Vozy, A., Brechot, N., Johnson, D. B., Moslehi, J. J., & Kerneis, M. (2019). Abatacept for Severe Immune Checkpoint Inhibitor-Associated Myocarditis. *The New England journal of medicine*, 380(24), 2377–2379.

<https://doi.org/10.1056/NEJMc1901677>

77. Petrelli, F., Ardito, R., Borgonovo, K., Lonati, V., Cabiddu, M., Ghilardi, M., & Barni, S. (2018). Haematological toxicities with immunotherapy in patients with cancer: a systematic review and meta-analysis. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 103, 7–16.

<https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.07.129>

78. Indini, A., Di Guardo, L., Cimminiello, C., Prisciandaro, M., Randon, G., De Braud, F., & Del Vecchio, M. (2019). Immune-related adverse events correlate with improved survival in patients undergoing anti-PD1 immunotherapy for metastatic melanoma. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 145(2), 511–521. <https://doi.org/10.1007/s00432-018-2819-x>

79. Freeman-Keller, M., Kim, Y., Cronin, H., Richards, A., Gibney, G., & Weber, J. S. (2016). Nivolumab in Resected and Unresectable Metastatic Melanoma: Characteristics of Immune-Related Adverse Events and Association with Outcomes. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 22(4), 886–894.

<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1136>

80. Teulings, H. E., Limpens, J., Jansen, S. N., Zwinderman, A. H., Reitsma, J. B., Spuls, P. I., & Luiten, R. M. (2015). Vitiligo-like depigmentation in patients with stage III-IV melanoma receiving immunotherapy and its association with survival: a systematic review and meta-analysis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 33(7), 773–781. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.57.4756>

81. Ricciuti, B., Genova, C., De Giglio, A., Bassanelli, M., Dal Bello, M. G., Metro, G., Brambilla, M., Baglivo, S., Grossi, F., & Chiari, R. (2019). Impact of immune-related adverse events on survival in patients with advanced non-small cell lung cancer treated with nivolumab: long-term outcomes from a multi-institutional analysis. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 145(2), 479–485. <https://doi.org/10.1007/s00432-018-2805-3>

82. Toi, Y., Sugawara, S., Kawashima, Y., Aiba, T., Kawana, S., Saito, R., Tsurumi, K., Suzuki, K., Shimizu, H., Sugisaka, J., Ono, H., Domeki, Y., Terayama, K., Nakamura, A.,



Yamanda, S., Kimura, Y., & Honda, Y. (2018). Association of Immune-Related Adverse Events with Clinical Benefit in Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer Treated with Nivolumab. *The oncologist*, 23(11), 1358–1365.

<https://doi.org/10.1634/theoncologist.2017-0384>

83. Kim, H. I., Kim, M., Lee, S. H., Park, S. Y., Kim, Y. N., Kim, H., Jeon, M. J., Kim, T. Y., Kim, S. W., Kim, W. B., Kim, S. W., Lee, D. H., Park, K., Ahn, M. J., Chung, J. H., Shong, Y. K., Kim, W. G., & Kim, T. H. (2017). Development of thyroid dysfunction is associated with clinical response to PD-1 blockade treatment in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology*, 7(1), e1375642.

<https://doi.org/10.1080/2162402X.2017.1375642>

84. Teraoka, S., Fujimoto, D., Morimoto, T., Kawachi, H., Ito, M., Sato, Y., Nagata, K., Nakagawa, A., Otsuka, K., Uehara, K., Imai, Y., Ishida, K., Fukuoka, J., & Tomii, K. (2017). Early Immune-Related Adverse Events and Association with Outcome in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Patients Treated with Nivolumab: A Prospective Cohort Study. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 12(12), 1798–1805. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2017.08.022>

85. Wolchok, J. D., Hoos, A., O'Day, S., Weber, J. S., Hamid, O., Lebbé, C., Maio, M., Binder, M., Bohnsack, O., Nichol, G., Humphrey, R., & Hodi, F. S. (2009). Guidelines for the evaluation of immune therapy activity in solid tumors: immune-related response criteria. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15(23), 7412–7420. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-1624>

86. Carter, B. W., Bhosale, P. R., & Yang, W. T. (2018). Immunotherapy and the role of imaging. *Cancer*, 124(14), 2906–2922. <https://doi.org/10.1002/cncr.31349>

87. Hodi, F. S., Ballinger, M., Lyons, B., Soria, J. C., Nishino, M., Tabernero, J., Powles, T., Smith, D., Hoos, A., McKenna, C., Beyer, U., Rhee, I., Fine, G., Winslow, N., Chen, D. S., & Wolchok, J. D. (2018). Immune-Modified Response Evaluation Criteria In Solid Tumors (imRECIST): Refining Guidelines to Assess the Clinical Benefit of Cancer Immunotherapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 36(9), 850–858. <https://doi.org/10.1200/JCO.2017.75.1644>

88. Grecea, M., Marabelle, A., Ammari, S., Massard, C., & Champiat, S. (2020). Managing Hyperprogressive Disease in the Era of Programmed Cell Death Protein 1/Programmed

- Death-Ligand 1 Blockade: A Case Discussion and Review of the Literature. *The oncologist*, 25(5), 369–374. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2019-0671>
89. Borcoman, E., Nandikolla, A., Long, G., Goel, S., & Le Tourneau, C. (2018). Patterns of Response and Progression to Immunotherapy. *American Society of Clinical Oncology educational book. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting*, 38, 169–178. [https://doi.org/10.1200/EDBK\\_200643](https://doi.org/10.1200/EDBK_200643)
90. Taube, J. M., Klein, A., Brahmer, J. R., Xu, H., Pan, X., Kim, J. H., Chen, L., Pardoll, D. M., Topalian, S. L., & Anders, R. A. (2014). Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 20(19), 5064–5074. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-3271>
91. Wang, X., Teng, F., Kong, L., & Yu, J. (2016). PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes. *OncoTargets and therapy*, 9, 5023–5039. <https://doi.org/10.2147/OTT.S105862>
92. Slabý, O. (2019). Nádorová mutační nálož z pohledu molekulární patologie. *Farmakoterapie*, 15(2), 279–285.
93. Chen, D. S., & Mellman, I. (2017). Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature*, 541(7637), 321–330. <https://doi.org/10.1038/nature21349>
94. Faria, S. S., Fernandes, P. C., Jr, Silva, M. J., Lima, V. C., Fontes, W., Freitas-Junior, R., Eterovic, A. K., & Forget, P. (2016). The neutrophil-to-lymphocyte ratio: a narrative review. *Ecancermedicalscience*, 10, 702. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2016.702>
95. Gopalakrishnan, V., Spencer, C. N., Nezi, L., Reuben, A., Andrews, M. C., Karpinets, T. V., Prieto, P. A., Vicente, D., Hoffman, K., Wei, S. C., Cogdill, A. P., Zhao, L., Hudgens, C. W., Hutchinson, D. S., Manzo, T., Petaccia de Macedo, M., Cotechini, T., Kumar, T., Chen, W. S., Reddy, S. M., ... Wargo, J. A. (2018). Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science (New York, N.Y.)*, 359(6371), 97–103. <https://doi.org/10.1126/science.aan4236>
96. Elkrief, A., Derosa, L., Zitvogel, L., Kroemer, G., & Routy, B. (2019). The intimate relationship between gut microbiota and cancer immunotherapy. *Gut microbes*, 10(3), 424–428. <https://doi.org/10.1080/19490976.2018.1527167>

97. Watt W. B. (1967). Pteridine biosynthesis in the butterfly *Colias eurytheme*. *The Journal of biological chemistry*, 242(4), 565–572.
98. Wachter H., Fuchs D., Hausen A., et al. (1991). *Neopterin: Biochemistry, Methods, Clinical Application*. Berlin, Germany: De Gruyter.
99. *Neopterin*. (2020). Johanna Gostner. <http://www.neopterin.net/>
100. Maggi, E., Parronchi, P., Manetti, R., Simonelli, C., Piccinni, M. P., Ruggi, F. S., De Carli, M., Ricci, M., & Romagnani, S. (1992). Reciprocal regulatory effects of IFN-gamma and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 148(7), 2142–2147.
101. Diez-Ruiz, A., Titz, G. P., Zangerle, R., Baier-Bitterlich, G., Wachter, H., & Fuchs, D. (1995). Soluble receptors for tumour necrosis factor in clinical laboratory diagnosis. *European journal of haematology*, 54(1), 1–8. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.1995.tb01618.x>
102. Huber, C., Batchelor, J. R., Fuchs, D., Hausen, A., Lang, A., Niederwieser, D., Reibnegger, G., Swetly, P., Troppmair, J., & Wachter, H. (1984). Immune response-associated production of neopterin. Release from macrophages primarily under control of interferon-gamma. *The Journal of experimental medicine*, 160(1), 310–316. <https://doi.org/10.1084/jem.160.1.310>
103. Fuchs, D., Weiss, G., & Wachter, H. (1993). Neopterin, biochemistry and clinical use as a marker for cellular immune reactions. *International archives of allergy and immunology*, 101(1), 1–6. <https://doi.org/10.1159/000236491>
104. Fuchs, D., Stahl-Hennig, C., Gruber, A., Murr, C., Hunsmann, G., & Wachter, H. (1994). Neopterin--its clinical use in urinalysis. *Kidney International. Supplement*, 47, S8–S11.
105. Werner, E. R., Bichler, A., Daxenbichler, G., Fuchs, D., Fuith, L. C., Hausen, A., Hetzel, H., Reibnegger, G., & Wachter, H. (1987). Determination of neopterin in serum and urine. *Clinical Chemistry*, 33(1), 62–66.
106. Arnošťová, V., (2016). *Stanovení neopterinu v biologickém materiálu* [Diplomová práce]. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra analytické chemie.

107. Mayersbach, P., Augustin, R., Schennach, H., Schönitzer, D., Werner, E. R., Wachter, H., & Reibnegger, G. (1994). Commercial enzyme-linked immunosorbent assay for neopterin detection in blood donations compared with RIA and HPLC. *Clinical chemistry*, 40(2), 265–266.
108. Fuchs, D., Hausen, A., Reibnegger, G., Werner, E. R., von Dittrich, P., & Wachter, H. (1988). Neopterin levels in long-term hemodialysis. *Clinical nephrology*, 30(4), 220–224.
109. Melichar, B. (1994). Neopterin a jeho význam v klinické diagnostice. *Časopis Lékařů Českých*, 113(15), 455-458.
110. Wachter, H., Fuchs, D., Hausen, A., Reibnegger, G., & Werner, E. R. (1989). Neopterin as marker for activation of cellular immunity: immunologic basis and clinical application. *Advances in clinical chemistry*, 27, 81–141. [https://doi.org/10.1016/s0065-2423\(08\)60182-1](https://doi.org/10.1016/s0065-2423(08)60182-1)
111. Fuchs, D., Weiss, G., Reibnegger, G., & Wachter, H. (1992). The role of neopterin as a monitor of cellular immune activation in transplantation, inflammatory, infectious, and malignant diseases. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 29(3-4), 307–341. <https://doi.org/10.3109/10408369209114604>
112. Eisenhut M. (2013). Neopterin in Diagnosis and Monitoring of Infectious Diseases. *Journal of biomarkers*, 2013, 196432. <https://doi.org/10.1155/2013/196432>
113. Denz, H., Fuchs, D., Hausen, A., Huber, H., Nachbaur, D., Reibnegger, G., Thaler, J., Werner, E. R., & Wachter, H. (1990). Value of urinary neopterin in the differential diagnosis of bacterial and viral infections. *Klinische Wochenschrift*, 68(4), 218–222. <https://doi.org/10.1007/BF01662720>
114. Prat, C., Domínguez, J., Andreo, F., Blanco, S., Pallarés, A., Cuchillo, F., Ramil, C., Ruiz-Manzano, J., & Ausina, V. (2006). Procalcitonin and neopterin correlation with aetiology and severity of pneumonia. *The Journal of infection*, 52(3), 169–177. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2005.05.019>
115. Schennach, H., Hessenberger, G., Mayersbach, P., Schönitzer, D., & Fuchs, D. (2002). Acute cytomegalovirus infections in blood donors are indicated by increased serum neopterin concentrations. *Medical microbiology and immunology*, 191(2), 115–118. <https://doi.org/10.1007/s00430-002-0148-8>

116. Zangerle, R., Schönitzer, D., Fuchs, D., Möst, J., Dierich, M. P., & Wachter, H. (1992). Reducing HIV transmission by seronegative blood. *Lancet (London, England)*, 339(8785), 130–131. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(92\)91046-b](https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)91046-b)
117. Fuchs, D., Jäger, H., Popescu, M., Reibnegger, G., Werner, E. R., Dierich, M. P., Kaboth, W., Titz, G. P., & Wachter, H. (1990). Immune activation markers to predict AIDS and survival in HIV-1 seropositives. *Immunology letters*, 26(1), 75–79. [https://doi.org/10.1016/0165-2478\(90\)90178-s](https://doi.org/10.1016/0165-2478(90)90178-s)
118. Fuchs, D., Spira, T. J., Hausen, A., Reibnegger, G., Werner, E. R., Felmayer, G. W., & Wachter, H. (1989). Neopterin as a predictive marker for disease progression in human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clinical Chemistry*, 35(8), 1746–1749.
119. Hagberg, L., Norkrans, G., Gisslen, M., Wachter, H., Fuchs, D., & Svennerholm, B. (1996). Intrathecal immunoactivation in patients with HIV-1 infection is reduced by zidovudine but not by didanosine. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 28(4), 329–333. <https://doi.org/10.3109/00365549609037914>
120. Hagberg, L., Dotevall, L., Norkrans, G., Larsson, M., Wachter, H., & Fuchs, D. (1993). Cerebrospinal fluid neopterin concentrations in central nervous system infection. *The Journal of infectious diseases*, 168(5), 1285–1288. <https://doi.org/10.1093/infdis/168.5.1285>
121. Fuchs, D., Chiodi, F., Albert, J., Asjö, B., Hagberg, L., Hausen, A., Norkrans, G., Reibnegger, G., Werner, E. R., & Wachter, H. (1989). Neopterin concentrations in cerebrospinal fluid and serum of individuals infected with HIV-1. *AIDS (London, England)*, 3(5), 285–288. <https://doi.org/10.1097/00002030-198905000-00006>
122. Fuchs, D., Hausen, A., Kofler, M., Kosanowski, H., Reibnegger, G., & Wachter, H. (1984). Neopterin as an index of immune response in patients with tuberculosis. *Lung*, 162(6), 337–346. <https://doi.org/10.1007/BF02715666>
123. Eisenhut, M., Hargreaves, D. S., Scott, A., Housley, D., Walters, A., & Mulla, R. (2016). Determination of Urinary Neopterin/Creatinine Ratio to Distinguish Active Tuberculosis from Latent Mycobacterium tuberculosis Infection. *Journal of biomarkers*, 2016, 5643853. <https://doi.org/10.1155/2016/5643853>
124. Brown, A. E., Herrington, D. A., Webster, H. K., Clyde, D. F., Szein, M. B., Davis, J. R., Beier, M. S., & Edelman, R. (1992). Urinary neopterin in volunteers experimentally

infected with *Plasmodium falciparum*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 86(2), 134–136. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(92\)90539-o](https://doi.org/10.1016/0035-9203(92)90539-o)

125. Pacileo, M., Cirillo, P., De Rosa, S., Ucci, G., Petrillo, G., Musto D'Amore, S., Sasso, L., Maietta, P., Spagnuolo, R., & Chiariello, M. (2007). The role of neopterin in cardiovascular disease. *Monaldi archives for chest disease = Archivio Monaldi per le malattie del torace*, 68(2), 68–73. <https://doi.org/10.4081/monaldi.2007.454>

126. Lanser, L., Pölzl, G., Fuchs, D., Weiss, G., & Kurz, K. (2019). Neopterin is Associated with Disease Severity and Outcome in Patients with Non-Ischaemic Heart Failure. *Journal of clinical medicine*, 8(12), 2230. <https://doi.org/10.3390/jcm8122230>

127. De Rosa, S., Cirillo, P., Pacileo, M., Petrillo, G., D'Ascoli, G. L., Maresca, F., Ziviello, F., & Chiariello, M. (2011). Neopterin: from forgotten biomarker to leading actor in cardiovascular pathophysiology. *Current vascular pharmacology*, 9(2), 188–199. <https://doi.org/10.2174/157016111794519372>

128. Darlington, L. G., Mackay, G. M., Forrest, C. M., Stoy, N., George, C., & Stone, T. W. (2007). Altered kynurenine metabolism correlates with infarct volume in stroke. *The European journal of neuroscience*, 26(8), 2211–2221. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05838.x>

129. Mommsen, P., Frink, M., Pape, H. C., van Griensven, M., Probst, C., Gaulke, R., Krettek, C., & Hildebrand, F. (2009). Elevated systemic IL-18 and neopterin levels are associated with posttraumatic complications among patients with multiple injuries: a prospective cohort study. *Injury*, 40(5), 528–534. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2008.08.007>

130. Baydar, T., Yuksel, O., Sahin, T. T., Dikmen, K., Girgin, G., Sipahi, H., Kurukahvecioglu, O., Bostanci, H., & Sare, M. (2009). Neopterin as a prognostic biomarker in intensive care unit patients. *Journal of critical care*, 24(3), 318–321. <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2008.06.013>

131. Tasdelen Fisgin, N., Aliyazicioglu, Y., Tanyel, E., Coban, A. Y., Ulger, F., Zivalioglu, M., Esen, S., & Lelebicioglu, H. (2010). The value of neopterin and procalcitonin in patients with sepsis. *Southern medical journal*, 103(3), 216–219. <https://doi.org/10.1097/SMJ.0b013e3181cf11a1>

132. Reibnegger, G., Aichberger, C., Fuchs, D., Hausen, A., Spielberger, M., Werner, E. R., Margreiter, R., & Wachtehr, H. (1991). Posttransplant neopterin excretion in renal allograft

recipients--a reliable diagnostic aid for acute rejection and a predictive marker of long-term graft survival. *Transplantation*, 52(1), 58–63. <https://doi.org/10.1097/00007890-199107000-00012>

133. Grebe, S. O., & Mueller, T. F. (2002). Immune monitoring in organ transplantation using neopterin. *Current drug metabolism*, 3(2), 189–202. <https://doi.org/10.2174/1389200024605109>

134. D'agostino, L. E., Ventimiglia, F., Verna, J. A., Colina, A., Aguirre, Y., Arturi, A., & Capparelli, A. (2013). Correlation between DAS-28 and neopterin as a biochemical marker of immune system activation in early rheumatoid arthritis. *Autoimmunity*, 46(1), 44–49. <https://doi.org/10.3109/08916934.2012.722143>

135. Maerker-Alzer, G., Diemer, O., Strümper, R., & Rohe, M. (1986). Neopterin production in inflamed knee joints: high levels in synovial fluids. *Rheumatology international*, 6(4), 151–154. <https://doi.org/10.1007/BF00541281>

136. Ahmadzai, H., Cameron, B., Chui, J., Lloyd, A., Wakefield, D., & Thomas, P. S. (2013). Measurement of neopterin, TGF- $\beta$ 1 and ACE in the exhaled breath condensate of patients with sarcoidosis. *Journal of breath research*, 7(4), 046003. <https://doi.org/10.1088/1752-7155/7/4/046003>

137. Husain, N., Tokoro, K., Popov, J. M., Naides, S. J., Kwasny, M. J., & Buchman, A. L. (2013). Neopterin concentration as an index of disease activity in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Journal of clinical gastroenterology*, 47(3), 246–251. <https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e3182582cdb>

138. Nancey, S., Boschetti, G., Moussata, D., Cotte, E., Peyras, J., Cuerq, C., Haybrard, J., Charlois, A. L., Mialon, A., Chauvenet, M., Stroeymeyt, K., Kaiserlian, D., Drai, J., & Flourié, B. (2013). Neopterin is a novel reliable fecal marker as accurate as calprotectin for predicting endoscopic disease activity in patients with inflammatory bowel diseases. *Inflammatory bowel diseases*, 19(5), 1043–1052. <https://doi.org/10.1097/MIB.0b013e3182807577>

139. Nasonov, E., Samsonov, M., Beketova, T., Semenkova, L., Wachter, H., & Fuchs, D. (1995). Serum neopterin concentrations in Wegener's granulomatosis correlate with vasculitis activity. *Clinical and experimental rheumatology*, 13(3), 353–356.



140. Hönlinger, M., Fuchs, D., Reibnegger, G., Schönitzer, D., Dierich, M. P., & Wachter, H. (1992). Neopterin screening and acute cytomegalovirus infections in blood donors. *The Clinical investigator*, 70(1), 63. <https://doi.org/10.1007/BF00422943>
141. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
142. Geng, M., Xiao, H., Liu, J., Song, Y., Fu, P., Cheng, X., Zhang, J., & Wang, G. (2018). The diagnostic role and dynamic changes in cerebrospinal fluid neopterin during treatment of patients with primary central nervous system lymphoma. *Cancer medicine*, 7(8), 3889–3898. <https://doi.org/10.1002/cam4.1581>
143. Viaccoz, A., Ducray, F., Tholance, Y., Barcelos, G. K., Thomas-Maisonneuve, L., Ghesquières, H., Meyronet, D., Quadrio, I., Cartalat-Carel, S., Louis-Tisserand, G., Jouanneau, E., Guyotat, J., Honnorat, J., & Perret-Liaudet, A. (2015). CSF neopterin level as a diagnostic marker in primary central nervous system lymphoma. *Neuro-oncology*, 17(11), 1497–1503. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov092>
144. Holečková, P., Krčmová, L., Kalábová, H., Kašparová, M., Plíšek, J., Pála, M., Vitek, P., Solichová, D., Zezulová, M., Studentová, H., & Melichar, B. (2012). Prognostic significance of serum retinol, serum alpha-tocopherol, and urinary neopterin in patients with head and neck carcinoma treated with external beam radiation. *International journal for vitamin and nutrition research. Internationale Zeitschrift für Vitamin- und Ernährungsforschung. Journal international de vitaminologie et de nutrition*, 82(2), 77–84. <https://doi.org/10.1024/0300-9831/a000096>
145. Melicharová, K., Kalábová, H., Krcmová, L., Urbánek, L., Solichová, D., & Melichar, B. (2010). Effect of comorbidity on urinary neopterin in patients with breast carcinoma. *European journal of cancer care*, 19(3), 340–345. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2354.2008.01058.x>
146. Kalábová, H., Krcmová, L., Kasparová, M., Plíšek, J., Laco, J., Hyspler, R., Klozová, H., Solichová, D., & Melichar, B. (2011). Prognostic significance of increased urinary neopterin concentrations in patients with breast carcinoma. *European journal of gynaecological oncology*, 32(5), 525–529.
147. Unal, B., Kocer, B., Altun, B., Surmeli, S., Aksaray, S., Balci, M., Ozlu, B., & Cengiz, O. (2009). Serum neopterin as a prognostic indicator in patients with gastric carcinoma.



*Journal of investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research*, 22(6), 419–425. <https://doi.org/10.3109/08941930903410783>

148. Melichar, B., Solichová, D., Svobodová, I., Urbánek, L., Veselý, P., & Melicharová, K. (2006). Urinary neopterin in patients with liver tumors. *Tumori*, 92(4), 318–322.

149. Talar-Wojnarowska, R., Gasiorowska, A., Olakowski, M., Lekstan, A., Lampe, P., & Malecka-Panas, E. (2010). Clinical value of serum neopterin, tissue polypeptide-specific antigen and CA19-9 levels in differential diagnosis between pancreatic cancer and chronic pancreatitis. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) ... [et al.]*, 10(6), 689–694. <https://doi.org/10.1159/000320693>

150. Piecuch, J., Rudzki, M., Orkisz, W., Swietochowska, E., Wielkoszyński, T., Waniczek, D., Arendt, J., Sosada, K., Zurawiński, W., & Ładny, J. R. (2008). Neopterin--a potential factor for differentiation between pancreatic cancer and chronic pancreatitis. *Hepato-gastroenterology*, 55(81), 258–261.

151. Zezulová, M., Bartoušková, M., Hlídková, E., Juráňová, J., Červinková, B., Kasalová, E., Adam, T., Krčmová, L. K., Solichová, D., Cwiertka, K., Vrána, D., & Melichar, B. (2016). Prognostic Significance of Serum and Urinary Neopterin Concentrations in Patients with Rectal Carcinoma Treated with Chemoradiation. *Anticancer research*, 36(1), 287–292.

152. Melichar, B., Kalábová, H., Krčmová, L. K., Trivedi, S. V., Králíčková, P., Malířová, E., Pecka, M., Študentová, H., Zezulová, M., Holečková, P., & Solichová, D. (2014). Urinary neopterin concentrations during combination therapy with cetuximab in previously treated patients with metastatic colorectal carcinoma. *In vivo (Athens, Greece)*, 28(5), 953–959.

153. Melichar, B., Solichová, D., & Freedman, R. S. (2006). Neopterin as an indicator of immune activation and prognosis in patients with gynecological malignancies. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*, 16(1), 240–252. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1438.2006.00294.x>

154. Avall Lundqvist, E., Nordström, L., Sjövall, K., & Eneroth, P. (1989). Evaluation of seven different tumour markers for the establishment of tumour marker panels in gynecologic malignancies. *European journal of gynaecological oncology*, 10(6), 395–405.

155. Melichar, B., Lenzi, R., Rosenblum, M., Kudelka, A. P., Kavanagh, J. J., Melicharova, K., Templin, S., Garcia, M. E., Abbruzzese, J. L., & Freedman, R. S. (2003). Intraperitoneal fluid neopterin, nitrate, and tryptophan after regional administration of interleukin-12. *Journal*

of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997), 26(3), 270–276.

<https://doi.org/10.1097/00002371-200305000-00010>

156. Reibnegger, G. J., Bichler, A. H., Dapunt, O., Fuchs, D. N., Fuith, L. C., Hausen, A., Hetzel, H. M., Lutz, H., Werner, E. R., & Wachter, H. (1986). Neopterin as a prognostic indicator in patients with carcinoma of the uterine cervix. *Cancer research*, 46(2), 950–955.

157. Volgger, B. M., Windbichler, G. H., Zeimet, A. G., Graf, A. H., Bogner, G., Angleitner-Boubenizek, L., Rohde, M., Denison, U., Sliutz, G., Fuith, L. C., Fuchs, D., & Marth, C. (2016). Long-term significance of urinary neopterin in ovarian cancer: a study by the Austrian Association for Gynecologic Oncology (AGO). *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 27(9), 1740–1746.

<https://doi.org/10.1093/annonc/mdw248>

158. Park, I. S., Lee, Y. S., Kim, J. C., & Hwang, S. G. (1995). Serum neopterin levels in ovarian tumors. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*, 51(3), 229–234.

[https://doi.org/10.1016/0020-7292\(95\)80010-7](https://doi.org/10.1016/0020-7292(95)80010-7)

159. Isci Bostanci, E., Ugras Dikmen, A., Girgin, G., Gungor, T., Baydar, T., & Nuri Danisman, A. (2017). A New Diagnostic and Prognostic Marker in Endometrial Cancer: Neopterin. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*, 27(4), 754–758.

<https://doi.org/10.1097/IGC.0000000000000952>

160. Melichar, B., Solichová, D., Svobodová, I., & Melicharová, K. (2005). Neopterin in renal cell carcinoma: inhalational administration of interleukin-2 is not accompanied by a rise of urinary neopterin. *Luminescence : the journal of biological and chemical luminescence*, 20(4-5), 311–314. <https://doi.org/10.1002/bio.852>

161. Melichar, B., Solichová, D., Svobodová, I., & Melicharová, K. (2005). Neopterin in renal cell carcinoma: inhalational administration of interleukin-2 is not accompanied by a rise of urinary neopterin. *Luminescence : the journal of biological and chemical luminescence*, 20(4-5), 311–314. <https://doi.org/10.1002/bio.852>

162. Pichler, R., Fritz, J., Heidegger, I., Steiner, E., Culig, Z., Klocker, H., & Fuchs, D. (2017). Predictive and prognostic role of serum neopterin and tryptophan breakdown in prostate cancer. *Cancer science*, 108(4), 663–670. <https://doi.org/10.1111/cas.13171>

163. Weinlich, G., Murr, C., Richardsen, L., Winkler, C., & Fuchs, D. (2007). Decreased serum tryptophan concentration predicts poor prognosis in malignant melanoma patients. *Dermatology (Basel, Switzerland)*, 214(1), 8–14. <https://doi.org/10.1159/000096906>
164. Melichar, B., Dvorák, J., Jandík, P., Tousková, M., Solichová, D., Megancová, J., & Voboril, Z. (2001). Intraarterial chemotherapy of malignant melanoma metastatic to the liver. *Hepato-gastroenterology*, 48(42), 1711–1715.
165. Gerding, H., Cremer-Bartels, G., Krause, K., & Busse, H. (1993). Neopterin in patients with choroidal melanoma. *European journal of clinical chemistry and clinical biochemistry : journal of the Forum of European Clinical Chemistry Societies*, 31(4), 221–224. <https://doi.org/10.1515/cclm.1993.31.4.221>
166. Holečková, P., Krčmová, L., Létal, J., Svobodník, A., Kalábová, H., Kašparová, M., Plíšek, J., Pála, M., Vítek, P., Solichová, D., Zezulová, M., Študentová, H., Doležel, M., & Melichar, B. (2013). Urinary neopterin concentration and toxicity of radiotherapy in patients with head and neck carcinoma during external beam radiation. *Anticancer research*, 33(9), 4097–4101.
167. Delanoy, N., Michot, J. M., Comont, T., Kramkimel, N., Lazarovici, J., Dupont, R., Champiat, S., Chahine, C., Robert, C., Herbaux, C., Besse, B., Guillemin, A., Mateus, C., Pautier, P., Saïag, P., Madonna, E., Maerevoet, M., Bout, J. C., Leduc, C., Biscay, P., ... Lambotte, O. (2019). Haematological immune-related adverse events induced by anti-PD-1 or anti-PD-L1 immunotherapy: a descriptive observational study. *The Lancet. Haematology*, 6(1), e48–e57. [https://doi.org/10.1016/S2352-3026\(18\)30175-3](https://doi.org/10.1016/S2352-3026(18)30175-3)
168. Meyers, D. E., Hill, W. F., Suo, A., Jimenez-Zepeda, V., Cheng, T., & Nixon, N. A. (2018). Aplastic anemia secondary to nivolumab and ipilimumab in a patient with metastatic melanoma: a case report. *Experimental hematology & oncology*, 7, 6. <https://doi.org/10.1186/s40164-018-0098-5>
169. Michot, J. M., Vargaftig, J., Leduc, C., Quere, G., Burrioni, B., Lazarovici, J., Champiat, S., Ribrag, V., & Lambotte, O. (2017). Immune-related bone marrow failure following anti-PD1 therapy. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 80, 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.04.004>

170. Wright, Z., & Brown, A. (2017). High-grade neutropenia in a patient successfully treated with nivolumab for refractory primary mediastinal B-cell lymphoma. *Blood advances*, *1*(17), 1306–1308. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017008607>
171. Bartoušková, M., Hrouzková, M., Čtvrtlík, F., Petrová, P., Rušarová, N., Kučerová, K. ř., Vernerová, A., Melichar, B., & Študentová, H. (2020). Potential utilization of neopterin measurements in the assessment of pyrexia in metastatic melanoma treated with combined targeted therapy: a case report. *Pteridines*, *31*(1), 151–157. <https://doi.org/10.1515/pteridines-2020-0009>
172. Daud, A., & Tsai, K. (2017). Management of Treatment-Related Adverse Events with Agents Targeting the MAPK Pathway in Patients with Metastatic Melanoma. *The oncologist*, *22*(7), 823–833. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2016-0456>
173. Vera, J., Paludo, J., Kottschade, L., Brandt, J., Yan, Y., Block, M., McWilliams, R., Dronca, R., Loprinzi, C., Grothey, A., & Markovic, S. N. (2019). Case series of dabrafenib-trametinib-induced pyrexia successfully treated with colchicine. *Supportive care in cancer : official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer*, *27*(10), 3869–3875. <https://doi.org/10.1007/s00520-019-4654-2>

## Seznam obrázků

Obrázek 1: Incidence a mortalita na maligní melanom (C43)	11
Obrázek 2: Zastoupení klinických stádií v čase	11
Obrázek 3. Srovnání incidence celosvětově	14
Obrázek 4. Incidence a stupeň závažnosti imunitně podmíněných nežádoucích účinku v závislosti na délce imunoterapie	34
Obrázek 5. Chemická struktura pteridinu a neopterinu	48
Obrázek 6. Syntéza neopterinu při imunitní reakci	49
Obrázek 7. Tvorba neopterinu v makrofágu pod vlivem interferonu gamma	50

## Seznam tabulek

Tabulka 1: TNM klasifikace kategorie pT	16
Tabulka 2: TNM klasifikace kategorie N	17
Tabulka 3: TNM klasifikace kategorie M, LDH	17
Tabulka 4: Rozdělení do klinických stádií	18
Tabulka 5: Normální hodnoty neopterinu v moči u zdravých mužů a žen v závislosti na věku	52
Tabulka 6: Normální hodnoty neopterinu v séru	52
Tabulka 7. Charakteristika souboru pacientů s imunitně podmíněnými nežádoucími účinky a pacientů z kontrolní skupiny (dle věku, pohlaví a primárního tumoru)	68
Tabulka 8. Charakteristika souboru pacientů s imunitně podmíněnými nežádoucími účinky (dle léčebného režimu)	69
Tabulka 9. Typy imunitně podmíněných nežádoucích účinků	70
Tabulka 10. Srovnání neopterinu v séru u pacientů s imunitně podmíněnými nežádoucími účinky a kontrolní skupinou v průběhu imunoterapie.	70
Tabulka 11: Korelace mezi neopterinem a CRP v séru s dalšími sledovanými parametry. Tabulka ukazuje Spearmanovy korelační koeficienty (v závorce je hodnota p). Statisticky významné rozdíly jsou zvýrazněny.	83
Tabulka 12: Výsledky Coxovy regrese	83
Tabulka 13: Hodnoty biomarkerů (neopterin v séru, neopterin v moči, citrulin v plazmě) před léčbou a během prvních 3 návštěv.	83

## Seznam grafů

Graf 1: Vzestup neopterinu v séru po podání nivolumabu předchází rozvoji agranulocytózy	64
Graf 2: Vývoj leukopenie v průběhu terapie kortikosteroidy. Dvacátý den hospitalizace dochází k nárůstu počtu leukocytů	65
Graf 3: Absolutní počet neutrofilů v průběhu terapie kortikosteroidy. Dvacátý den hospitalizace dochází k nárůstu absolutního počtu neutrofilů	65
Graf 4: Opakované vzestupy neopterinu v séru po podání kombinované imunoterapie předchází rozvoji imunitně podmíněných nežádoucích účinků, po zaléčení kortikoidy a mycofenolát mofetilem vidíme pokles neopterinu v séru	67
Graf 5: Vzestup neopterinu v době vzniku imunitně podmíněné hepatitidy a následný pokles po zaléčení kortikoidy	71
Graf 6: Vzestup vzestup bilirubinu při vzniku imunitně podmíněné hepatitidy s postupnou normalizací po zaléčení kortikoidy	70
Graf 7: Vzestup neopterinu po 3. dávce ipilimumabu při vzniku imunitně podmíněného nežádoucího účinku a následnou normalizaci po zaléčení kortikoidy	72
Graf 8: Znázorňuje výrazný vzestup neopterinu v době vzniku imunitně podmíněných průjmů, následný pokles po zaléčení kortikoidy	72
Graf 9: Opakované vzestupy neopterinu u pacientky s recidivující imunitně podmíněnou artritidou, 1. epizoda od 22. 9. 2019 (neopterinu na 10,83) zaléčena kortikoterapií, 2. epizoda 30. 10. 2019 (neopterin 22,43), 3. epizoda 10. 1. 2020 (neopterin 9,54)	73
Graf 10. Poměr hodnoty neopterin v moči/ kreatinin v průběhu cílené léčby	76
Graf 11. Neopterin v séru v průběhu cílení léčby. V období zhoršení klinického stavu je zde patrný výrazný vzestup neopterinu na neměřitelnou hodnotu způsobený pravděpodobně aktivací imunitního systému v průběhu cílené léčby	76
Graf 12. Znázorňuje CRP v průběhu cílené terapie, v době zhoršení klinického stavu vykazuje již klesající tendenci (CRP 65g/l)	77

## Seznam zkratk

HMB-45 - human melanoma black  
CDKN2A - cyklin dependent kinase inhibitor 2A  
BRCA- BReast CAncer  
SPF - sun protection factor  
LMM - lentigo maligna melanom  
SSM - superficiálně se šířící melanom  
NMM - nodulární melanom  
ALM - akrolentiginózní melanom  
LDH - laktátdehydrogenáza  
PD-1 - programmed cell death  
PD-L1 - programmed death-ligand 1  
CTLA-4 - cytotoxic T-lymphocyte antigen 4  
OS - overall survival  
PFS - Progression-free survival  
ORR - odds ratio  
AUC - area under the curve  
HR - hazard ratio  
AJCC - American Joint Committee on Cancer  
MAPK - mitogen-activated protein kinases  
BCG - Bacillus Calmette-Guérin  
IL-2 - interleukin 2  
IFN- $\alpha$  - intereferon alfa  
M1 - makrofág typu M1  
M2 - makrofág typu M2  
TGF- $\beta$  - tumor growth factor- $\beta$   
TREG - regulátory T cells  
HER-2 - human epidermal growth factor receptor 2  
LAK - lymphokine-activated killer  
TIL - tumor-infiltrating lymphocytes  
CAR - chimeric antigen receptor  
irAEs - immune-related adverse events, ir-AEs



NCI-CTCAE - National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events

ALT - alaninaminotransferáza

AST - aspartátaminotransferáza

CMV - cytomegalovirus

Anti-TPO - protilátky proti tyreoperoxidáze

ACTH - adrenokortikotropní hormon

MR - magnetická rezonance

NSCLC - nonsmall-cell lung carcinoma

CRP - C-reaktivní protein

NT-pro BNP – N-terminal brain natriuretic peptide

HRCT - High Resolution Computed Tomography

BAL - bronchoalveolární laváž

IVIG - intravenózní imunoglobuliny

PCR - Polymerase Chain Reaction

HSV - herpes simplex virus

ASCO - American Society of Clinical Oncology

ESMO - European Society for Medical Oncology

NCCN - National Comprehensive Cancer Network

RECIST - Response Evaluation Criteria in Solid Tumours

iUPD - unconfirmed progressive disease

TPS - Tumor Proportion Score

CPS - Combined Positive Score

MSI - Microsatellite instability

VEGF - vascular endothelial growth factor

GTP - guanosintrifosfát

HPLC - High Performance Liquid Chromatography

ELISA - Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

RIA - radioimmunoassay

MODS - multiple organ dysfunction syndrome

RFS - relapse-free survival

FOLFIRI - 5-fluorouracil, leukovorin, irinotekan

ANC - absolute neutrophil count

SD - standard deviation

Gy - Gray

NLR - Neutrophil-Lymphocyte Ratio

PLR - Platelet-to-Lymphocyte Ratio

LMR - Lymphocytes to Monocyte Ratio

## Seznam prací autorky dizertace

### 1) Práce související s dizertační prací

#### a) Původní vědecké publikace in extenso v daném oboru uveřejněné v časopisech s IF

1. **Bartoušková, M.**, Hrouzková, M., Čtvrtlík, F., Petrová, P., Rušarová, N., Kučerová, K. ř., Vernerová, A., Melichar, B., & Študentová, H. (2020). Potential utilization of neopterin measurements in the assessment of pyrexia in metastatic melanoma treated with combined targeted therapy: a case report. *Pteridines*, 31(1), 151–157. <https://doi.org/10.1515/pteridines-2020-0009>
2. Zezulová, M., **Bartoušková, M.**, Hlídková, E., Juráňová, J., Červinková, B., Kasalová, E., Adam, T., Krčmová, L. K., Solichová, D., Cwierka, K., Vrána, D., & Melichar, B. (2016). Prognostic Significance of Serum and Urinary Neopterin Concentrations in Patients with Rectal Carcinoma Treated with Chemoradiation. *Anticancer research*, 36(1), 287–292.
3. Zezulová, M., **Bartoušková, M.**, Hlídková, E., Adam, T. š., Krčmová, L. K., Červinková, B., Solichová, D., Zlevorová, M., Cwierka, K., Friedecký, D., Vrána, D., & Melichar, B. (2016). Citrulline as a biomarker of gastrointestinal toxicity in patients with rectal carcinoma treated with chemoradiation. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 54(2), 305–314. <https://doi.org/10.1515/cclm-2015-0326>
4. Melichar, B., Hružová, K., Krčmová, L. K., Javorská, L., Pešková, E. š., Solichová, D., Hyšpler, R., Malířová, E., Vošmik, M., **Bartoušková, M.**, Klos, D. š., & Študentová, H. (2017). Association of peripheral blood cell count-derived ratios, biomarkers of inflammatory response and tumor growth with outcome in previously treated metastatic colorectal carcinoma patients receiving cetuximab. *Pteridines*, 28(3–4), 221–232. <https://doi.org/10.1515/pterid-2017-0016>
5. Vitásková, D., Melichar, B., **Bartoušková, M.**, Vlachová, Z., Vrána, D., Janková, J., Adam, T. š., Juráňová, J., Zlámalová, N., Kujovská Krčmová, L., Javorská, L., Klos, D. š., & Študentová, H. (2017). Neoadjuvant combination therapy with trastuzumab in a breast cancer patient with synchronous rectal carcinoma: a case report and biomarker study. *Pteridines*, 28(3–4), 233–241. <https://doi.org/10.1515/pterid-2017-0017>

- Melichar, B., Vitásková, D., **Bartoušková, M.**, Javorská, L., Kujovská Krčmová, L., Pešková, E. š., Hyšpler, R., Solichová, D., Hružová, K., & Študentová, H. (2017). Comparison of performance of composite biomarkers of inflammatory response in determining the prognosis of breast cancer patients. *Pteridines*, 28(3–4), 213–220. <https://doi.org/10.1515/pterid-2017-0005>

**b) Původní vědecké publikace in extenso uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech**

**c) Přehledné/ souborné vědecké práce v daném oboru uveřejněné v časopisech s IF**

- Bartoušková, M.**, & Melichar, B. (2020). Precision medicine in medical oncology: hope, disappointment and reality. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 58(9), 1427–1431. <https://doi.org/10.1515/cclm-2020-0231>
- Melichar, B., Spisarová, M., **Bartoušková, M.**, Krčmová, L. K., Javorská, L., & Študentová, H. (2017). Neopterin as a biomarker of immune response in cancer patients. *Annals of Translational Medicine*, 5(13), 280. <https://doi.org/10.21037/atm.2017.06.29>

**d) Přehledné/ souborné vědecké práce uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech**

**Bartoušková, M.** (2016). ESMO 2016 - ve znamení imunoterapie, pohádka o metastatickém melanomu pokračuje. *Prague Onco News*, 6(2), 18-19.

**e) Kapitoly v monografiích (uvést autory, editory, název monografie, autory a název kapitol, počet stran, podíl uchazeče na publikaci v procentech)**

**f) Publikovaná abstrakta**

**g) Seznam přednášek/posterů přednesených uchazečem**

**Zahraniční přednášky**

- Circulating neopterin and citrulline concentrations in patients with germ-cell tumors during chemotherapy, 34th International Winter Workshop, Clinical, Chemical and Biochemical Aspects of Pteridines and Related Topics, Innsbruck, 24-27. února 2015

2. Association between Neopterin and Citrulline, a biomarker of gut function, during treatment of Nivolumab, 36th International Winter Workshop Clinical, Chemical and Biochemical Aspects of Pteridines and Related Topics, Innsbruck, 21- 24. února 2017

## 2) Ostatní publikace

### a) Původní vědecké publikace in extenso v daném oboru uveřejněné v časopise s IF

1. Fiala, O., Buchler, T., Mohelnikova-Duchonova, B., Melichar, B., Matejka, V. M., Holubec, L., Kulhankova, J., Bortlicek, Z., **Bartouskova, M.**, Liska, V., Topolcan, O., Sedivcova, M., & Finek, J. (2015). G12V and G12A KRAS mutations are associated with poor outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with bevacizumab. *Tumor Biology*, 37(5), 6823–6830. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4523-7>

### b) Původní vědecké publikace in extenso uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech

### c) Přehledné/ souborné vědecké práce v daném oboru uveřejněné v časopisech s IF

1. **Bartouskova, M.**, Melichar, B., & Mohelnikova-Duchonova, B. (2015). Folate receptor: a potential target in ovarian cancer. *Pteridines*, 26(1), 1–12. <https://doi.org/10.1515/pterid-2014-0013>
2. Vrána, D., Matzenauer, M., Neoral, Č., Aujeský, R., Vrba, R., Melichar, B., Rušarová, N., **Bartoušková, M.**, & Jankowski, J. (2018). From Tumor Immunology to Immunotherapy in Gastric and Esophageal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(1), 13. <https://doi.org/10.3390/ijms20010013>

### d) Přehledné/ souborné vědecké práce uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých časopisech

1. Vrána, D., Kalita, O. ř., Hrabálek, L., Matzenauer, M., **Bartoušková, M.**, Rušarová, N., Tučková, L., & Sedláčková, L. (2019). Primary Intracranial Sarcomas, Myxoid Meningeal Sarcoma – a Case Report and Literature Review. *Klinická Onkologie*, 32(3), 214–219. <https://doi.org/10.14735/amko2019214>
2. Rušarová, N., & **Bartoušková, M.** (2020). Atezolizumab v léčbě karcinomu prsu. *Onkologická Revue*, 7(2), 46-49.

3. Rušarová, N., **Bartoušková, M.**, & Študentová, H. (2019). Hormonálně senzitivní karcinom prostaty. *Česká Urologie*, 23(4), 309-315.  
<https://www.prolekare.cz/casopisy/ceska-urologie/2019-4-21/hormonalne-senzitivni-karcinom-prostaty-121498>
4. Rušarová, N., Študentová, H., & **Bartoušková, M.** (2019). Testikulární nádory. *Onkologie*, 13(1), 37-42. <http://www.onkologiecs.cz/archiv.php>
5. Rušarová, N., & **Bartoušková, M.** (2018). Léčba karcinomu ledviny - adjuvantní terapie. *Zn Plus*, 67(19), 16-18.
6. Rušarová, N., **Bartoušková, M.**, & Vrána, D. (2019). Aktuální léčebné možnosti pacientek s metastatickým HER-2+/HER-2- karcinomem prsu. *Onkologická Revue*, 6(2), 32-39.

**e) Kapitoly v monografiích (uvést autory, editory, název monografie, autory a název kapitol, počet stran, podíl uchazeče na publikaci v procentech)**

VRÁNA, David. *Nádory jícnu a žaludku*. Praha: Farmakon Press, spol. s r.o., [2018]. Farmakoterapie. ISBN 978-80-906589-6-7. Kapitola Rizikové faktory.

**f) Publikovaná abstrakta**

1. Zezulová, M., Melichar, B., & **Bartoušková, M.** (2016). Jaká je v současnosti optimální sekvence systémové terapie u metastatického kolorektálního karcinomu? *Klinická Onkologie. XI. Brněnské Onkologické Dny A Xxx. Konference Pro Nelékařské Zdravotnické Pracovníky, Brno, 27.-29. 4. 2016*, 29(Suppl. 2), 84.  
<https://www.linkos.cz/casopis-klinicka-onkologie/>
2. Fiala, O., Büchler, T., Melichar, B., Mohelníková-Duchoňová, B., Matějka, V., Holubec, L., Kulhánková, J., **Bartoušková, M.**, Bortlíček, Z., Liška, V., Topolčan, O., & Fínek, J. (2015). Význam typu mutace genu KRAS pro predikci efektu léčby bevacizumabem u pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem. *Klinická Onkologie*, 28(Supplementum 1), 99. <http://www.prolekare.cz/klinicka-onkologie-clanek/nadory-tlusteho-streva-a-konecniku-52202>

**g) Seznam přednášek/posterů přednesených uchazečem**

1. **Bartoušková, M.** (2013). Stanovení neopterinu a citrulinu u pacientů s kolorektálním karcinomem. In ... *konference studentských vědeckých prací Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci*
2. **Bartoušková, M., Jandl, M., & Šustková, Z.** (2012). Sledování hladiny neopterinu jako markeru systémové imunitní odpovědi u pacientů s karcinomem. In ... *konference studentských vědeckých prací Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci*

### **3) Seznam přednášek posterů přednesených uchazečem na veřejných odborných fórech**

1. Circulating neopterin and citrulline concentrations in patients with germ-cell tumors during chemotherapy, 34th International Winter Workshop, Clinical, Chemical and Biochemical Aspects of Pteridines and Related Topics, Innsbruck, 24-27. února 2015
2. Association between Neopterin and Citrulline, a biomarker of gut function, during treatment of Nivolumab, 36th International Winter Workshop Clinical, Chemical and Biochemical Aspects of Pteridines and Related Topics, Innsbruck, 21- 24. února 2017

