

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

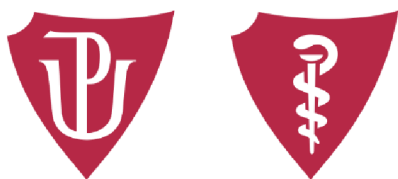
Lékařská fakulta



DISERTAČNÍ PRÁCE

2022

MUDr. Martina Spisarová



Lékařská
fakulta

Univerzita Palackého
v Olomouci

Disertační práce

**Prediktivní a prognostické faktory u pacientů s karcinomem
ledviny léčených imunoterapií**

MUDr. Martina Spisarová

Onkologická klinika

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

Olomouc 2022



Faculty of Medicine
and Dentistry

Palacký University
Olomouc

Doctoral Thesis

**Predictive and prognostic factors in renal cancer patients
treated by immunotherapy**

Martina Spisarová, M.D.

Department of Oncology

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

Olomouc 2022

Místopřísežně prohlašuji, že doktorskou disertační práci jsem zpracovala samostatně, a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje. Současně tímto dávám souhlas k zařazení své práce do Lékařské knihovny Lékařské fakulty UP v Olomouci, kde může být užívána ke studijním účelům za předpokladu, že v případě použití pro publikační či přednáškové účely bude tento zdroj řádně citován.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze své práce v informačním systému Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne 30. 6. 2022

MUDr. Martina Spisarová

Ráda bych na tomto místě poděkovala především vedoucímu mé disertační práce Prof. MUDr. Bohuslavu Melicharovi, Ph.D., bez jeho odborného vedení, podnětných připomínek a času, který mi věnoval, by tato práce nemohla vzniknout. Velké díky patří i kolegům a přátelům z řad naší kliniky, kteří mi poskytli cenné rady a neváhali se podělit o své zkušenosti s velkou ochotou a trpělivostí. Současně bych chtěla poděkovat své rodině, zejména manželovi a rodičům, kteří mě podporovali po celou dobu mého studia a následně i při psaní vlastní disertační práce.

Obsah

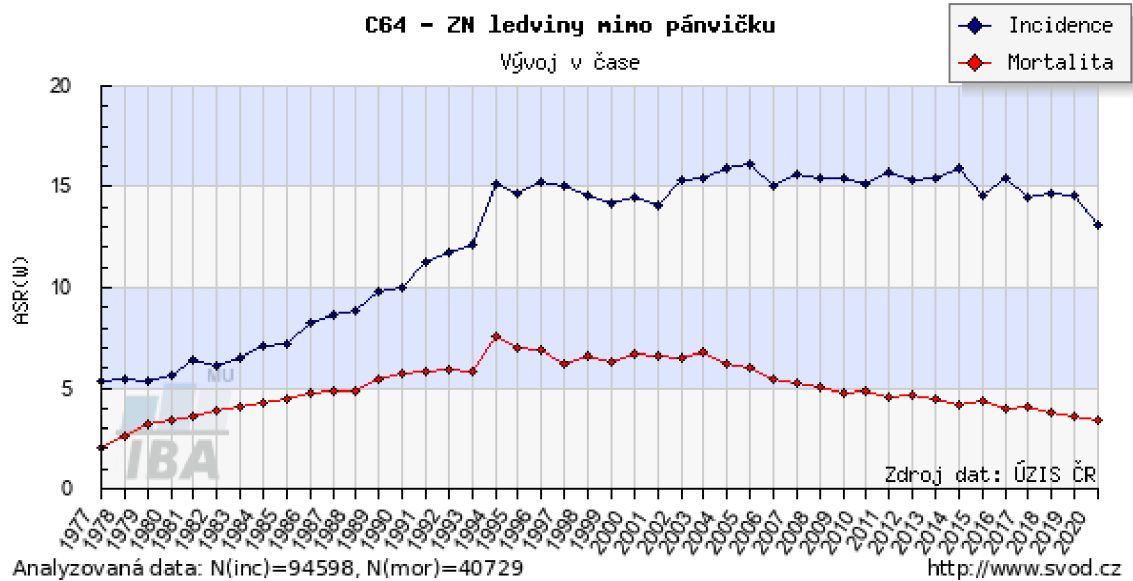
1. TEORETICKÝ ÚVOD	8
1.1 Karcinom ledviny.....	8
1.1.1 Epidemiologie.....	8
1.1.2 Histologické varianty, etiologie a onkogeneze	10
1.1.3 Systémová terapie karcinomu ledviny	13
1.2 Postavení imunoterapie v léčbě karcinomu ledviny.....	16
1.2.1 Mechanismus účinku checkpoint inhibitorů	17
1.2.2 Farmakodynamika, farmakokinetika a metabolismus	18
1.2.3 Klinický účinek nivolumabu v monoterapii	19
1.2.4 Klinický účinek nivolumabu v kombinaci s ipilimumabem.....	20
1.3 Prognostické a prediktivní biomarkery	22
1.4 Neopterin.....	27
1.4.1 Neopterin jako biomarker	27
1.4.2 Neopterin jako prognostický biomarker u pacientů s nádorovým onemocněním	28
2. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE.....	30
3. SOUBOR NEMOCNÝCH A METODY	31
3.1 Pacienti.....	31
3.2 Laboratorní metodika a statistická analýza	33
4. VÝSLEDKY.....	35
5. DISKUZE	48
6. ZÁVĚR.....	52
7. SEZNAM OBRÁZKŮ	53
8. SEZNAM TABULEK	54
9. SEZNAM ZKRATEK.....	55
10. SEZNAM POUŽITÝCH PRAMENŮ A LITERATURY	58
11. SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA DISERTAČNÍ PRÁCE	70

1. TEORETICKÝ ÚVOD

1.1 Karcinom ledviny

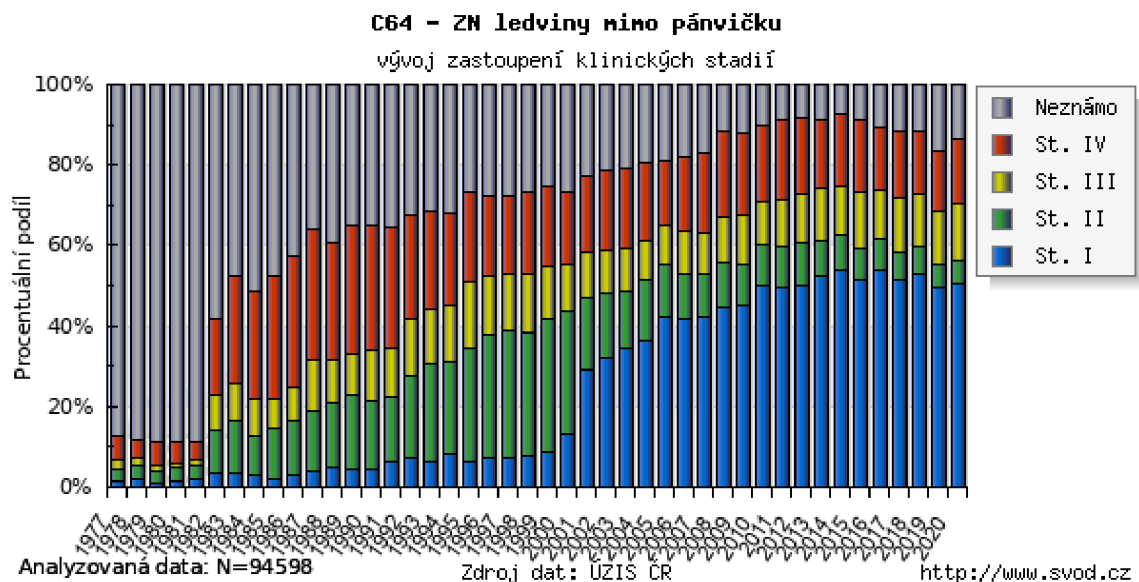
1.1.1 Epidemiologie

Karcinom ledviny (RCC, renal cell carcinoma) celosvětově představuje šestou nejčastěji se vyskytující malignitu u mužů a desátou nejčastější u žen. Tvoří zhruba 5 % všech zhoubných nádorů u mužů, respektive 3 % u žen. Jeho incidence v posledních letech neustále narůstala (1, 2). Za rok 2020 onemocnělo touto diagnózou 2909 osob a 917 jich na tuto nemoc zemřelo. Zvyšující se incidence je zřejmě způsobena zvyšujícím se počtem provedených zobrazovacích vyšetření. Sonografie břicha je dnes velmi dostupnou metodou, kterou lze provést v podmínkách ambulantních specialistů a toto vyšetření je indikováno z mnoha důvodů, které nakonec náhodně odhalí tuto onkologickou diagnózu. Rovněž dostupnost CT (computed tomography) vyšetření se v posledních desítkách let velmi zlepšila, a proto je karcinom ledviny zachycen častěji než dříve. Tento fakt má vliv i na záchyt nižších stádií nemoci. S narůstajícím záchytem stádií I a II je spojen pokles incidence stádií III a IV. Spolu s rozšiřujícími se možnostmi nejen systémové terapie, ale i chirurgické léčby karcinomu ledviny, právě vyšší záchyt časných stádií onemocnění způsobil pokles mortality. Zatímco v roce 2010 na karcinom ledviny zemřelo 1224 osob, v roce 2020 jich zemřelo o více než 300 méně, tedy 917 (2, 3).



Obrázek 1: Incidence a mortalita zhoubných ledviny mimo pánvičku

Zdroj dat: Národní onkologický registr. Převzato z www.svod.cz



Obrázek 2: Zastoupení klinických stadií v procentech zhoubných nádorů ledviny mimo pánvičku

Zdroj dat: Národní onkologický registr. Převzato z www.svod.cz

1.1.2 Histologické varianty, etiologie a onkogeneze

Pod pojmem renální karcinom se skrývá řada odlišných typů nádoru ledvin, které v mikroskopickém obraze vypadají velmi odlišně a rovněž mají značně rozdílnou biologii chování. Roky byly nádory ledviny spojovány pod jedinou entitou. Dnes je snaha o diferenciaci na různé poddruhy hnána znalostmi o různé biologii, klinickém chování a zejména pak různé odpovědi na léčbu (4). Nejčastějším histologickým typem je světlobuněčný renální karcinom, reprezentující asi 70-75 % nádorů ledvin u dospělých pacientů. Tento typ nádoru bývá bohatě vaskularizován a mohou na něm být patrné známky krvácení a nekróz, které nám popíše patolog. Mikroskopicky se jedná o nádor složený z buněk se světlou cytoplasmou díky nahromadění lipidů a glykogenu (5). Molekulární znaky karcinomu ledviny zahrnují zejména ztrátu funkce von Hippel Lindauova (VHL) proteinu a dysregulaci jeho signální dráhy. VHL gen je klasickým tumorsupresorovým genem, pro který je typická nutná ztráta obou alel, jedná se tedy o autosomálně dominantní charakter VHL syndromu se zvýšeným rizikem nejen karcinomu ledviny, ale i nádorů sítnice, hemangioblastomu mozečku, jiných tumorů mozku, cyst a nádorů pankreatu. Jedna kopie genu bývá mutována až u 90 % sporadických nádorů ledvin (6). Za normálních okolností je VHL protein důležitou součástí E3 ubiquitin ligázového komplexu, který cílí na hypoxia-inducible factor (HIF) pro degradaci proteinu v proteazomech. Naopak bílelická ztráta VHL genu vede ke stabilizaci HIF bez ohledu na stav oxygenace tkáně a ústí v expresi proangiogenních faktorů, které jsou zásadní v onkogenezi RCC (7).

Dalším typem nádoru ledvin je papilární renální karcinom, je to druhý nejčastější typ dospělého RCC, který reprezentuje asi 15 % případů. Ještě stále jsou rozlišovány dva typy papilárního karcinomu (podle klasifikace vydané WHO v roce 2016). Typ 1 je charakterizován papilární či tubulární strukturou s malými bazofilními buňkami se světlou cytoplasmou a malými jádřky, zatímco u typu 2 jsou velké buňky s eosinofilní cytoplasmou a promínujícími jádřky (8). U sporadických papilárních karcinomů je velký molekulárně biologický rozdíl mezi typem 1 a typem 2 papilárního karcinomu. Zatímco u typu 1 je molekulární podklad onemocnění založen na mutaci v doméně pro tyrozinkinázový receptor, u typu 2 je známa celá řada mutací způsobujících ztrátu funkce CDKN2a (cyclin dependent kinase inhibitor 2A), aktivaci NRF2 (nuclear factor erythroid

2-related factor 2) či mutaci chromatinových regulátorů. To vše činí z papilárního karcinomu ledviny typu 2 velmi heterogenní skupinu tumorů (9).

Zatímco světlobuněčný a papilární karcinom tvoří 80-90 % RCC, ostatní typy jsou méně časté. Chromofobní karcinom se nachází zhruba u 5 % dospělých pacientů, má zřetelné mezibuněčné hranice a bohatou světlou či bazofilní cytoplasmu.

Je nutné zmínit, že každý z výše uvedených subtypů může obsahovat sarkomatoidní diferenciaci buněk. Sarkomatoidní komponenta se objevuje u zhruba 4-5% renálních karcinomů, závisí však na histologickém subtypu, stádiu choroby a rozhodující je rovněž patologický popis. Procentuální zastoupení stoupá u vyšších stádií choroby, u pacientů s metastatickým onemocněním tvoří okolo 20% (10). Tyto tzv. sarkomatoidní nádory mají tendence se chovat jako nediferencované tumory s velmi agresivním růstem a sklonem k hematogennímu rozsevu. Rovněž strategie léčby je u nádorů se sarkomatoidní složkou odlišná, historicky nebyla systémová terapie příliš úspěšná, avšak s příchodem imunoterapie a zejména kombinované imunoterapie, se přežití pacientů i s tímto typem nádoru prodloužilo (11-13).

Na rozdíl od světlobuněčného, papilárního a chromofobního karcinomu, které vycházejí z renálního kortexu, některé další typy tumorů vychází z jiných oblastí ledvin. Nádory ze sběrných kanálek a medulární karcinom mají původ v ledvinné dřeni. Nádor ze sběrných kanálek je občas těžké odlišit od uroteliálního karcinomu vývodných močových cest. Medulární karcinom se zase často objevuje u mladých pacientů (4).

Je známo, že jednotlivé histologické varianty karcinomu ledviny mají odlišnou prognózu. Například papilární karcinom, má obdobnou prognózu jako konvenční světlobuněčný renální karcinom (ccRCC). Situace je samozřejmě komplikovanější vzhledem k faktu, že i samotná papilární histologie zahrnuje několik různých subtypů. Karcinomy s řídící mutací v MET dráze (Hepatocyte growth factor receptor), tedy typ 1 papilárního karcinomu, má velmi dobrou prognózu a často je zachycen v časném stádiu. Naopak typ 2 papilárního karcinomu má velkou tendenci k metastazování a s tím spojenou špatnou prognózu nemocných (9). Karcinom ze sběrných kanálek a medulární

karcinom, tedy tumory vycházející z ledvinné dřeně, patří mezi vysoce agresivní malignity se špatnou prognózou a celkovým přežitím kolem několika málo měsíců (14).

Nejen prognóza onemocnění může být předpovězena z důkladné histologické klasifikace tumorů ledvin. Patologická zpráva nám může pomoci i v rozhodování o volbě terapie. Jedním ze znaků světlobuněčného karcinomu je bialeická ztráta VHL genu s následnou stabilizací hypoxie-inducibilního faktoru (HIF, hypoxia inducible factor), která je spojena s proangiogenními signálními procesy (15, 16). Mezi nimi je zvýšená produkce vaskulárního epitelialního růstového faktoru (VEGF, vascular endothelial growth factor) a aktivace jeho receptoru (VEGFR, vascular endothelial growth factor receptor). Než byla objevena skupina tyrozinkinázových inhibitorů (TKIs, Tyrosine kinase inhibitors), které cílí na VEGFR, studie III. fáze typicky zahrnovaly jinou než světlobuněčnou histologii mezi svými exkluzními kritérii na základě předpokladu, že pacienti s nádory, které jsou VHL intaktní, nebudou profitovat z léčby protiangiogenně zaměřenými léky. Rozšířením těchto léků v běžné praxi se však ukázalo, že některé subtypy renálního karcinomu mohou na tuto léčbu rovněž reagovat (15).

Relativně nízká incidence nesvětlobuněčných variant karcinomu ledviny a jejich časté vyřazení z klinických studií vytváří potřebu tyto nádory lépe pochopit po stránce patogenetických mechanismů, biologického chování a možností terapie. V dnešní době jsou zkoumány různé lékové skupiny, které by mohly znamenat zlepšení přežití nemocných s nccRCC. Mezi takové se řadí tyrozinkinázové inhibitory, mTOR inhibitory, MET inhibitory, samozřejmě imunoterapie, ale i chemoterapie založená na platinových derivátech. Stejně jako u konvenčního ccRCC, i v této skupině tumorů chybí relevantní prognostické i prediktivní biomarkery (17).

Nejlepších výsledků při léčbě imunoterapií dosahuje rovněž ccRCC, avšak účinnost checkpoint inhibitorů (ICI, Immune checkpoint inhibitors) byla prokázána i u pacientů s nesvětlobuněčnou variantou. Stejně jako u klinických studií s TKIs, i studie s imunotereapeutiky velmi často vyřazují nesvětlobuněčné varianty karcinomu ledvin (nccRCC, non-clear cell Renal cell carcinoma). V retrospektivní studii s nivolumabem pacienti s nccRCC, kteří byli léčeni alespoň jednou předchozí systémovou terapií, odpověděli na tuto léčbu ve 20 % případů (18). Jednou z nejhůře léčebně ovlivnitelných variant je renální karcinom se sarkomatoidní diferenciací. Nyní se však díky eře

kombinované imunoterapie daří i tuto histologickou entitu dostat pod kontrolu. Ve studii III. fáze CheckMate 214 bylo 139 pacientů se sarkomatoidní variantou renálního karcinomu. Kombinace ipilimumab + nivolumab se ukázala být účinnější než terapie sunitinibem. Medián doby do progresse onemocnění (PFS, progression free survival) byl v rameni ipilimumab + nivolumab 26,5 měsíců versus 5,1 měsíců u sunitinibu. Celková léčebná odpověď (ORR, overall response rate) byla 60,8 % (kompletních odpovědí bylo 18,9 %) u ipilimumab + nivolumab versus 23,1 % (kompletních odpovědí bylo 3,1 %) u sunitinibu. Terapie kombinovanou imunoterapií tak dokázala zcela nebývalé výsledky u pacientů léčených v 1. linii léčby a jednoznačně tak zapsala tuto léčbu jako první volbu u pacientů se sarkomatoidní diferenciací karcinomu ledvin (13).

Mezi nejvýznamnější rizikové faktory pro vznik světlobuněčného renálního karcinomu, jakožto nejčastější varianty karcinomu ledviny, patří obezita, nedostatek fyzické aktivity, kouření, užívání fenacetinových analgetik a expozice nevhodným environmentálním vlivům. Z komorbidit pak hypertenze a hyperglykémie, celkově metabolický syndrom (MS, metabolic syndrome) zvyšuje riziko vzniku renálního karcinomu (19). Téměř polovina renálních tumorů je spojena s BMI (body mass index) nad 30kg/m² a riziko vzniku RCC se zvyšuje o 20-35% na každých 5 kg/m² BMI. Role přítomnosti metabolického syndromu v karcinogenezi RCC má patofyziologický podklad zejména v inzulínové rezistenci, chronickém zánětu, angiogenezi a dalších faktorech, které jsou pro MS typické. Změny ve struktuře inzulínu podobného růstového faktoru (IGF, insulin-like growth factor) vedou ke vzniku inzulínové rezistence, která je klíčová jak pro vznik nádoru, tak i pro jeho progresi (20-22). Stejně tak zvýšená hladina volných kyslíkových radikálů spolu s prozánětlivými cytokiny narušuje fyziologické pochody vedoucí k buněčné apoptóze, ovlivňuje proliferaci a invazivitu buněk (23).

1.1.3 Systémová terapie karcinomu ledviny

Systémová léčba karcinomu ledviny prošla za posledních pár let velkými změnami a do našeho armamentária se dostala řada nových léků a jejich vzájemných kombinací. Před zahájením systémové terapie je však nutné pacienta kategorizovat do jednotlivých prognostických skupin. K tomu využíváme prognostický systém MSKCC

(Memorial Sloan-Kettering Cancer Center) nebo IMDC (International Metastatic RCC Database Consortium), viz tabulka 1 a tabulka 2. Stratifikace se odehrává na základě přítomnosti rizikových faktorů (hladina hemoglobinu, hladina laktátdehydrogenázy, sérového kalcia, Karnofského skóre, intervalu od diagnózy k zahájení systémové léčby, hodnoty neutrofilů a hodnoty krevních destiček) (24). Tyto prognostické systémy nám umožňují pomocí bodového ohodnocení rozdělit pacienty před zahájením systémové léčby do jednotlivých skupin, určit tak jejich prognózu, stratifikovat pacienty při zařazení do klinických studií a určit správný typ terapie. V České republice je i úhrada některých léčiv vázána na prognostickou kategorii daného pacienta (25).

Tabulka 1. Skórovací systém dle MSKCC z roku 2002: Platí pro léčbu TKI. Dobrá prognóza: žádný faktor. Střední prognóza: 1 nebo 2 faktory. Špatná prognóza 3 a více faktorů.

LDH > 1,5násobek horní hranice normy
hemoglobin < dolní hranicí normy
korigované sérové kalcium > 2,5
Karnofsky index ≤ 70 %
interval < 1 rok od diagnózy do započetí systémové léčby

Tabulka 2. Skórovací systém dle IMDC z roku 2009: platí pro léčbu TKI nebo kombinace TKI a imunoterapie či nivolumabu a ipilimumabu. Dobrá prognóza: žádný faktor. Střední prognóza: 1 nebo 2 faktory. Špatná prognóza 3 a více faktorů.

hemoglobin < dolní hranice normy
korigované sérové kalcium > 2,5 mmol/l
Karnofsky index ≤ 70 %
interval < 1 rok od diagnózy do započetí systémové léčby
neutrofilie nad horní limit normy
trombocytóza nad horní limit normy

První linie systémové léčby se nyní opírá o imunoterapeutické kombinace. Ipilimumab je monoklonální protilátka, která blokuje interakci mezi inhibičním receptorem CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4) na časně aktivovaných T-lymfocytech a jeho ligandy CD80/CD86 (cluster of differentiation 80, cluster of differentiation 86), které jsou exprimovány na antigen prezentujících buňkách. Nivolumab je dalším tzv. checkpoint inhibítorem. Jedná se o monoklonální protilátku proti PD-1 (programme death receptor 1), která zabraňuje vazbě ligandů na tento receptor. Obě protilátky blokují inhibiční reakce imunitního systému a umožňují tak jeho aktivaci. V dubnu roku 2018 byla FDA (Food and Drug Administration) schválena kombinace ipilimumab plus nivolumab do první linie léčby u pacientů s renálním karcinomem ve špatné a střední prognostické skupině (26). Studie III. fáze CheckMate 214 porovnávala účinnost kombinace nivolumab (v dávce 3 mg/kg) + ipilimumab (v dávce 1 mg/kg) a sunitinibu u pacientů s pokročilým RCC. Kombinace imunoterapie dosáhla lepších výsledků v celkové léčebné odpovědi (ORR, overall response rate) i v počtu dosažených kompletních odpovědí (CR, complete response) (27).

Další možností léčby v první linii je kombinace imunoterapie s TKIs. Pembrolizumab (monoklonální protilátka vážící se na PD-1) v kombinaci s axitinibem (tyrozinkinázovým inhibítorem druhé generace) byl schválen FDA v dubnu 2019. Data ze studie KEYNOTE-426, která zahrnovala pacienty všech tří prognostických skupin, podpořila toto schválení. Pacienti léčení pembrolizumabem plus axitinibem dosáhli lepší ORR a delší doby do progresu (PFS, progression free survival) než pacienti léčení sunitinibem (28).

Cabozantinib (multikinázový inhibitor VEGFRs, MET a AXL) s nivolumabem dosáhli lepšího ORR i PFS oproti terapii sunitinibem ve studii III. fáze CheckMate 9ER (29). Do první linie léčby je rovněž schválena kombinace lenvatinib (multikinázový inhibitor VEGFRs, FGFR, PDGFR, c-KIT a RET) a pembrolizumab, která ve studii CLEAR dosáhla delší PFS i lepší ORR oproti everolimu (30).

Ještě před několika lety byly jasnou volbou terapie do první linie tyrozinkinázové inhibitory, např. sunitinib, cabozantinib, pazopanib, axitinib atd. Většina léků z této skupiny inhibuje receptory pro VEGF, který je ve zvýšené míře produkován při nádorové hypoxii následkem metabolických procesů. Jedná se tak především o útlum

nádorové angiogeneze touto skupinou léčiv. Vedle tohoto hlavního mechanismu účinku však některé, tzv. multikinázové inhibitory, působí tlumivě i na proliferaci buněk a jejich růst (31, 32). Pacienti, u nichž došlo na TKIs k progresi choroby, byli následně léčeni jiným lékem ze skupiny TKIs, popřípadě mTOR (mammalian target of rapamycin) inhibitorem everolimem. Dnes jsou tyto léky vyhrazeny pro pacienty, kteří mají kontraindikaci pro podání imunoterapie, popř. pro pacienty, kteří imunoterapii již absolvovali v rámci terapie jiného onemocnění. Tyrozinkinázové inhibitory v monoterapii tak nyní zůstávají vyhrazeny spíše pro následující linie léčby po selhání první linie.

1.2 Postavení imunoterapie v léčbě karcinomu ledviny

Jak již bylo výše zmíněno, renální karcinom je onemocnění se širokou škálou histologických subtypů a výrazně odlišným biologickým chováním mezi jednotlivými patologickými typy. Vzhledem k tomu, že karcinom ledviny je de facto rezistentní vůči cytostatické terapii, byly v léčbě RCC intenzivně hledány možnosti jiných typů systémové terapie. Renální karcinom je považován za vysoce imunogenní již od doby, kdy byly zaznamenány případy spontánní regrese nádoru právě vlivem imunitních mechanismů (33). Léčba imunoterapeutiky se tak nabízela již dlouhá léta. Avšak zlom v terapii tohoto onemocnění nastal až v posledních letech. Nespecifická imunoterapie měla jen velmi limitovaný klinický účinek. Cytokiny, zejména interferon-alfa (IFN α) a interleukin-2 (IL-2), jako první prokázaly efekt v léčbě mRCC (34). Ačkoli benefit v celkovém přežití nebyl výrazný, přesto byl prokázán ve dvou studiích III. fáze (19). Nespecifická aktivní imunoterapie se tak stala první účinnou systémovou léčbou RCC, která se používala několik desítek let až do objevu tyrozinkinázových inhibitorů. Terapie cytokiny měla své značné limitace, hlavně nepredikovatelnost účinku léčby a vysoké procento nežádoucích účinků, proto zavedení tyrozinkinázových inhibitorů tuto léčbu zcela upozadilo (35, 36).

1.2.1 Mechanismus účinku checkpoint inhibitorů

Pro nádorové buňky jsou typické četné neoantigeny, které vznikají na základě genetických a epigenetických změn v genetické výbavě. Tyto neoantigeny mohou být rozpoznány imunitním systémem, avšak nádorové buňky mají řadu obranných mechanismů, kterými rekognici neoantigenů buňkami imunitního systému zabraňují. Kromě útlumu imunitních dějů v místě vlastního nádorového růstu, spuštění imunitní tolerance a de facto poškozování funkce T-lymfocytů, umí vytvářet vlastní inhibitory imunitní reakce, která normálně vede k destrukci cizích, a tedy i nádorových buněk. Tento poznatek vedl k intenzivnímu hledání léčebného přístupu založeného na útlumu checkpoint inhibitorů (37-39).

Imunoterapie checkpoint inhibitory je jednou z nejnovějších skupin léčiv karcinomu ledviny, která přinesla pacientům s tímto onemocněním výrazný benefit. Kombinace ipilimumabu a nivolumabu je dnes jedna z možných variant léčby mRCC. Nivolumab i ipilimumab jsou monoklonální protilátky, které se váží na kontrolní body (tzv. checkpointy) PD-1 a CTLA-4 imunitního cyklu, oba působí inhibičně na aktivaci T-lymfocytů.

Ipilimumab je lidská monoklonální IgG1 (Immunoglobulin Subclass 1) protilátka proti CTLA-4 s molekulární hmotností 148 kDa a skládá se ze 4 polypeptidových řetězců, dvou identických těžkých a dvou identických lehkých kappa řetězců složených z jednotlivých aminokyselin. Těžké a lehké řetězce jsou spojeny disulfidovou vazbou. Stejně jako nivolumab je vyráběn rekombinantní DNA technologií (40). Nivolumab je lidská monoklonální IgG4 (immunoglobulin G Subclass 4) protilátka proti PD-1 taktéž složená ze dvou těžkých a dvou lehkých řetězců, její molekulární hmotnost je 146 kDa (41).

CTLA-4 je imunoglobulinový receptor na povrchu buněk. Primárně je exprimován na naivních T-lymfocytech a regulačních T-lymfocytech. Aktivace T-lymfocytů je závislá jednak na vazbě T-buněčného receptoru (TCR, T-cell receptor) s antigenem cestou antigen prezentujících buněk (APCs, antigen-presenting cells), ale rovněž na vazbě kostimulační, nejčastěji vazbě CD28 (cluster of differentiation 28) na T-lymfocytech s CD80 nebo CD86 (cluster of differentiation 80/86) nacházejících se na

APCs (42, 43). Je aktivní v časně fázi aktivace T-lymfocytů, zejména CD4+ efektorových T-lymfocytů, zatímco PD-1 inhibuje hlavně CD8+ T-lymfocyty v pozdější fázi imunitní reakce (44). Obě monoklonální protilátky byly poprvé použity v léčbě maligního melanomu a od té doby je jejich efektivita předmětem nespočtu studií u řady maligních onemocnění a u mnoha z nich se již zapsaly jako standard léčby. Dávkovací schéma pro léčbu mRCC, 3mg/kg nivolumabu a 1mg/kg ipilimumabu á 3 týdny podávaných po dobu 4 cyklů a následně nivolumab 3mg/kg á 2 týdny, vychází ze studie CheckMate 214 (45).

1.2.2 Farmakodynamika, farmakokinetika a metabolismus

Nivolumab se váže s vysokou afinitou na PD-1 na N-terminální smyčku mimo variabilní doménu PD-1. PD-1 po navázání ligandů PD-L1 a PD-L2 inhibuje aktivitu T-lymfocytů. PD-L1 je exprimován na celé řadě buněk imunitního systému (T-lymfocytech, B-lymfocytech, dendritických buňkách, makrofázích a monocytech), buňkách ostatních tkání a také na některých maligních buňkách, zatímco PD-L2 nacházíme více na dendritických buňkách, makrofázích, buňkách kostní dřeně a peritoneálních B-lymfocytech (46). Vazba PD-1 s PD-L1 vyústí v inhibiční signál, který zruší aktivační proces, jenž byl zahájen vazbou na receptor T-buněk (TCR, T-cell receptor) a jeho kostimulační receptor CD28 (cluster of differentiation 28), což snižuje aktivitu transkripčních faktorů účastnících se aktivace T-lymfocytů. Proto je inhibice vazby PD-1 s PD-L1 a následná protinádorová odpověď cytotoxických T-lymfocytů stěžejním bodem terapeutického efektu monoklonálních protilátek cílících na PD-1 či PD-L1.

Nivolumab má průměrnou clearance 9,5 ml/hod a střední distribuční objem 8 litrů. Poločas eliminace je asi 26,7 dne a dosahuje ustáleného stavu po 12 týdnech, pokud je podáván á 2 týdny (47).

Ipilimumab se váže na CTLA-4 a blokuje interakci CTLA-4 s jeho ligandy CD80 a CD86. CTLA-4 soutěží s kostimulačním proteinem CD28 o ligandy CD 80 a CD 86, které jsou přítomny na antigen prezentujících buňkách. Interakce mezi těmito ligandy

a CTLA-4 převažuje vazbu CD28 s ligandy CD80 a CD 86, a tím ruší časnou aktivaci a proliferaci T-lymfocytů. Ipilimumab působí bloádou této inhibice protinádorovým účinkem a na rozdíl od nivolumabu je považován za více nespecifický druh imunoterapeutik.

Ipilimumab má průměrnou clearance 16,8 ml/hod, střední distribuční objem 7,2 l, eliminační poločas je 15,4 dnů a dosahuje ustáleného stavu po 3. dávce, pokud je podáván á 3 týdny. Eliminace všech monoklonálních protilátek je primárně zprostředkována vstupem do buněk pomocí endocytózy či pinocytózy s následnou degradací v lysozomech (48).

1.2.3 Klinický účinek nivolumabu v monoterapii

První studií s nivolumabem v léčbě mRCC byla studie fáze Ib 003 s nivolumabem v monoterapii, která zahrnovala pacienty s různými diagnózami (maligní melanom, plicní karcinom, mRCC a několik dalších malignit). V této studii bylo léčeno 34 pacientů s mRCC. Ti dostávali nivolumab v eskalujících dávkách 1, 3 nebo 10 mg/kg á 2 týdny po dobu 2 let. Téměř polovina těchto pacientů byla masivně předléčena, 18 % z nich za sebou mělo 3 předchozí linie léčby a 27 % dokonce 4 předchozí linie. Po 50,5 měsících sledování dosáhlo 29 % pacientů léčebné odpovědi a jeden pacient v kohortě s dávkou 10mg/kg nivolumab dosáhl dokonce kompletní léčebné odpovědi. Medián délky do progresse onemocnění byl 12,9 měsíců (49).

Studie 009 byla studií fáze I, která jako první prospektivní studie s nivolumabem požadovala biopsii tumoru před zahájením léčby a následně biopsii při terapii. Byly zde zařazeni předléčení (74 %) i terapeuticky naivní pacienti (26 %), celkem 91, s mRCC. Z 56 hodnotitelných biopsií mělo 32 % tumorů PD-L1 expresi nad 5 % a nebyla pozorována žádná změna v expresi PD-L1 ani během léčby nivolumabem. Léčebná odpověď byla vyšší u pacientů s PD-L1 expresí nad 5 % (RR, response rate 22 %), zatímco u pacientů s PD-L1 expresí pod 5 % byla RR pouze 8 %. Medián celkového přežití byl 23,4 měsíců u pacientů s PD-L1 pod 5 % a u pacientů s PD-L1 nad 5 % v době analýzy nebyl dosažen. Infiltrace nádoru T-lymfocyty v předléčebném období korelovala s nižší tumorozní náloží (50).

Do studie II. fáze 010 bylo zařazeno 168 předléčených pacientů s mccRCC, kteří dostávali nivolumab v dávce 0,3 mg/kg, 2 mg/kg nebo 10 mg/kg každé 3 týdny. Po 38 měsících sledování dosáhlo ORR 20 až 22 % pacientů v závislosti na podávané dávce nivolumabu. Medián doby do progresce byl 2,7, resp. 4 a 4,2 měsíců a medián celkového přežití činil 18,5, resp. 25,5 a 24,8 měsíců pro dávky 3 mg/kg, 2 mg/kg a 10 mg/kg. Benefit z imunoterapie měli pacienti bez ohledu na počet předchozích linií léčby s antiangiogenními léky (51).

Otevřená randomizovaná studie fáze III CheckMate 025 zahrnovala pacienty s pokročilým světlobuněčným renálním karcinomem, kteří byli v minulosti léčeni 1-2 liniemi antiangiogenní léčby. Pacienti (celkem 821) byli randomizováni do dvou ramen. V prvním rameni dostávali dávku 3 mg/kg nivolumabu každé 2 týdny, v druhém rameni byl podáván everolimus 10 mg každý den do progresce či nepříjemné toxicity. V době sledování 72 měsíců si nivolumab zachoval benefit v OS oproti everolimu. Medián celkového přežití byl u nivolumabu 25,8 měsíců versus 19,7 měsíců u everolimu. ORR byl vyšší u nivolumabu (23 %) než u everolimu (4 %). Mezi nejčastější nežádoucí účinky patřila únava (34,7 % pacientů) a svědění kůže (15,5 %) v rameni s nivolumabem, u everolimu to byla únava (34,5 %) a stomatitidy (29,5 %) (52).

1.2.4 Klinický účinek nivolumabu v kombinaci s ipilimumabem

Multicentrická, otevřená studie fáze I CheckMate 016 hodnotila kombinaci léků zahrnujících nivolumab u pacientů s mccRCC. Studie měla 5 léčebných kohort, z nichž 3 byly kohorty s odlišnými dávkovacími schémata kombinace nivolumab plus ipilimumab a 2 kohorty kombinovaly nivolumab se sunitinibem a pazopanibem. Kombinace nivolumab plus ipilimumab byla podávána v dávkách nivolumab 3 mg/kg plus ipilimumab 1 mg/kg (47 pacientů), nivolumab 1 mg/kg plus ipilimumab 3 mg/kg (47 pacientů) a nivolumab 3 mg/kg plus ipilimumab 3 mg/kg (6 pacientů) intravenózně každé 3 týdny ve 4 cyklech indukční fáze následované nivolumabem samotným v dávce 3mg/kg každé 2 týdny do progresce či nepříjemné toxicity. Pacienti mohli přecházet do pokračovací fáze s nivolumabem i v případě, kdy vzhledem k toxicitě v iniciační fázi nedokončili všechny 4 cykly s ipilimumabem. Celkem 100 pacientů bylo zařazeno

do kohort s kombinovanou imunoterapií, zhruba polovina z nich byla předléčena. Výsledky ramen s dávkovacím schématem nivolumab 3 mg/kg a ipilimumab 1 mg/kg (N3I1) a nivolumab 1 mg/kg a ipilimumab 3 mg/kg (N1I3) byly srovnatelné téměř ve všech stanovených cílech studie. Celková léčebná odpověď byla 40,4 % v obou ramenech a medián doby do progresu onemocnění byl 7,7 měsíců pro N3I1 a 9,4 měsíců pro N1I3. Kompletní léčebná odpověď byla zaznamenána u 10,6 % pacientů v rameni N3I1 a u 29,8 % pacientů byla zaznamenána parciální léčebná odpověď. V rameni N1I3 měli pacienti pouze parciální léčebné odpovědi. Dvoutleté přežití bylo u 67 % pacientů v N3I1 a u 70 % pacientů v N1I3. Právě díky srovnatelným výsledkům efektu léčby v obou ramenech a lepšímu toxickému profilu ramene N3I1 byl tento režim nivolumab 3 mg/kg plus ipilimumab 1 mg/kg vybrán pro další hodnocení v rámci studie III. fáze (53).

Mezinárodní studie III. fáze CheckMate 214 srovnávala kombinaci nivolumab plus ipilimumab versus sunitinib u pacientů v 1. linii léčby mcrRCC. Celkem 1096 pacientů bylo randomizováno mezi jednotlivá léčebná ramena v poměru 1:1. Dávkovací schéma vycházelo ze studie CheckMate 016, tedy nivolumab 3 mg/kg plus ipilimumab 1 mg/kg. Sunitinib byl podáván ve standardním dávkování 50 mg denně 4 týdny následované dvoutýdenní pauzou. Medián celkového přežití nebyl v 18 měsících sledování v rameni s nivolumabem plus ipilimumabem dosažen, u sunitinibu byl medián 32,9 měsíců. Medián doby do progresu činil u imunoterapie 12,4 měsíců a u sunitinibu 12,3 měsíců. Celkové léčebné odpovědi u imunoterapie dosáhlo 39 % pacientů, u sunitinibu 32 % pacientů. Pokud by byla brána v úvahu prognostická skupina, pak ve střední a špatné prognostické skupině dle IMDC přežívalo v době 18 měsíčního sledování 75 % pacientů léčených imunoterapií versus 60 % pacientů léčených sunitinibem. Medián PFS byl 11,6 měsíců versus 8,4 měsíců a ORR byla 42 % (CR 9 %) versus 27 % (CR 1 %) u imunoterapie, respektive u sunitinibu. Stran toxicity prokázala kombinace nivolumab plus ipilimumab lepší výsledky. Nežádoucí účinky stupně 3-4 byly zaznamenány u 46 % pacientů oproti 63 % u sunitinibu. Nejčastějším druhem toxicity vyššího stupně bylo zvýšení lipáz (10 % pacientů), únava (4 %) a průjem (4 %). Úmrtí spojené s léčbou bylo zaznamenáno u 8 pacientů v souvislosti s pneumonitidou, imunitně podmíněnou bronchitidou, aplastickou anémií, jaterním selháním, krvácením z dolního gastrointestinálního traktu a náhlou smrtí (45).

V prodloužené analýze s mediánem sledování 42 měsíců pokračovalo v terapii 11 % pacientů léčených imunoterapií a 5 % pacientů léčených sunitinibem. Medián OS byl 43,6 měsíců v rameni nivolumab plus ipilimumab a 32,3 měsíců v rameni se sunitinibem. Tato studie prokázala účinnost kombinované imunoterapie zejména ve střední a špatné prognostické skupině dle IMDC, ale i v celé léčené populaci a dokázala tak zlepšit výsledky léčby pacientů s mRCC (27).

Zařazení imunoterapie do léčby metastatického karcinomu ledviny znamenalo převrat v terapii tohoto onemocnění. Imunoterapie, ať už vzájemná kombinace checkpoint inhibitorů či její kombinace s antiangioegenními léky, dnes tvoří základ managementu nemoci. Pacienti jsou k terapii indikováni na základě prognostického skóre a do výběru léků promlouvá i celkový stav nemocného a jeho interkurentní onemocnění. Dodnes není jasné, který pacient bude z léčby imunoterapeutiky profitovat. Stále jsou hledány relevantní biomarkery, které by predikovaly odpověď na imunoterapii a uchránily tak pacienty, kteří nebudou mít z léčby checkpoint inhibitory benefit, od nežádoucích účinků, které často terapii provází. Z hlediska závažnosti jsou nežádoucí účinky ve většině případů řešitelné, ale existují i případy, kdy jsou přes veškerou obezřetnost lékaře komplikace fatální.

1.3 Prognostické a prediktivní biomarkery

Přestože terapie checkpoint inhibitory přináší pro pacienty s různými typy malignit včetně karcinomu ledviny obrovský léčebný profit, dodnes nemáme k dispozici uspokojující biomarkery, které by spolehlivě určily skupinu pacientů, pro které bude tento typ léčby nejvíce vhodný. Nebo naopak, pro které pacienty bude imunoterapie vysoce riziková s rozvojem imunitně podmíněných nežádoucích účinků. Možnost takto selektovat nemocné by znamenala obrovský přelom v celé terapeutické strategii a pacientům by přinesla vysoce komfortní léčbu bez větších obav z potenciálně závažných nežádoucích účinků.

Imunitní a zánětlivá odpověď organismu na jakýkoli cizorodý zásah není zprostředkována pouze buňkami a mediátory imunitního systému, ale do reakce

organismu zasahuje celá řada buněk těla. Nádorová buňka, jakožto transformovaná autologní buňka uniklá imunitnímu dohledu, se účastní protinádorové odpovědi stejně jako různé skupiny T-lymfocytů, antigen prezentující buňky atd. Dnes je nejdiskutovanějším a nejsledovanějším biomarkerem PD-L1 (programed cell death ligand) exprese na nádorových buňkách. PD-L1 je ligandem vážícím se na PD-1 receptor na aktivovaných T-lymfocytech. Tato vazba způsobuje, že dochází k omezené imunitní odpovědi a za normálních okolností chrání organismus před vznikem autoimunitních reakcí (54). K setkání ligandu s receptorem, ať už PD-L1 či PD-L2 s PD-1, dochází zejména v periferních tkáních, kde jsou ligandy produkovány samotnými maligními buňkami nebo nádorovým stromatem (55, 56). Vazba ligandu PD-L1 na PD-1 receptor ústí v omezenou produkci prozánětlivých cytokinů, ale ovlivňuje i buněčnou imunitní odpověď, zejména proliferaci hlavních efektorů buněčné imunity, tedy T-lymfocytů (57).

PD-L1 exprese jako spolehlivý marker má však řadu limitů. Prvním z nich je značná heterogenita v expresi PD-L1 jednak mezi jednotlivými vzorky tumoru a také mezi primárním nádorem a vzdálenými metastatickými ložisky. Míra exprese tohoto ligandu se rovněž mění v čase. Může být různá na začátku onemocnění a v jeho pokročilé fázi. Také terapie zasahuje do PD-L1 exprese. To vše ztěžuje hodnocení PD-L1 a jeho následné využití jako prediktivního ukazatele. Hodnocení PD-L1 exprese bývá také závislé na typu použité protilátky, na základě jejíž vazby se vzorek zbarví. Všechny tyto omezující faktory navíc podtrhuje skutečnost, že efekt imunoterapie byl prokázán u pacientů s různou mírou exprese ligandu, dokonce i u pacientů hodnocených jako PD-L1 negativní (58).

U PD-L1 pozitivních pacientů s předlčeným renálním karcinomem byla lepší odpověď na léčbu. Medián doby do progresu onemocnění byl 4,9 měsíců ve skupině PD-L1 pozitivních ($PD-L1 \geq 5\%$) versus 2,9 měsíců u PD-L1 negativních pacientů ($PD-L1 < 5\%$). Celková odpověď na léčbu (ORR) byla 31 % v PD-L1 pozitivní skupině a 18 % v PD-L1 negativní skupině. Pokud by byla hranice PD-L1 positivity posunuta na cutoff $\geq 1\%$, pak by nebyl statisticky signifikantní rozdíl v ORR, OS (overall survival) ani v PFS mezi PD-L1 pozitivní a PD-L1 negativní skupinou (51).

Expresse ligandu PD-L1 může napovídat i o prognóze onemocnění. Ve studii III. fáze CheckMate 214 se vyšší PD-L1 exprese ukázala být negativním prognostickým markerem pro pacienty, kteří byli léčeni v rameni se sunitinibem, ne však pro ty léčené imunoterapií. Z léčby nivolumabem s ipilimumabem profitovaly špatná a střední prognostická skupina pacientů napříč spekterem PD-L1 exprese. Rozdíl v OS a ORR byl vyšší u imunoterapie než u sunitinibu a tento rozdíl se ještě zvýšil u pacientů s PD-L1 pozitivním tumorem (45).

Negativní prognostický význam PD-L1 exprese byl původně připisován jeho imunosupresivní aktivitě. Výzkum ukázal, že v prognóze pacientů s RCC hrají důležitou roli kostimulační molekuly T-lymfocytů. B7-H1 glykoprotein je kostimulačním faktorem, který je aberantně exprimován RCC buňkami a je zapojený v poškození funkce T-lymfocytů a jejich kratším přežívání, čímž narušuje protinádorovou imunitu. B7-H1 negativní pacienti mají nižší riziko progresse nemoci a smrti ve srovnání s B7-H1 pozitivními pacienty (59).

PD-L1 jako prognostický marker funguje i u jiných histologických typů RCC. U nesvětlobuněčných variant je PD-L1 exprese spojena s horším přežitím a celkově ukazuje na agresivnější povahu nádoru. PD-L1 je u nccRCC exprimován v široké škále, u chromofobního karcinomu jej exprimuje asi u 5 % nádorů, 10 % u papilárního karcinomu a 20 % u karcinomu ze sběrných kanálek. Expresse PD-L1 u nádorových buněk, stejně jako jeho exprese u tumor infiltrujících buněk je spojena s kratší dobou rekurence nemoci (60).

Nádorová mutační nálož (TMB, tumor mutational burden) je považována za další prediktivní biomarker odpovědi na ICI. Pouze malá část somatických mutací v nádorové DNA se promítá na povrch buněk ve formě neoantigenu, který může být rozpoznán imunitním systémem. A ne všechny neopeptidy jsou imunogenní, tedy ani bílkoviny s novým složením nemusí vést k aktivaci imunitních buněk. Avšak obecně platí, že čím více mají nádorové buňky somatických mutací, tím vyšší je počet vystavených neoantigenů a zároveň je vyšší pravděpodobnost jejich zachycení imunitním systémem. TMB tak může být považována za jakýsi prediktor stupně nádorové neoantigenicity (61-63). RCC nepatří mezi nádory s vysokou mutační náloží, na rozdíl od maligního melanomu nebo nemalobuněčného karcinomu plic. Navzdory nízkému

TMB, je renální karcinom charakteristický vysokým podílem indelů, tedy polymorfismů vznikajících na základě inzercí, delecí, tranzicí či transverzí. Indely jsou hlavním mechanismem produkce neoantigenů, které jsou kruciální pro cílenou T-buněčnou odpověď. Míra indelů se tak ukázala být asociována s OS léčených anti-PD-1 protilátkou (64).

Rovněž infiltrace nádoru buňkami imunitního systému (TIIC, tumor-infiltrating immune cells) u karcinomu ledviny, tak jako u jiných malignit, je spojena jak s prognózou pacienta, tak s predikcí odpovědi na léčbu imunoterapií. Již dlouho před objevením monoklonálních protilátek cílících na checkpointy imunitního cyklu se vědělo, že solidní tumory jsou infiltrovány T-lymfocyty (TIL, tumor infiltrating lymphocytes). Ty mohou být přítomny jednak v nádorovém stromatu anebo přímo mezi nádorovými buňkami. I přesto, že jejich prognostický a často i prediktivní význam je jasný, TIL se jako prediktivní marker imunitní odpovědi zatím nezapsaly do běžné klinické praxe zejména vlivem nedostatku standardizovaných postupů jejich hodnocení.

TIIC vytvářejí nádorové prostředí a tento ekosystém reguluje progresi nemoci. Tumor infiltrující lymfocyty jsou nejvíce studovanou kohortou imunitních buněk nádorového mikroprostředí. Cytotoxické CD8⁺ T-lymfocyty a CD4⁺ helpery umí nalézt a ovlivnit antigenní nádorové buňky a zabránit tak růstu nádoru. Infiltrující CD4⁺ T-lymfocyty regulují proliferaci RCC buněk pomocí modulace TGFβ1 (transforming growth factor beta 1)/HIF2-α signálních drah. Vysoký počet CD8⁺ T-lymfocytů je spojen s lepší prognózou pacientů nejen u RCC, ale i u jiných malignit (65). Avšak nádorové mikroprostředí může rovněž tlumit účinek T-lymfocytů, což způsobuje ztrátu nádorové imunogenicity. Například cytokiny regulačních T-lymfocytů (Tregs, T regulatory cells) narušují správnou funkci cytotoxických T-lymfocytů a tím brání jejich základní funkci. Mezi TIIC však patří celá řada dalších vysoce významných buněk zahrnujících makrofágy, dendritické buňky, monocyty atd. Právě jednotlivé subtypy lymfocytů ale i ostatních TIIC aspirují na to, stát se důležitými prognostickými či prediktivními biomarkery. Ovlivnění tumor infiltrujících buněk či nádorového mikroprostředí se zdá být velkou nadějí pro zlepšení léčebných strategií.

Léky cílené na klíčové body imunitního cyklu jako je nivolumab, ipilimumab, pembrolizumab, avelumab a další znamenaly průlom v léčbě mRCC. Kompozici TIIC je

možné zjistit pomocí průtokové cytometrie a také imunohistochemickými metodami a dále pomocí fluorescenčních barviv určit konkrétní subtypy buněk (66). Nicméně stejně tak jako složení TIIC je důležitá rovněž interakce a koordinace mezi jednotlivými buňkami.

Prognostickou hodnotu tumor infiltrujících buněk hodnotil Zhang et al. ve své studii. U pacientů s ccRCC byl vyšší počet CD4+ T-lymfocytů a dendritických buněk spojen s lepším přežitím, zatímco T regulační lymfocyty indikovaly horší přežití pacientů (67).

Celkově vyšší infiltrace nádoru imunitními buňkami u RCC byla spojena s vyšší pravděpodobností PFS delším jak 6 měsíců, na rozdíl od pacientů léčených TKI, u kterých nebyl tento vztah prokázán. Zejména infiltrace makrofágy byla u pro pacientů léčených anti-PD-1 terapií pozitivním prediktivním ukazatelem spojeným s lepším PFS (68).

1.4 Neopterin

1.4.1 Neopterin jako biomarker

Neopterin (1', 2', 3'-D-erythro-trihydroxypropylpterin) patří do rodiny pteridinů a je účasten řady oxidačně-redukčních reakcí v organismu. Je to derivát guanosine trifosfátu (GTP, guanosin trifosfát). Reakce, při níž neopterin vzniká, je katalyzována enzymem GTP-cyklohydrolázou i v aktivovaných monocytech, makrofázích, dedritických buňkách a endoteliálních buňkách pod vlivem stimulace IFN- γ . Jeho zvýšená produkce makrofágy bývá odpovědí na zvýšenou produkci cytokinů T-lymfocyty a natural killer buňkami (NK). Tento fakt dělá z neopterinu indikátor aktivity buňkami zprostředkované imunitní reakce, která je asociována s prozánětlivým stavem. Naměřená hladina neopterinu tak reflektuje imunitní aktivaci a cytokinovou bouři během zánětlivých, infekčních a nádorových onemocnění (69).

Vysoká hladina neopterinu byla původně zaznamenána v moči pacientů s nádorovým onemocněním a pacientů s virovou infekcí Wachterem et al. v roce 1979. Následující výzkumy ukázaly, že jeho zvýšená hladina je přítomna u řady různých stavů spojených s aktivací imunitního systému (70). Hladina neopterinu v séru silně koreluje s hladinou neopterinu v moči, což nazýváme neopterin/kreatinin ratio.

Mezi infekčními onemocněními byl neopterin extenzivně studován zejména u pacientů infikovaných virem lidské imunodeficiency 1 (HIV-1, human immunodeficiency virus 1). Zvýšená hladina bývá zejména na začátku infekce a negativně koreluje s počtem CD4⁺ T-lymfocytů a vypovídá o prognóze onemocnění. Rovněž u pacientů s virovou hepatitidou lze zaznamenat vyšší hladinu neopterinu v krvi. Koncentrace neopterinu v séru je rovněž studována u pacientů s aterosklerózou. Akutní infarkt myokardu je dalším stavem, kdy vzrůstá hladina neopterinu v séru a moči (71). Podobně jako u HIV-1 infekce, i u akutních koronárních příhod je neopterin negativním prognostickým markerem. Jak by se dalo předpokládat, vysokou hladinu neopterinu lze měřit i u řady autoimunitních onemocnění jako je revmatoidní artritida, systémový lupus erythematoses nebo Crohnova choroba (72).

Dnes se neopterin skloňuje také v kontextu pandemie viru SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome-related coronavirus). Kriticky nemocní pacienti s COVID-19 infekcí byli charakterizováni eskalovanou imunitní aktivací spojenou s elevací hladiny sérového neopterinu. Nad určitou hodnotu neopterinu v krvi (53 nanomolů, nM) bylo možné pacienty rozlišit na ty, kteří přežijí infekci COVID-19 a na ty, kteří ji podlehnou s 64 % specificitou a 100 % senzitivitou (73). Tento fakt dává podklad pro teoretické úvahy možnosti sledování autoimunitní aktivity jako nežádoucího účinku u pacientů léčených checkpoint inhibitory, zatím však nemáme dostatek dat, které by tyto předpoklady potvrdily.

K opakovanému vyšetření hladin neopterinu lze s výhodou používat vzorek moči. Například u potransplantačních rejekcí lze zaznamenávat zvýšené hladiny neopterinu v čase (74).

1.4.2 Neopterin jako prognostický biomarker u pacientů s nádorovým onemocněním

Hladina neopterinu byla vyšetřována, po objevu jeho vyšší koncentrace u pacientů s nádorovým onemocněním, u řady maligních onemocnění (gynekologických nádorů, tumoru prsu, gastrointestinálních nádorů i hematologických malignit). Vyšší hladina byla pozorována i u pacientů s urologickými nádory, zejména u pokročilých stádií nemoci, koncentrace odpovídala nejen vyššímu stádiu ale i gradingu nemoci. U karcinomu prostaty byla vyšší koncentrace spojena s vyšší mírou rekurence nádoru (75-77).

Hladina sérového nebo močového neopterinu byla měřena a zkoumána u nádorů většiny lokalizací. Zvýšený neopterin byl asociován i s jinými biomarkery odpovědi na maligní onemocnění. Rovněž koreloval se zvýšenými hladinami ostatních zánětlivých parametrů jako je C-reaktivní protein (CRP) nebo snížená hladina albuminu. U řady nádorových onemocnění byl zaznamenán negativní vztah mezi hladinou neopterinu a hodnotou hemoglobinu (78). To značí, že systémová imunitní odpověď je spojena s alterací metabolismu železa s následným vznikem anémie chronických chorob.

Koncentrace neopterinu také koreluje s fenotypem a funkcí lymfocytů v periferní krvi. U pacientů s metastatickým hepatocelulárním karcinomem je hladina neopterinu v moči spojena s inverzním počtem CD4⁺ T-lymfocytů (79). Tento fakt, který byl pozorován už u pacientů s HIV-1 infekcí, jen potvrzuje hypotézu, že zvýšená hladina neopterinu je spojena s chronickou imunitní stimulací, která vyčerpává imunitní systém a vede k poruchám jeho fungování (80).

Většina studií měřila množství neopterinu v séru a moči, neopterin je však přítomen i v jiných tělních tekutinách. U pacientů s nádory jej můžeme nalézt a měřit také v ascitu, pleurálním výpotku a likvoru. Například u pacientů s gastrointestinálními nádory či gynekologickými malignitami, kde je nutnost opakované paracentézy k symptomatické úlevě, může být hladina neopterinu stanovována opakovaně s jistou mírou komfortu bez nutnosti opakovaných venepunkcí.

S rostoucím množstvím různých terapeutických skupin roste rovněž potřeba monitorace, zda je zvolená terapie u daného pacienta opravdu účinná. Neopterin jakožto indikátor imunitní odpovědi by mohl sloužit jako biomarker k monitoraci efektu protinádorové léčby. Zvýšení jeho hladiny bylo zaznamenáno u řady cytokinů, např. po podání interferonu- γ , interferonu- α , faktoru stimulujícího kolonie granulocytů (G-CSF, granulocyte colony stimulating factor), ale také po podání chemoterapie či aplikaci radioterapie. Avšak data, která by vypovídala o vlivu checkpoint inhibitorů na hladinu neopterinu v séru či v moči, stále chybí (54, 81).

2. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Éra imunoterapie zásadně změnila management léčby metastatického karcinomu ledviny. Pacienti jsou nyní imunoterapií léčeni nejen v první linii léčby, ale také v dalších liniích. Zvolení správného léčebného přístupu vyžaduje indentifikaci prediktivních a prognostických parametrů, které by bylo možné získat v běžné klinické praxi.

Cílem naší práce bylo nalézt prediktivní a prognostické markery u pacientů s mRCC léčených imunoterapií, které by mohly poukázat na vhodnost jednotlivých pacientů právě k této modalitě léčby. Zejména u diagnózy metastatického renálního karcinomu je selekce nemocných více než důležitá, neboť máme k dispozici řadu lékových skupin pro terapii tohoto onemocnění. V retrospektivní studii jsme hodnotili asociaci mezi biomarkery imunitní aktivace získanými z periferní krve a moči u nemocných léčených na našem pracovišti pro mRCC v letech 2016-2022 a výsledky pacientů léčených checkpoint inhibitory.

3. SOUBOR NEMOCNÝCH A METODY

3.1 Pacienti

Laboratorní a klinická data byla získána od 79 pacientů s histologicky potvrzenou diagnózou metastatického karcinomu ledviny. Z těchto pacientů bylo 59 mužů a 20 žen. Všichni byli léčeni imunoterapií, konkrétně se jednalo o checkpoint inhibitory (anti-PD 1 protilátku nivolumab, případně kombinaci nivolumab a anti-CTLA-4 protilátky ipilimumab). Data byla hodnocena retrospektivně. V souboru byly zastoupeny různé histologické typy renálního karcinomu, ačkoli převažoval konvenční světlobuněčný karcinom u 75 pacientů, papilární karcinom byl nalezen u 2 pacientů, karcinom ze sběrných kanálků u 1 pacienta a 1 pacient měl nespecifikovaný typ renálního karcinomu. Pacienti byli léčeni imunoterapií v různých liniích, 33 pacientů bylo léčeno v první linii léčby, 26 pacientů bylo léčeno imunoterapií ve druhé linii léčby, 10 pacientů ve třetí linii léčby a 10 pacientů bylo léčeno ve čtvrté a pozdější linii. Pacienti byli léčeni jednak nivolumabem v monoterapii ve schématu 3mg/kg nebo 240mg flat dose á 2 týdny nebo 480 mg flat dose á 4 týdny, monoterapií bylo léčeno 50 pacientů. Kombinací nivolumab (3 mg/kg nebo 240 mg flat dose) a ipilimumab (1mg/kg) každé 3 týdny do počtu 4 cyklů následovaných podáním nivolumabu (3 mg/kg nebo 240 mg flat dose každé 2 týdny, nebo 480 mg flat dose každé 4 týdny) bylo léčeno 29 pacientů. Léčebná odpověď byla hodnocena standardními radiologickými metodami v přibližně 12 týdenních intervalech. Léčba byla podávána do progrese onemocnění (progrese onemocnění byla vždy potvrzena konfirmační radiologickou metodou v odstupu 6-8 týdnů od nepotvrzené progrese) nebo do nepřijatelné toxicity. Interval bez progrese (PFS, Progression-free survival) byl definován nepřítomností progrese či úmrtí z jakékoli příčiny. Skórovací systémy IMDC (International Metastatic RCC Database Consortium) a MSKCC (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center) a CCI (Charleson Comorbidity Index) byly využity k předléčebnému zařazení pacientů do jednotlivých prognostických skupin, jednotlivé parametry pacientů byly z předléčebného období. Celá analýza byla součástí projektu, který byl schválen lokální etickou komisí a pacienti před zařazením do souboru podepsali informovaný souhlas se zařazením, měli dostatek času si souhlas přečíst a klást otázky, na které jim bylo odpovězeno.

Tabulka 3. Klinická data pacientů celého souboru

	N*	%
<i>Věkový průměr (roky)</i>	64,4	
<i>Pohlaví</i>		
Muži	59	74,7
Ženy	20	25,3
<i>Histologická varianta</i>		
Světlobuněčný karcinom	75	94,9
Papilární karcinom	2	2,5
Tumor ze sběrných duktů	1	1,3
Karcinom NS	1	1,3
<i>Sarkomatoidní varianta</i>		
Ano	5	6,3
Ne	74	93,7
<i>ECOG*</i>		
ECOG 0	17	21,5
ECOG 1	58	73,4
ECOG 2	4	5,1
<i>Metastázy v době diagnózy</i>		
Ano	41	51,9
Ne	38	48,1
<i>Nefrektomie</i>		
Ano	60	75,9
Ne	19	24,1
<i>Toxicita</i>		
Ano	24	30,4
Ne	55	69,6
<i>Potřeba kortikoidů při terapii nežádoucích účinků</i>		
Ano	20	25,3
Ne	59	74,7
<i>Imunoterapeutický režim</i>		
Nivolumab v monoterapii	50	63,3
Nivolumab + Ipilimumab	29	36,7
<i>Stav v dispenzarizaci</i>		
Zemřeli	40	50,6
Živí	39	49,4

* Eastern Cooperative Oncology Group performance status

3.2 Laboratorní metodika a statistická analýza

Vzorky periferní krve byly okamžitě po odběru transportovány do laboratoře, centrifugovány (1600 g po dobu 8 min při teplotě 16°C). Sérum bylo separováno a okamžitě analyzováno nebo zmrazeno na teplotu -20°C do doby provedení samotné analýzy. C-reaktivní protein, kreatinin, laktátdehydrogenáza (LDH) a albumin byly vyhodnoceny pomocí komerčně dostupných kitů v analyzátoru Cobas c 8000 systému (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) dle návodu výrobce. Od 1. 3.2021 bylo CRP, LDH, albumin a kreatinin stanovovány pomocí analyzátoru Atellica® Solution (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., USA). Sérový neopterin byl měřen Neopterin ELISA Kitem (IBL International, Hamburg, Germany) pomocí automatického mikrodestičkového procesoru pro enzymatickou immunoassay EVOLIS (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Měření bylo provedeno v ISO 15189- akreditované laboratoři.

Časně ráno odebrané vzorky moči byly sbírány a skladovány v -20°C do doby provedení analýzy. Močový neopterin byl stanoven s použitím HPLC metody, která byla zmíněna výše. Krátce po centrifugaci (5min, 1300g) a naředění 100 µl moči spolu s 1.0 ml mobilní fáze obsahující disodium EDTA (2 g/l) byly vzorky filtrovány pomocí Microtiteru, AcroPrep 96 Filter Plate 0.2 µm/350 µl (Pall Life Science, Ann Arbor, MI, USA) a Vacuum manifold (Pall Life Science) a injektovány do sloupců. Neopterin byl stanoven pomocí Prominence LC20HPLC systému (Shimadzu, Kyoto, Japan) složeného z nosičového měniče/C-special autosampler pro microtitraci destiček, digestoře DGU-20A5, dvou tekutinových chromatografů LC-20 AB pump, autosampleru SIL-20 AC, termostatu CTO-20AC, fluorescenčního detektoru RF-10 AXL, diodového paprskového detektoru SPD-M20A a komunikačního modulu CBM-20A. Jako mobilní fáze byl použit fosfátový pufr, 15 mmol/l, pH 6,4, s rychlostí toku 0,8 ml/min. Separace byla provedena pomocí hybridního analytického sloupce, Gemini Twin 5µ, C18, 150 × 3 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA), v 25°C, injektovaný objem byl 1 µL.

Neopterin byl detekován pomocí nativní fluorescence (353 nm excitační vlnové délky, 438 nm emisní vlnové délky). Kreatinin byl monitorován souběžně ze stejných vzorků moči za pomoci diodového paprskového detektoru ve vlnové délce 235 nm. Analýza močového neopterinu a kreatininu trvala 6 minut a analyty byly kvantifikovány

pomocí standardizované externí kalibrace. Výsledky byly interpretovány jako poměr neopterin/kreatinin (neopterin to creatinine ratio), $\mu\text{mol/mol}$ kreatinin.

Periferní krevní obraz byl detekován pomocí Sysmex XN series (XN-3100, XN-1000) hematologického analyzátoru (Sysmex, Kobe, Japan) podle návodu výrobce. Erytrocyty a trombocyty byly detekovány na základě impedanční metody používající hydrodynamické zaměrování. Hemoglobin byl měřen fotometrickou metodou za použití sodiumlaurylsulfátu bez kyanidu. Počet leukocytů, včetně diferenciálního rozpočtu byl stanoven pomocí fluorescenční cytometrie.

Rozdíly mezi pacienty a kontrolní skupinou byly analyzovány pomocí Mann-Whitney U testu. Korelace byly stanoveny za použití Spearmanova korelačního koeficientu. Za statisticky signifikatní byly považovány výsledky s $p=0.05$. Analýza byla provedena za pomoci NCSS softwaru (Number Cruncher Statistical Systems, Kaysville, UT, USA).

4. VÝSLEDKY

Korelace mezi klinickými a biochemickými parametry se zánětlivými biomarkery ukazuje tabulka 4. Hladina CRP v séru, jakožto rutinně stanovovaného zánětlivého biomarkeru velmi významně korelovala s prognostickým skóre IMDC, stejně tak jako s druhým z nejvíce používaných skórovacích systému u mRCC MSKCC. Korelace byla nalezena také mezi hladinou sérového neopterinu a oběma prognostickými indexy, dále mezi močovým kreatininem a IMDC i MSKCC. Daleko více patrný byl vztah mezi poměrem sérového neopterinu a kreatininu (serum neopterin/creatinine ratio). Korelace mezi hodnotou albuminu a prognostickými systémy IMDC a MSKCC se ukázala být statisticky signifikantní. Hodnota CRP významně korelovala i s koncentrací hemoglobinu, dále s počtem krevních destiček v periferní krvi, RDW (red blood cell distribution width) a PLR (platelet lymphocyte ratio). Obdobně korelovaly další biomarkery jako hladina albuminu s koncentrací hemoglobinu, počtem krevních destiček, RDW a PLR. Poměr sérového neopterinu/kreatininu s hladinou hemoglobinu, s počtem krevních destiček, RDW, PLR a poměr močového neopterinu/kreatininu s hladinou hemoglobinu, s počtem krevních destiček, RDW a PLR.

Všichni pacienti byli sledováni minimálně po dobu 4 měsíců. V této době 33 pacientů zemřelo nebo u nich byla zaznamenána progresse nemoci, 46 pacientů bylo bez progresse choroby. Pacienti, u kterých byla zaznamenána progresse nebo zemřeli do 4 měsíců od zahájení sledování, měli vyšší MSKCC skóre. U těchto pacientů byla zaznamenána i výrazně vyšší hladina prozánětlivého markeru CRP a vyšší hladina sérového kreatininu. Jak by se dalo předpokládat rovněž hladiny neopterinu v séru i močového neopterinu byly naměřeny vyšší u pacientů, kteří měli ve 4 měsících progresi. Pacienti s progresí měli nižší hladinu albuminu v séru a také nižší koncentraci hemoglobinu. Charlson Comorbidity Index měl nižší skóre u pacientů s progresí nemoci ve 4 měsících sledování než u pacientů, kteří nezprogredovali. Nejvíce patrný byl rozdíl mezi hodnotami poměru sérového neopterinu a kreatininu (serum neopterin/creatinine ratio) u pacientů s progresí oproti hodnotám pacientů bez progresse (tabulka 5).

V době 6 měsíčního sledování byla zaznamenána progresse nebo úmrtí u 42 pacientů a 36 pacientů nezprogredovalo. Pacienti, kteří zprogredovali, měli vyšší

hladinu CRP i poměr sérového neopterinu/kreatinu, stejně tak jako měli vyšší poměr močového neopterinu/kreatininu. Naopak u této skupiny pacientů byla statisticky významná nižší hladina albuminu i koncentrace hemoglobinu. Pouze rozdíl v MSKCC skóre nedosáhl statistické významnosti (tabulka 6).

Po 8 měsících od zahájení léčby přežívalo bez progresy 31 pacientů a 45 pacientů zemřelo nebo u nich byla zaznamenána progresy choroby. Rozdíl mezi progredující a neprogredující skupinou byl pozorován v MSKCC indexu, stejně tak jako u biochemických ukazatelů. Sérové CRP bylo vyšší u pacientů s progresí choroby. Sérový neopterin, poměr neopterin/kreatinin a močový neopterin/kreatinin měly vyšší hodnoty u progredujících pacientů. Hodnota sérového albuminu byla nižší u pacientů s progresí, stejně tak koncentrace sérového hemoglobinu (tabulka 7).

Z našeho souboru v době 12 měsíčního sledování přežívalo 25 pacientů, zprogredovalo nebo zemřelo 49 pacientů. Pacienti s progresí měli vyšší MSKCC skóre než pacienti bez progresy. Opět byl pozorován trend vyšší hladiny CRP, poměru sérový neopterin/kreatinin i poměru močový neopterin/kreatinin u progredujících pacientů. Sérový albumin a koncentrace hemoglobinu byla nižší u pacientů s progresí (tabulka 8).

Po 4 měsících od zahájení terapie zemřelo 7 pacientů a přežívalo 72. U pacientů, kteří přežili byl patrný rozdíl v hladině sérového albuminu. Rovněž hodnota poměru sérového neopterinu/kreatininu byla rozdílná mezi přeživšími a zemřelými pacienty, u přeživších byla tato hodnota signifikantně nižší. I hodnota poměru močového neopterinu/kreatininu byla nižší u pacientů, kteří přežili, avšak nedosáhla statistické významnosti. Významně vyšší hodnoty neutrofilů byly prokázány u pacientů, kteří 4 měsíční sledování nepřežili, i hodnoty monocytů byly u těchto pacientů vyšší. Přeživší měli nižší skóre indexů MSKCC a IMDC, ale u těchto parametrů nebylo dosaženo statistické významnosti (tabulka 9).

V době 6 měsíčního pozorování zemřelo 17 pacientů a 61 zůstávalo naživu. Pacienti, kteří zemřeli do doby 6 měsíčního follow up, měli signifikantně vyšší skóre IMDC a MSKCC. U pacientů, kteří 6 měsíční follow up nepřežili, byl vyšší ECOG performance status. Stejně tak měla tato skupina pacientů vyšší hodnoty biochemických ukazatelů, a to hodnotu sérového CRP, hladinu sérového neopterinu a hladinu močového

neopterinu. V periferní krvi byl naměřen vyšší počet leukocytů u nepřeživších pacientů. Rozdíl byl i v hodnotách monocytů, neutrofilů a trombocytů v periferní krvi, vyšší hodnoty byly u pacientů, kteří nepřežili. Rovněž u nich byly zaznamenány vyšší hodnoty RDW a PLR. I zde byl nejvíce patrný rozdíl u poměru sérového neopterinu a kreatininu (tabulka 10).

Dobu 8 měsíců od zahájení léčby přežilo 54 pacientů a zemřelo 20 pacientů. Pacienti, kteří přežili, měli nižší hodnoty prognostických skórovacích systémů IMDC, MSKCC i hodnotu ECOG performance status. Výrazný rozdíl byl zjištěn v hodnotách biochemických parametrů, přeživší pacienti měli nižší CRP, nižší hodnotu poměru neopterin/kreatinin i poměru močový neopterin/kreatinin. Hladiny sérového albuminu a hemoglobinu byly naopak u pacientů, kteří přežili, vyšší než u pacientů, kteří zemřeli. Hodnoty leukocytů, monocytů a neutrofilů stejně jako počet krevních destiček v periferní krvi byly vyšší u pacientů, kteří nepřežili (tabulka 11).

V době 12 měsíců bylo naživu 45 pacientů a zemřelo jich 29. Tak jako u předchozích analýz měli přeživší pacienti nižší hodnoty IMDC a MSKCC skóre, avšak ty v tomto čase nedosáhly statistické významnosti. Významný byl rozdíl mezi hodnotami CRP, vyšší byly nalezeny u pacientů, kteří zemřeli. Opět byl nejvíce patrný rozdíl u poměru sérového neopterinu/kreatininu, vyšší hodnoty měli pacienti, kteří 12 měsíční sledování nepřežili. Hodnoty poměru močového neopterinu/kreatininu byly take vyšší u této skupiny pacientů, ale nedosáhly statistické významnosti. Sérový albumin i koncentrace hemoglobinu měly stejný trend jako v předchozích analýzách, byly měřeny vyšší hodnoty u přeživších, ale nedosáhly statistické významnosti. Počet krevních destiček, stejně jako hodnoty neutrofilů a monocytů v periferní krvi byly vyšší u pacientů, kteří zemřeli (tabulka 12).

Tabulka 3. Korelace mezi klinickými a biochemickými parametry se zánětlivými biomarkery. Korelační koeficient (Spearman) a p-value (v závorce).

	Serum CRP	Serum albumin	Serum neopterin	Serum neopterin/creatinine ratio	Urinary neopterin/creatinine ratio
age	-0.070 (0.538)	-0.038 (0.736)	0.367 (0.001)	0.107 (0.348)	0.097 (0.409)
Interval from primary diagnosis	-0.258 (0.022)	-0.061 (0.593)	-0.075 (0.512)	-0.245 (0.030)	-0.372 (0.001)
IMDC score	0.490 (0.000005)	-0.327 (0.003)	0.253 (0.025)	0.394 (0.000322)	0.335 (0.003)
MSKCC score	0.466 (0.000015)	-0.418 (0.0001)	0.277 (0.013)	0.413 (0.000153)	0.384 (0.001)
ECOG performance status	0.183 (0.107)	-0.298 (0.008)	0.317 (0.004)	0.340 (0.002)	0.109 (0.352)
Number of metastatic sites	0.261 (0.020)	-0.208 (0.066)	0.119 (0.296)	0.188 (0.096)	0.034 (0.775)
Corrected serum calcium	0.223 (0.048)	-0.086 (0.449)	0.057 (0.620)	0.204 (0.071)	0.094 (0.423)
Serum creatinine	-0.292 (0.009)	0.204 (0.072)	0.309 (0.006)	-0.330 (0.003)	-0.136 (0.246)
Serum LDH	-0.012 (0.917)	0.094 (0.426)	-0.137 (0.246)	-0.107 (0.366)	0.023 (0.850)
Serum CRP	1.000 (0.000)	-0.603 (0.000)	0.399 (0.000266)	0.619 (0.000)	0.400 (0.000374)
Serum albumin	-0.603 (0.000)	1.000 (0.000)	-0.467 (0.000014)	-0.613 (0.000)	-0.402 (0.000346)
Serum neopterin	0.399 (0.000266)	-0.467 (0.000014)	1.000 (0.000)	0.745 (0.000)	0.631 (0.000)
Serum neopterin/creatinine ratio	0.619 (0.000)	-0.613 (0.000)	0.745 (0.000)	1.000 (0.000)	0.718 (0.000)
Urinary neopterin/creatinine ratio	0.400 (0.000374)	-0.402 (0.000346)	0.631 (0.000)	0.718 (0.000)	1.000 (0.000)
Leukocyte count	0.068 (0.550)	0.161 (0.157)	0.040 (0.728)	0.145 (0.203)	0.010 (0.930)
Hemoglobin concentration	-0.498 (0.000003)	0.621 (0.000)	-0.432 (0.000069)	-0.543 (0.000)	-0.535 (0.000001)
Platelet count	0.540 (0.000)	-0.369 (0.001)	0.224 (0.048)	0.463 (0.000017)	0.385 (0.001)
MCV	-0.343 (0.002)	0.067 (0.555)	-0.102 (0.369)	-0.240 (0.033)	-0.122 (0.298)
RDW	0.484 (0.000006)	-0.503 (0.000002)	0.491 (0.000004)	0.527 (0.000001)	0.365 (0.001)
MPV	-0.465 (0.000016)	0.283 (0.012)	-0.021 (0.857)	-0.348 (0.002)	-0.310 (0.007)

	Serum CRP	Serum albumin	Serum neopterin	Serum neopterin/creatinine ratio	Urinary neopterin/creatinine ratio
Lymphocyte count	-0.192 (0.089)	0.171 (0.132)	-0.113 (0.321)	0.005 (0.964)	-0.062 (0.597)
Monocyte count	0.262 (0.020)	-0.130 (0.254)	0.164 (0.150)	0.363 (0.001)	0.125 (0.286)
Neutrophil count	0.210 (0.064)	0.077 (0.497)	0.100 (0.383)	0.202 (0.074)	0.096 (0.413)
NLR	0.286 (0.011)	-0.075 (0.514)	0.158 (0.163)	0.121 (0.290)	0.115 (0.328)
PLR	0.480 (0.000008)	-0.412 (0.000162)	0.287 (0.010)	0.322 (0.004)	0.308 (0.007)
LMR	-0.370 (0.000793)	0.262 (0.020)	-0.228 (0.044)	-0.247 (0.028)	-0.178 (0.127)
CCI	-0.069 (0.550)	-0.013 (0.913)	0.191 (0.094)	0.038 (0.742)	-0.015 (0.902)

Tabulka 4 – pokr. Korelace mezi klinickými a biochemickými parametry se zánětlivými biomarkery. Korelační koeficient (Spearman) a p-value (v závorce).

Tabulka 5. Srovnání předléčebných hodnot jednotlivých parametrů u pacientů bez progresse a s progresí po 4 měsících od zahájení imunoterapie.

Parameter	no progression	progressed	p
n	46	33	
Age (years)	67±8	67±9	0.897
Interval from primary diagnosis (months)	78±90	52±71	0.220
Interval from diagnosis of metastatic disease (months)	36±37	31±44	0.561
IMDC score	1.6±1.2	2.1±1.3	0.075
MSKCC score	1.3±1.0	1.8±0.9	0.022
ECOG performance status	0.8±0.5	0.9±0.5	0.254
Number of metastatic sites	2.0±1.0	2.2±1.0	0.420
Corrected serum calcium (mmol/L)	2.47±0.36	2.42±0.24	0.850
Serum creatinine (μmol/L)	128±79	123±91	0.249
Serum LDH (μcat/L)	3.23±0.76	3.76±1.71	0.418
Serum CRP (mg/L)	19.1±20.7	64.8±79.1	0.010
Serum albumin (g/L)	42.5±3.3	38.5±6.8	0.022
Serum neopterin (μg/L)	4.6±4.0	6.5±4.8	0.019
Serum neopterin/creatinine ratio (μg/μmol)	36±15	58±33	0.0002
Urinary neopterin/creatinine ratio (mmol/mol)	243±140	369±263	0.023
Leukocyte count (10 ⁹ /L)	8.2±2.6	9.5±6.1	0.418
Hemoglobin concentration (g/L)	128±19	116±19	0.012
Platelet count (10 ⁹ /L)	293±113	334±158	0.152
MCV (fL)	89.9±8.3	91.1±9.8	0.623
RDW (%)	15.5±3.0	15.8±2.6	0.421
MPV (fL)	10.6±1.3	10.2±1.1	0.070
Lymphocyte count (10 ⁹ /L)	1.73±0.78	2.66±5.70	0.921
Monocyte count (10 ⁹ /L)	0.77±0.30	0.88±0.32	0.188
Neutrophil count (10 ⁹ /L)	5.38±2.11	5.68±1.89	0.456
NLR	3.59±1.83	4.26±3.67	0.651
PLR	197±106	239±159	0.332
LMR	2.43±1.22	2.71±3.61	0.259
CCI	7.9±3.1	6.4±2.9	0.040

Tabulka 6. Srovnání předléčebných hodnot jednotlivých parametrů u pacientů bez progresse a s progresí po 6 měsících od zahájení imunoterapie.

Parameter	no progression	progressed	p
n	36	42	
Age (years)	66±9	67±9	0.722
Interval from primary diagnosis (months)	74±86	63±81	0.564
Interval from diagnosis of metastatic disease (months)	37±39	32±42	0.798
IMDC score	1.6±1.1	2.0±1.3	0.220
MSKCC score	1.2±1.0	1.6±1.0	0.085
ECOG performance status	0.8±0.5	0.9±0.5	0.335
Number of metastatic sites	2.0±1.0	2.2±1.0	0.250
Corrected serum calcium (mmol/L)	2.45±0.39	2.43±0.23	0.304
Serum creatinine (μmol/L)	135±86	120±82	0.070
Serum LDH (μcat/L)	3.31±0.80	3.59±1.58	0.978
Serum CRP (mg/L)	16.3±19.9	56.8±72.3	0.004
Serum albumin (g/L)	42.9±3.4	39.0±6.17	0.005
Serum neopterin (μg/L)	4.5±4.4	6.2±4.4	0.009
Serum neopterin/creatinine ratio (μg/μmol)	33±14	56±30	0.00003
Urinary neopterin/creatinine ratio (mmol/mol)	225±130	356±244	0.004
Leukocyte count (10 ⁹ /L)	8.2±2.6	9.2±5.6	0.700
Hemoglobin concentration (g/L)	129±20	118±19	0.021
Platelet count (10 ⁹ /L)	282±105	335±154	0.068
MCV (fL)	89.9±6.9	91.0±10.4	0.825
RDW (%)	15.8±3.2	15.6±2.5	0.940
MPV (fL)	10.7±1.4	10.2±1.0	0.057
Lymphocyte count (10 ⁹ /L)	1.73±0.73	2.47±5.07	0.928
Monocyte count (10 ⁹ /L)	0.76±0.29	0.87±0.32	0.198
Neutrophil count (10 ⁹ /L)	5.40±2.20	5.62±1.89	0.578
NLR	3.62±1.94	4.11±3.33	0.648
PLR	190±111	235±147	0.134
LMR	2.51±1.34	2.59±3.22	0.216
CCI	8.1±3.3	6.6±2.8	0.055

Tabulka 7. Srovnání předléčebných hodnot jednotlivých parametrů u pacientů bez progresie a s progresí po 8 měsících od zahájení imunoterapie.

Parameter	no progression	progressed	p
n	31	45	
Age (years)	66±9	67±9	0.812
Interval from primary diagnosis (months)	83±90	60±79	0.249
Interval from diagnosis of metastatic disease (months)	41±40	31±41	0.380
IMDC score	1.5±1.1	2.0±1.3	0.091
MSKCC score	1.2±1.0	1.7±0.9	0.022
ECOG performance status	0.8±0.6	0.9±0.5	0.394
Number of metastatic sites	2.0±1.0	2.2±1.0	0.547
Corrected serum calcium (mmol/L)	2.45±0.41	2.43±0.23	0.425
Serum creatinine (μmol/L)	121±31	131±107	0.185
Serum LDH (μcat/L)	3.41±0.79	3.52±1.55	0.439
Serum CRP (mg/L)	17.5±21.1	53.6±70.8	0.017
Serum albumin (g/L)	43.2±3.4	39.0±6.0	0.004
Serum neopterin (μg/L)	3.9±1.8	6.6±5.4	0.004
Serum neopterin/creatinine ratio (μg/μmol)	33±14	55±30	0.00006
Urinary neopterin/creatinine ratio (mmol/mol)	219±134	352±240	0.003
Leukocyte count (10 ⁹ /L)	8.2±2.6	9.2±5.5	0.783
Hemoglobin concentration (g/L)	131±21	117±18	0.005
Platelet count (10 ⁹ /L)	291±109	329±150	0.219
MCV (fL)	89.8±7.4	91.1±10.0	0.696
RDW (%)	15.4±2.1	15.9±3.3	0.759
MPV (fL)	10.5±0.9	10.4±1.4	0.288
Lymphocyte count (10 ⁹ /L)	1.76±0.68	2.42±4.90	0.634
Monocyte count (10 ⁹ /L)	0.74±0.25	0.87±0.35	0.210
Neutrophil count (10 ⁹ /L)	5.39±2.30	5.60±1.87	0.547
NLR	3.51±1.99	4.13±3.25	0.380
PLR	190±113	235±144	0.131
LMR	2.63±1.40	2.53±3.12	0.063
CCI	7.8±3.4	6.8±2.9	0.277

Tabulka 8. Srovnání předléčebných hodnot jednotlivých parametrů u pacientů bez progresse a s progresí po **12 měsících** od zahájení imunoterapie.

Parameter	no progression	progressed	p
n	25	49	
Age (years)	65±9	67±9	0.454
Interval from primary diagnosis (months)	91±93	57±77	0.095
Interval from diagnosis of metastatic disease (months)	43±40	31±40	0.209
IMDC score	1.4±1.2	2.0±1.3	0.071
MSKCC score	1.1±1.0	1.7±0.9	0.010
ECOG performance status	0.8±0.6	0.9±0.5	0.591
Number of metastatic sites	2.0±1.1	2.1±1.0	0.607
Corrected serum calcium (mmol/L)	2.46±0.46	2.42±0.22	0.404
Serum creatinine (μmol/L)	115±29	132±103	0.685
Serum LDH (μcat/L)	3.33±0.79	3.54±1.48	0.975
Serum CRP (mg/L)	16.3±22.0	51.0±68.5	0.014
Serum albumin (g/L)	43.1±3.6	39.4±5.9	0.021
Serum neopterin (μg/L)	3.8±1.9	6.4±5.2	0.005
Serum neopterin/creatinine ratio (μg/μmol)	34±16	53±29	0.001
Urinary neopterin/creatinine ratio (mmol/mol)	224±147	336±234	0.016
Leukocyte count (10 ⁹ /L)	8.2±2.6	9.0±5.3	0.846
Hemoglobin concentration (g/L)	131±22	118±18	0.014
Platelet count (10 ⁹ /L)	294±116	324±147	0.304
MCV (fL)	90.3±7.6	90.6±9.8	0.950
RDW (%)	15.3±2.0	15.9±3.2	0.797
MPV (fL)	10.4±0.9	10.4±1.3	0.560
Lymphocyte count (10 ⁹ /L)	1.80±0.71	2.34±4.71	0.500
Monocyte count (10 ⁹ /L)	0.73±0.25	0.86±0.34	0.246
Neutrophil count (10 ⁹ /L)	5.30±2.32	5.55±1.81	0.627
NLR	3.38±1.91	4.10±3.14	0.248
PLR	190±119	231±141	0.163
LMR	2.74±1.49	2.50±2.99	0.047
CCI	8.0±3.3	6.7±3.0	0.209

Tabulka 9. Srovnání předléčebných hodnot jednotlivých parametrů u pacientů po 4 měsících od zahájení imunoterapie u pacientů, kteří přežili a u pacientů, kteří nepřežili.

Parameter	no survived	survived	p
n	7	72	
Age (years)	71±10	67±8	0.575
Interval from primary diagnosis (months)	60±95	68±83	0.704
Interval from diagnosis of metastatic disease (months)	35±51	34±39	0.959
IMDC score	2.4±1.5	1.7±1.2	0.270
MSKCC score	2.1±0.9	1.4±1.0	0.061
ECOG performance status	1.0±0.6	0.8±0.5	0.389
Number of metastatic sites	2.0±0.8	2.1±1.0	0.964
Corrected serum calcium (mmol/L)	2.46±0.16	2.44±0.33	0.756
Serum creatinine (μmol/L)	94±32	129±86	0.091
Serum LDH (μcat/L)	3.99±1.92	3.40±1.19	0.656
Serum CRP (mg/L)	78.7±75.8	34.3±54.7	0.094
Serum albumin (g/L)	34.9±7.5	41.4±4.9	0.029
Serum neopterin (μg/L)	6.1±2.5	5.3±4.6	0.091
Serum neopterin/creatinine ratio (μg/μmol)	74±47	43±22	0.023
Urinary neopterin/creatinine ratio (mmol/mol)	451±324	279±190	0.135
Leukocyte count (10 ⁹ /L)	14.5±11.9	8.2±2.5	0.039
Hemoglobin concentration (g/L)	107±20	124±19	0.040
Platelet count (10 ⁹ /L)	398±277	302±112	0.384
MCV (fL)	88.2±10.4	90.6±8.8	0.443
RDW (%)	16.5±2.4	15.6±2.8	0.187
MPV (fL)	10.1±1.0	10.5±1.2	0.262
Lymphocyte count (10 ⁹ /L)	6.05±12.4	1.74±0.77	0.698
Monocyte count (10 ⁹ /L)	1.13±0.31	0.79±0.29	0.011
Neutrophil count (10 ⁹ /L)	7.03±2.07	5.35±1.96	0.050
NLR	7.38±6.99	3.53±1.69	0.127
PLR	347±254	201±108	0.176
LMR	4.20±7.88	2.39±1.15	0.080
CCI	7.9±1.7	7.2±3.2	0.757

Tabulka 10. Srovnání předléčebných hodnot jednotlivých parametrů u pacientů po 6 měsících od zahájení imunoterapie u pacientů, kteří přežili a u pacientů, kteří nepřežili.

Parameter	no survived	survived	p
n	17	61	
Age (years)	68±10	66±8	0.894
Interval from primary diagnosis (months)	42±63	75±87	0.248
Interval from diagnosis of metastatic disease (months)	24±35	37±41	0.273
IMDC score	2.4±1.3	1.6±1.2	0.030
MSKCC score	1.9±0.8	1.3±1.0	0.018
ECOG performance status	1.1±0.4	0.8±0.5	0.036
Number of metastatic sites	2.5±1.0	2.0±1.0	0.065
Corrected serum calcium (mmol/L)	2.42±0.31	2.45±0.31	0.357
Serum creatinine (μmol/L)	106±50	133±90	0.097
Serum LDH (μcat/L)	3.71±1.81	3.39±1.11	0.654
Serum CRP (mg/L)	87.6±90.8	24.4±35.3	0.0006
Serum albumin (g/L)	36.8±6.9	41.9±4.4	0.009
Serum neopterin (μg/L)	7.3±4.6	4.9±4.3	0.014
Serum neopterin/creatinine ratio (μg/μmol)	71±34	39±20	0.00001
Urinary neopterin/creatinine ratio (mmol/mol)	414±310	261±157	0.035
Leukocyte count (10 ⁹ /L)	11.7±7.8	8.0±2.5	0.004
Hemoglobin concentration (g/L)	110±19	126±19	0.006
Platelet count (10 ⁹ /L)	402±178	285±110	0.0008
MCV (fL)	88.5±9.3	91.0±8.8	0.315
RDW (%)	16.9±3.0	15.3±2.7	0.024
MPV (fL)	10.0±0.9	10.6±1.2	0.028
Lymphocyte count (10 ⁹ /L)	3.66±7.89	1.70±0.77	0.498
Monocyte count (10 ⁹ /L)	1.06±0.26	0.75±0.29	0.0003
Neutrophil count (10 ⁹ /L)	6.73±1.78	5.18±1.97	0.003
NLR	5.20±4.79	3.51±1.75	0.183
PLR	285±185	195±108	0.045
LMR	2.96±5.00	2.44±1.18	0.066
CCI	6.5±2.6	7.5±3.2	0.196

Tabulka 11. Srovnání předléčebných hodnot jednotlivých parametrů u pacientů po 8 měsících od zahájení imunoterapie u pacientů, kteří přežili a u pacientů, kteří nepřežili.

Parameter	no survived	survived	p
n	20	54	
Age (years)	68±9	66±9	0.817
Interval from primary diagnosis (months)	41±59	82±90	0.138
Interval from diagnosis of metastatic disease (months)	25±34	40±43	0.201
IMDC score	2.4±1.2	1.6±1.2	0.012
MSKCC score	2.0±0.8	1.3±1.0	0.005
ECOG performance status	1.1±0.4	0.8±0.5	0.025
Number of metastatic sites	2.3±1.0	2.1±1.0	0.398
Corrected serum calcium (mmol/L)	2.40±0.29	2.45±0.33	0.630
Serum creatinine (μmol/L)	115±54	133±95	0.411
Serum LDH (μcat/L)	3.57±1.73	3.45±1.15	0.277
Serum CRP (mg/L)	77.8±86.7	25.2±37.2	0.0008
Serum albumin (g/L)	37.5±6.6	41.7±4.6	0.019
Serum neopterin (μg/L)	7.1±4.3	5.0±4.5	0.005
Serum neopterin/creatinine ratio (μg/μmol)	66±33	39±20	0.00008
Urinary neopterin/creatinine ratio (mmol/mol)	376±303	262±159	0.119
Leukocyte count (10 ⁹ /L)	11.0±7.4	8.0±2.6	0.020
Hemoglobin concentration (g/L)	112±18	127±20	0.007
Platelet count (10 ⁹ /L)	387±171	292±110	0.003
MCV (fL)	89.4±9.9	91.0±8.8	0.450
RDW (%)	16.7±2.9	15.4±2.8	0.043
MPV (fL)	10.1±0.9	10.5±1.3	0.115
Lymphocyte count (10 ⁹ /L)	3.28±7.30	1.75±0.79	0.893
Monocyte count (10 ⁹ /L)	0.98±0.31	0.77±0.30	0.011
Neutrophil count (10 ⁹ /L)	6.56±1.70	5.19±2.06	0.004
NLR	5.21±4.41	3.44±1.79	0.058
PLR	283±171	196±110	0.018
LMR	2.82±4.60	2.46±1.22	0.060
CCI	6.4±2.9	7.6±3.1	0.125

Tabulka 12. Srovnání předléčebných hodnot jednotlivých parametrů u pacientů po 12 měsících od zahájení imunoterapie u pacientů, kteří přežili a u pacientů, kteří nepřežili.

Parameter	no survived	survived	p
n	29	45	
Age (years)	68±10	66±8	0.557
Interval from primary diagnosis (months)	63±80	76±88	0.711
Interval from diagnosis of metastatic disease (months)	33±37	38±43	0.595
IMDC score	2.1±1.2	1.6±1.3	0.099
MSKCC score	1.7±0.8	1.3±1.1	0.068
ECOG performance status	0.9±0.5	0.8±0.5	0.420
Number of metastatic sites	2.2±1.0	2.1±1.0	0.777
Corrected serum calcium (mmol/L)	2.40±0.25	2.46±0.36	0.807
Serum creatinine (μmol/L)	135±96	123±79	0.599
Serum LDH (μcat/L)	3.63±1.46	3.39±1.99	0.925
Serum CRP (mg/L)	61.0±76.5	25.6±40.0	0.002
Serum albumin (g/L)	39.2±6.3	41.5±4.7	0.182
Serum neopterin (μg/L)	6.8±5.0	4.7±4.0	0.018
Serum neopterin/creatinine ratio (μg/μmol)	56±32	40±22	0.019
Urinary neopterin/creatinine ratio (mmol/mol)	324±267	274±168	0.629
Leukocyte count (10 ⁹ /L)	10.1±6.4	8.1±2.7	0.097
Hemoglobin concentration (g/L)	118±20	126±21	0.105
Platelet count (10 ⁹ /L)	351±156	296±116	0.035
MCV (fL)	91.0±10.4	90.3±8.2	0.960
RDW (%)	16.4±2.7	15.4±2.9	0.061
MPV (fL)	10.3±0.9	10.4±1.3	0.634
Lymphocyte count (10 ⁹ /L)	2.73±6.08	1.79±0.85	0.702
Monocyte count (10 ⁹ /L)	0.94±0.31	0.76±0.30	0.011
Neutrophil count (10 ⁹ /L)	6.16±1.95	5.18±2.04	0.047
NLR	4.76±3.87	3.37±1.72	0.080
PLR	254±153	197±117	0.058
LMR	2.57±3.84	2.55±1.27	0.031
CCI	6.7±3.0	7.6±3.2	0.310

5. DISKUZE

Prezentované výsledky ukazují na asociaci mezi hladinou zánětlivých biomarkerů v období před zahájením léčby a léčebnými výsledky u pacientů s mRCC, kteří byli léčeni imunoterapií, a to jak v první linii léčby, kde většina nemocných absolvovala kombináční léčbu nivolumab plus ipilimumab, tak i v dalších liniích, kde převažovalo podání monoterapie nivolumabem ve standardním dávkování. Jak by se dalo předpokládat, byla pozorována korelace mezi zánětlivými parametry spolu s imunitní aktivací a parametry periferní krve, zejména koncentrací hemoglobinu a hladinou krevních destiček.

Byl již popsán prediktivní a rovněž prognostický význam mezi zvýšeným počtem lymfocytů na začátku léčby imunoterapií a odpovědí na tuto modalitu léčby. Signifikantní prognostický význam byl popsán i u hladiny CRP, jednoho z rutinně stanovovaných zánětlivých parametrů. Stejně tak lze pozorovat korelaci mezi hladinou albuminu a neopterinu a prognózou pacienta (82-85). Švédská analýza vyhodnotila hladinu albuminu jako samostatný prognostický factor u pacientů léčených cílenou terapií. Zvýšený počet krevních destiček byl také spojen s kratším přežíváním nemocných (86). Velice zajímavá je rovněž korelace mezi zvýšenou hladinou neopterinu a CRP a sníženou hladinou albumin u pacientů, kteří zprogredovali nebo zemřeli (87).

Běžně užívané prognostické modely (MSKCC, IMDC) ke stanovení prognózy pacienta s metastatickým renálním karcinomem byly definovány již v době cytokinové terapie a tyrozinkinázových inhibitorů. Stále jsou však nejčastěji užívanými skórovacími systémy i v době imunoterapie. I při použití této léčebné metody neztrácejí na svém významu a je patrná silná korelace mezi vypočteným skóre na začátku systémové terapie a přežitím pacienta (85).

Koncentrace močového neopterinu je reprezentována jako poměr neopterin/kreatinin, zatímco sérový neopterin je udáván v absolutních hodnotách. Absolutní hodnota neopterinu v séru však může být zavádějící. Tento problém nabývá důležitosti zejména u pacientů s mRCC, u kterých velmi často pozorujeme pokles glomerulární filtrace z důvodu předchozí nefrektomie či parciální resekce ledviny, přidružených komorbidit, předchozí nefrotoxicke léčby, atd.

V naší studii se korelace mezi zvýšenými zánětlivými markery a krevními markery z periferní krve ukázala být výrazně silnější, když byl sérový neopterin reprezentován právě poměrem neopterin/kreatinin (neopterine/creatinine ratio). Tento fakt by mohl vést k úvaze preferovat hodnocení výsledků pomocí poměru neopterin/kreatinin spíše než pomocí absolutních hodnot sérového kreatininu, zejména u pacientů s mRCC.

Přestože CRP i albumin reprezentují reaktanty akutní faze, jejich hladiny spojené s prognózou pacienta se pohybují opačnými směry. Vyšší CRP se zdá být prognosticky nepříznivým faktorem, prognosticky nepříznivě se ukazuje naopak nižší hladina albuminu, jako negativního reaktantu. Reaktanty akutní faze jsou hojně zkoumány jako prognostické či prediktivní faktory, nejčastěji se hledá spojitost u hemoglobinu, albuminu, počtu krevních destiček ale i neopterinu. Tyto parametry nejsou hodnoceny pouze u pacientů s mRCC, ale i u jiných typů malignit, např. u gynekologických nádorů. Rovněž byla pozorována spojitost a prognostická významnost u pacientů s jinými typy chorob, např. kardiovaskulárními, jaterní cirhózou či septickým stavem (44, 45) .

Jak by se dalo předpokládat, markery zánětlivé odpovědi a parametry z periferní krve (hladina hemoglobinu, počet leukocytů) byly asociovány s přežitím a progresí pacientů během období sledování s nižšími p-hodnotami než byly pozorovány u poměru neopterin/kreatinin. I předchozí studie potvrdily tento fakt. Již dříve byla prezentována data týkající se zvýšení imunitních markerů u pacientů s horší odpovědí na léčbu checkpoint inhibitory (88, 89). Prezentovaná data tak vytvářejí z poměru neopterin/kreatinin kandidátní biomarker, který by mohl být vyšetřován v prospektivních studiích u pacientů s mRCC léčených imunoterapií.

Je zřejmé, že cílem budoucích studií hodnotících biomarkery bude indentifikovat nemocné, kteří budou mít z imunoterapie výrazný léčbný profit stejně tak jako identifikovat pacienty, kteří z imunoterapie profitovat nebudou. Zejména u pacientů s metastatickým renálním karcinomem je tento fakt potřeba zdůraznit. Narozdíl od jiných diagnóz, by bylo možné právě pacientům, kteří by z imunoterapeutik neměli profitovat, nabídnout terapii se zcela odlišným mechanismem účinku nebo účast v klinických studiích se zcela novými léky a kombinovanými režimy. U terapie mRCC máme v dnešní

době poměrně široké možnosti cílené a kombinované léčby, určit vhodné pacienty pro jednotlivé modality terapie by tedy znamenalo velký posun v managementu léčby mRCC.

Vzhledem k výzkumné povaze naší studie nebyla použita Bonferroniho korekce, na druhé straně asociace mezi koncentrací zánětlivých biomarkerů a výsledky pacientů byla konzistentní. Navíc rozdíly v paramteru neopterin/kreatinin ratio by zůstaly zřetelně signifikantní i po aplikaci Bonferroniho korekční procedury.

Naše studie má i další důležité limitace. Nejvíce patrný je zřejmě fakt, že se jedná o retrospektivní studii. Dalším problémem je heterogenita studované populace. Do studie byly zařazeni pacienti, kteří byli imunoterapií léčeni v různých liniích a rovněž různými imunoterapeutickými režimy. Někteří dostávali imunoterapii v první linii jako dvojkombinaci checkpoint inhibitorů, zatímco ostatní měli monoterapii nivolumabem ve druhé, třetí, čtvrté ale i vyšší linii léčby. Také doba sledování pacientů byla relativně krátká, tudíž i data spojená s přežitím nemocných jsou v době analýzy ještě ne zcela zralá. Na druhou stranu kohorta těchto pacientů pouze reprezentuje daleko větší množství pacientů, se kterými jsme se setkali v reálné praxi.

Objevení checkpoint inhibitorů kompletně změnilo léčebné armamentarium mnoha diagnóz. Metastatický karcinom ledviny patří spolu s maligním melanomem, NSCLC a také hematologickými malignitami mezi diagnózy, kde se díky těmto lékům odehrál největší posun v přežití nemocných. Ačkoli jsou prediktivní faktory léčby hledány již od počátků éry moderní imunoterapie, stále nenastal větší posun v této oblasti, který by znamenal rutinní zavedení testování prediktivních biomarkerů v běžné klinické praxi. Data týkající se této problematiky jsou v tuto chvíli nedostatečná. Stále nám chybí predikotry, které by spolehlivě předpovídaly nedostatečnou odpověď na imunoterapii ještě v předléčebném období. Ideální biomarkery by mělo být možné odebírat komfortně, jednoduše a rutinně, např. markery z periferní krve, hodnoty krevního obrazu, pozorovatelné změny hladin jednotlivých biochemických parametrů. Měly by být také snadno a konzistentně hodnotitelné. Předpokladem pro jejich úspěšné použití by byla také přesná definice metodiky jejich hodnocení. Jedním z nejsledovanějších prediktorů se stalo hodnocení PD-L1 exprese a hodnocení tumor infiltruujících leukocytů. Přestože tyto ukazatele hodnotila celá řada studií, výsledky ohledně jejich prediktivní hodnoty jsou stále vágní a nelze na ně při použití v běžné klinické praxi plně spoléhat (90).

Hodnocení biomarkerů imunitní odpovědi a zvýšená imunitní aktivace nás vede k silnému teoretickému předpokladu, že tyto parametry budou negativními prediktory léčebné odpovědi na imunoterapii, toto bylo potvrzeno nejen naší ale i dalšími předchozími studiemi (88, 91).

6. ZÁVĚR

Závěrem lze říci, že biomarkery aktivace imunitní odpovědi, zejména poměr neopterin/kreatinin jsou asociovány s výsledky pacientů s mRCC léčených imunoterapií. Zvýšené koncentrace cirkulujících markerů aktivace imunitní odpovědi se ukázaly být asociovány s horší prognózou nemocných.

Právě u pacientů s mRCC by mělo být preferováno měření neopterinu spíše jako poměr neopterin/kreatinin než měřením absolutní hodnoty sérového kreatininu. Potenciál jako prediktivní a prognostický marker, který v sobě hodnota kreatininu nese, by měl být potvrzen v rámci prospektivní studie s větší kohortou pacientů.

7. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Incidence a mortalita zhoubných ledviny mimo pánevku

Obrázek 2 Zastoupení klinických stádií v procentech zhoubných nádorů ledviny mimo pánevku.

8. SEZNAM TABULEK

- Tabulka 1 Skórovací systém dle MSKCC z roku 2002
- Tabulka 2 Skórovací systém dle IMDC z roku 2009
- Tabulka 3 Klinická data pacientů celého souboru
- Tabulka 4 Korelace mezi klinickými a biochemickými parametry se zánětlivými biomarkery
- Tabulka 5 Srovnání předléčebných hodnot jednotlivých parametrů u pacientů bez progresu a s progresí po 4 měsících od zahájení imunoterapie
- Tabulka 6 Srovnání předléčebných hodnot jednotlivých parametrů u pacientů bez progresu a s progresí po 6 měsících od zahájení imunoterapie
- Tabulka 7 Srovnání předléčebných hodnot jednotlivých parametrů u pacientů bez progresu a s progresí po 8 měsících od zahájení imunoterapie
- Tabulka 8 Srovnání předléčebných hodnot jednotlivých parametrů u pacientů bez progresu a s progresí po 12 měsících od zahájení imunoterapie
- Tabulka 9 Srovnání předléčebných hodnot jednotlivých parametrů u pacientů po 4 měsících od zahájení imunoterapie u pacientů, kteří přežili a u pacientů, kteří nepřežili
- Tabulka 10 Srovnání předléčebných hodnot jednotlivých parametrů u pacientů po 6 měsících od zahájení imunoterapie u pacientů, kteří přežili a u pacientů, kteří nepřežili
- Tabulka 11 Srovnání předléčebných hodnot jednotlivých parametrů u pacientů po 8 měsících od zahájení imunoterapie u pacientů, kteří přežili a u pacientů, kteří nepřežili
- Tabulka 12 Srovnání předléčebných hodnot jednotlivých parametrů u pacientů po 12 měsících od zahájení imunoterapie u pacientů, kteří přežili a u pacientů, kteří nepřežili

9. SEZNAM ZKRATEK

APCs	– Antigen presenting cells
AXL	– AXL Receptor Tyrosine Kinase
BMI	– Body mass index
ccRCC	– clear cell Renal Cell Carcinoma
CDKN2a	– Cyclin-dependent kinase inhibitor 2a
CD4+	– Cluster of differentiation 4 positive
CD8+	– Cluster of differentiation 8 positive
CD28	– Cluster of differentiation 28
CD80	– Cluster of differentiation 80
CD86	– Cluster of differentiation 86
c-KIT	– Tyrosine-protein kinase KIT
CRP	– C-reaktivní protein
CT	– Computed tomography
CTLA-4	– Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
DNA	– Deoxyribonucleic acid
FGFR	– Fibroblast growth factor receptor
FGFRR	– Fibroblast growth factor receptor receptor
GCSF	– Granulocyte colony stimulating factor
GTP	– Guanosintrifosfát
HIF	– Hypoxia inducible factor
HIF2 α	– Hypoxia-inducible factor 2-alpha
HIV-1	– Human Immunodeficiency Virus 1
hod	– hodina
ICI	– Immune checkpoint inhibitor

IGR – Insulin-like growth factor

IFN α – Interferon alfa

IFN γ – Interferon gamma

IgG1 – Immunoglobulin subclass 1

IgG4 – Immunoglobulin subclass 4

IL-2 – Interleukin 2

IMDC – International mRCC Database Consortium

mccRCC – Metastatic clear cell renal cell carcinoma

MET – MET Proto-Oncogene

ml – millilitr

mRCC – Metastatic renal cell carcinoma

MS – Metabolic syndrome

MSKCC – Memorial Sloan Kettering Cancer Center

mTOR – Mammalian target of rapamycin

nccRCC – Non-clear cell renal cell carcinoma

NK – Natural killer cells

NRF2 – Nuclear factor erythroid 2 – related factor 2

ORR – Overall response rate

OS – Overall survival

PDGFR – Platelet derived growth factor receptor

PFS – Progression-free survival

PD – L1-programed cell death 1 ligand

PD-1 – Programed cell death 1

PLR – Platelet lymphocyte ratio

RCC – Renal cell carcinoma

RDW – Red blood cell distribution width

- RET – Ret proto-oncogene
- RR – Response rate
- TCR – T-cell receptor
- TGF β 1 – Transforming growth factor beta 1
- TIIC – Tumor-infiltrating immune cell
- TIL – Tumor infiltrating lymphocytes
- TKIs – Tyrosine kinase inhibitors
- TMB – Tumor mutational burden
- Tregs – T-regulatory cells
- VEGF – Vascular endothelial growth factor
- VEGFR – Vascular endothelial growth factor receptor
- VHL – Von Hippel Lindau
- WHO – World Health Organization

10. SEZNAM POUŽITÝCH PRAMENŮ A LITERATURY

1. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(1):7-33. Epub 20210112. doi: 10.3322/caac.21654. PubMed PMID: 33433946.
2. Capitanio U, Montorsi F. Renal cancer. *Lancet.* 2016;387(10021):894-906. Epub 20150825. doi: 10.1016/S0140-6736(15)00046-X. PubMed PMID: 26318520.
3. SVOD. Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice. Available from: <https://svod.cz/analyse.php?modul=incmor#>.
4. Haake SM, Rathmell WK. Renal cancer subtypes: Should we be lumping or splitting for therapeutic decision making? *Cancer.* 2017;123(2):200-9. Epub 20161114. doi: 10.1002/cncr.30314. PubMed PMID: 27861752; PubMed Central PMCID: PMC5222778.
5. Shuch B, Amin A, Armstrong AJ, Eble JN, Ficarra V, Lopez-Beltran A, et al. Understanding pathologic variants of renal cell carcinoma: distilling therapeutic opportunities from biologic complexity. *Eur Urol.* 2015;67(1):85-97. Epub 20140521. doi: 10.1016/j.eururo.2014.04.029. PubMed PMID: 24857407.
6. Richards FM, Phipps ME, Latif F, Yao M, Crossey PA, Foster K, et al. Mapping the Von Hippel-Lindau disease tumour suppressor gene: identification of germline deletions by pulsed field gel electrophoresis. *Hum Mol Genet.* 1993;2(7):879-82. doi: 10.1093/hmg/2.7.879. PubMed PMID: 8364570.
7. Shen C, Kaelin WG. The VHL/HIF axis in clear cell renal carcinoma. *Semin Cancer Biol.* 2013;23(1):18-25. Epub 20120613. doi: 10.1016/j.semcancer.2012.06.001. PubMed PMID: 22705278; PubMed Central PMCID: PMC3663044.
8. Delahunt B, Eble JN. Papillary renal cell carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 105 tumors. *Mod Pathol.* 1997;10(6):537-44. PubMed PMID: 9195569.
9. Linehan WM, Spellman PT, Ricketts CJ, Creighton CJ, Fei SS, Davis C, et al. Comprehensive Molecular Characterization of Papillary Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med.* 2016;374(2):135-45. Epub 20151104. doi: 10.1056/NEJMoa1505917. PubMed PMID: 26536169; PubMed Central PMCID: PMC4775252.

10. Shuch B, Pantuck AJ, Pouliot F, Finley DS, Said JW, Belldegrun AS, et al. Quality of pathological reporting for renal cell cancer: implications for systemic therapy, prognostication and surveillance. *BJU Int.* 2011;108(3):343-8. Epub 20101119. doi: 10.1111/j.1464-410X.2010.09871.x. PubMed PMID: 21087450.
11. Fishman M. Review: therapy for kidney cancer with a sarcomatoid component. *Clin Adv Hematol Oncol.* 2011;9(1):67-9. PubMed PMID: 21326150.
12. Blum KA, Gupta S, Tickoo SK, Chan TA, Russo P, Motzer RJ, et al. Sarcomatoid renal cell carcinoma: biology, natural history and management. *Nat Rev Urol.* 2020;17(12):659-78. Epub 20201013. doi: 10.1038/s41585-020-00382-9. PubMed PMID: 33051619; PubMed Central PMCID: PMC7551522.
13. Tannir NM, Signoretti S, Choueiri TK, McDermott DF, Motzer RJ, Flaifel A, et al. Efficacy and Safety of Nivolumab Plus Ipilimumab versus Sunitinib in First-line Treatment of Patients with Advanced Sarcomatoid Renal Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2021;27(1):78-86. Epub 20200901. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-2063. PubMed PMID: 32873572; PubMed Central PMCID: PMC8589223.
14. Swartz MA, Karth J, Schneider DT, Rodriguez R, Beckwith JB, Perlman EJ. Renal medullary carcinoma: clinical, pathologic, immunohistochemical, and genetic analysis with pathogenetic implications. *Urology.* 2002;60(6):1083-9. doi: 10.1016/s0090-4295(02)02154-4. PubMed PMID: 12475675.
15. Isaacs JS, Jung YJ, Mole DR, Lee S, Torres-Cabala C, Chung YL, et al. HIF overexpression correlates with biallelic loss of fumarate hydratase in renal cancer: novel role of fumarate in regulation of HIF stability. *Cancer Cell.* 2005;8(2):143-53. doi: 10.1016/j.ccr.2005.06.017. PubMed PMID: 16098467.
16. Marchetti A, Rosellini M, Mollica V, Rizzo A, Tassinari E, Nuvola G, et al. The Molecular Characteristics of Non-Clear Cell Renal Cell Carcinoma: What's the Story Morning Glory? *Int J Mol Sci.* 2021;22(12). Epub 20210609. doi: 10.3390/ijms22126237. PubMed PMID: 34207825; PubMed Central PMCID: PMC8226484.
17. Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Rixe O, et al. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med.* 2007;356(2):115-24. doi: 10.1056/NEJMoa065044. PubMed PMID: 17215529.

18. McKay RR, Bossé D, Xie W, Wankowicz SAM, Flaifel A, Brandao R, et al. The Clinical Activity of PD-1/PD-L1 Inhibitors in Metastatic Non-Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cancer Immunol Res.* 2018;6(7):758-65. Epub 20180510. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-17-0475. PubMed PMID: 29748390; PubMed Central PMCID: PMC6712567.
19. Chow WH, Dong LM, Devesa SS. Epidemiology and risk factors for kidney cancer. *Nat Rev Urol.* 2010;7(5):245-57. doi: 10.1038/nrurol.2010.46. PubMed PMID: 20448658; PubMed Central PMCID: PMC3012455.
20. Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet.* 2008;371(9612):569-78. doi: 10.1016/S0140-6736(08)60269-X. PubMed PMID: 18280327.
21. Li L, Kalantar-Zadeh K. Obesity that makes kidney cancer more likely but helps fight it more strongly. *J Natl Cancer Inst.* 2013;105(24):1848-9. Epub 20131127. doi: 10.1093/jnci/djt348. PubMed PMID: 24285871; PubMed Central PMCID: PMC3866159.
22. Zhang GM, Zhu Y, Ye DW. Metabolic syndrome and renal cell carcinoma. *World J Surg Oncol.* 2014;12:236. Epub 20140729. doi: 10.1186/1477-7819-12-236. PubMed PMID: 25069390; PubMed Central PMCID: PMC4118156.
23. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev.* 2004;56(4):549-80. doi: 10.1124/pr.56.4.3. PubMed PMID: 15602010.
24. Kiss I. Modrá kniha České onkologické společnosti. 28. aktualizace. Brno: Masarykův onkologický ústav; 2022. 330 p.
25. Tanaka N, Mizuno R, Ito K, Shirotake S, Yasumizu Y, Masunaga A, et al. External Validation of the MSKCC and IMDC Risk Models in Patients Treated with Targeted Therapy as a First-line and Subsequent Second-line Treatment: A Japanese Multi-institutional Study. *Eur Urol Focus.* 2016;2(3):303-9. Epub 20151202. doi: 10.1016/j.euf.2015.11.001. PubMed PMID: 28723377.
26. NCCN. The National Comprehensive Cancer Network. Available from: www.nccn.org.

27. Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, Arén Frontera O, Melichar B, Powles T, et al. Survival outcomes and independent response assessment with nivolumab plus ipilimumab versus sunitinib in patients with advanced renal cell carcinoma: 42-month follow-up of a randomized phase 3 clinical trial. *J Immunother Cancer*. 2020;8(2). doi: 10.1136/jitc-2020-000891. PubMed PMID: 32661118; PubMed Central PMCID: PMC7359377.
28. Rini BI, Plimack ER, Stus V, Gafanov R, Hawkins R, Nosov D, et al. Pembrolizumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2019;380(12):1116-27. Epub 2019/02/16. doi: 10.1056/NEJMoa1816714. PubMed PMID: 30779529.
29. Choueiri TK, Powles T, Burotto M, Escudier B, Bourlon MT, Zurawski B, et al. Nivolumab plus Cabozantinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2021;384(9):829-41. doi: 10.1056/NEJMoa2026982. PubMed PMID: 33657295; PubMed Central PMCID: PMC8436591.
30. Motzer R, Alekseev B, Rha SY, Porta C, Eto M, Powles T, et al. Lenvatinib plus Pembrolizumab or Everolimus for Advanced Renal Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2021;384(14):1289-300. Epub 20210213. doi: 10.1056/NEJMoa2035716. PubMed PMID: 33616314.
31. Kaelin WG. The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: O₂ sensing and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(11):865-73. Epub 20081016. doi: 10.1038/nrc2502. PubMed PMID: 18923434.
32. Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M, et al. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2007;356(2):125-34. doi: 10.1056/NEJMoa060655. PubMed PMID: 17215530.
33. Buchler T, Fiser L, Benesova J, Jirickova H, Votrubova J. Spontaneous Regression of Metastatic Renal Cell Carcinoma after SARS-CoV-2 Infection: A Report of Two Cases. *Curr Oncol*. 2021;28(5):3403-7. Epub 20210903. doi: 10.3390/currencol28050294. PubMed PMID: 34590589; PubMed Central PMCID: PMC8482236.
34. Figlin RA, Thompson JA, Bukowski RM, Vogelzang NJ, Novick AC, Lange P, et al. Multicenter, randomized, phase III trial of CD8(+) tumor-infiltrating lymphocytes in combination with recombinant interleukin-2 in metastatic renal cell carcinoma. *J Clin*

- Oncol. 1999;17(8):2521-9. doi: 10.1200/JCO.1999.17.8.2521. PubMed PMID: 10561318.
35. Doehn C, Kausch I, Melz S, Behm A, Jocham D. Cytokine and vaccine therapy of kidney cancer. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2004;4(6):1097-111. doi: 10.1586/14737140.4.6.1097. PubMed PMID: 15606336.
36. Bukowski RM. Targeted therapy for cytokine-refractory metastatic renal cell carcinoma, and treatment in the community. *Oncology (Williston Park).* 2006;20(6 Suppl 5):25-8. PubMed PMID: 16773842.
37. Topalian SL, Weiner GJ, Pardoll DM. Cancer immunotherapy comes of age. *J Clin Oncol.* 2011;29(36):4828-36. Epub 20111031. doi: 10.1200/JCO.2011.38.0899. PubMed PMID: 22042955; PubMed Central PMCID: PMC3255990.
38. Mellman I, Coukos G, Dranoff G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature.* 2011;480(7378):480-9. Epub 20111221. doi: 10.1038/nature10673. PubMed PMID: 22193102; PubMed Central PMCID: PMC3967235.
39. Drake CG, Jaffee E, Pardoll DM. Mechanisms of immune evasion by tumors. *Adv Immunol.* 2006;90:51-81. doi: 10.1016/S0065-2776(06)90002-9. PubMed PMID: 16730261.
40. YERVOY (ipilimumab) injection for intravenous use. Highlights of prescribing information.: Bristol Mayers Squibb; 2022. Available from: https://packageinserts.bms.com/pi/pi_yervoy.pdf.
41. OPDIVO (nivolumab) injection for intravenous use. Highlights of prescribing information. Princeton: Bristol Mayers Squibb; 2022. Available from: https://packageinserts.bms.com/pi/pi_opdivo.pdf.
42. Krummel MF, Allison JP. CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *J Exp Med.* 1996;183(6):2533-40. doi: 10.1084/jem.183.6.2533. PubMed PMID: 8676074; PubMed Central PMCID: PMC2192613.
43. Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley PS, Freeman GJ, Green JM, et al. Pillars article: CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity.* 1994. 1: 405-413. *J Immunol.* 2011;187(7):3466-74. PubMed PMID: 21934098.

44. Wei SC, Levine JH, Cogdill AP, Zhao Y, Anang NAS, Andrews MC, et al. Distinct Cellular Mechanisms Underlie Anti-CTLA-4 and Anti-PD-1 Checkpoint Blockade. *Cell*. 2017;170(6):1120-33.e17. Epub 20170810. doi: 10.1016/j.cell.2017.07.024. PubMed PMID: 28803728; PubMed Central PMCID: PMC5591072.
45. Motzer RJ, Tannir NM, McDermott DF, Arén Frontera O, Melichar B, Choueiri TK, et al. Nivolumab plus Ipilimumab versus Sunitinib in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2018;378(14):1277-90. Epub 20180321. doi: 10.1056/NEJMoa1712126. PubMed PMID: 29562145; PubMed Central PMCID: PMC5972549.
46. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:677-704. doi: 10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331. PubMed PMID: 18173375.
47. Sharpe AH, Pauken KE. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(3):153-67. Epub 20171113. doi: 10.1038/nri.2017.108. PubMed PMID: 28990585.
48. Krummel MF, Allison JP. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med*. 1995;182(2):459-65. doi: 10.1084/jem.182.2.459. PubMed PMID: 7543139; PubMed Central PMCID: PMC2192127.
49. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*. 2012;366(26):2443-54. Epub 20120602. doi: 10.1056/NEJMoa1200690. PubMed PMID: 22658127; PubMed Central PMCID: PMC3544539.
50. Choueiri TK, Fishman MN, Escudier B, McDermott DF, Drake CG, Kluger H, et al. Immunomodulatory Activity of Nivolumab in Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2016;22(22):5461-71. Epub 20160511. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2839. PubMed PMID: 27169994; PubMed Central PMCID: PMC5106340.
51. Motzer RJ, Rini BI, McDermott DF, Redman BG, Kuzel TM, Harrison MR, et al. Nivolumab for Metastatic Renal Cell Carcinoma: Results of a Randomized Phase II Trial. *J Clin Oncol*. 2015;33(13):1430-7. Epub 2014/12/01. doi: 10.1200/JCO.2014.59.0703. PubMed PMID: 25452452; PubMed Central PMCID: PMC4806782.

52. Motzer RJ, Escudier B, George S, Hammers HJ, Srinivas S, Tsykodi SS, et al. Nivolumab versus everolimus in patients with advanced renal cell carcinoma: Updated results with long-term follow-up of the randomized, open-label, phase 3 CheckMate 025 trial. *Cancer*. 2020;126(18):4156-67. Epub 20200716. doi: 10.1002/cncr.33033. PubMed PMID: 32673417; PubMed Central PMCID: PMC8415096.
53. Hammers HJ, Plimack ER, Infante JR, Rini BI, McDermott DF, Lewis LD, et al. Safety and Efficacy of Nivolumab in Combination With Ipilimumab in Metastatic Renal Cell Carcinoma: The CheckMate 016 Study. *J Clin Oncol*. 2017;35(34):3851-8. Epub 20170705. doi: 10.1200/JCO.2016.72.1985. PubMed PMID: 28678668; PubMed Central PMCID: PMC7587408.
54. Melichar B, Spisarová M, Bartoušková M, Krčmová LK, Javorská L, Študentová H. Neopterin as a biomarker of immune response in cancer patients. *Ann Transl Med*. 2017;5(13):280. doi: 10.21037/atm.2017.06.29. PubMed PMID: 28758106; PubMed Central PMCID: PMC5515806.
55. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med*. 2000;192(7):1027-34. doi: 10.1084/jem.192.7.1027. PubMed PMID: 11015443; PubMed Central PMCID: PMC2193311.
56. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med*. 2002;8(8):793-800. Epub 20020624. doi: 10.1038/nm730. PubMed PMID: 12091876.
57. Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T, Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(19):12293-7. Epub 20020906. doi: 10.1073/pnas.192461099. PubMed PMID: 12218188; PubMed Central PMCID: PMC129438.
58. Madore J, Vilain RE, Menzies AM, Kakavand H, Wilmott JS, Hyman J, et al. PD-L1 expression in melanoma shows marked heterogeneity within and between patients: implications for anti-PD-1/PD-L1 clinical trials. *Pigment Cell Melanoma Res*.

2015;28(3):245-53. Epub 20141222. doi: 10.1111/pcmr.12340. PubMed PMID: 25477049.

59. Thompson RH, Kuntz SM, Leibovich BC, Dong H, Lohse CM, Webster WS, et al. Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up. *Cancer Res.* 2006;66(7):3381-5. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4303. PubMed PMID: 16585157.

60. Choueiri TK, Fay AP, Gray KP, Callea M, Ho TH, Albiges L, et al. PD-L1 expression in nonclear-cell renal cell carcinoma. *Ann Oncol.* 2014;25(11):2178-84. Epub 20140905. doi: 10.1093/annonc/mdu445. PubMed PMID: 25193987; PubMed Central PMCID: PMC4288138.

61. Matsushita H, Vesely MD, Koboldt DC, Rickert CG, Uppaluri R, Magrini VJ, et al. Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoediting. *Nature.* 2012;482(7385):400-4. Epub 20120208. doi: 10.1038/nature10755. PubMed PMID: 22318521; PubMed Central PMCID: PMC3874809.

62. Riaz N, Morris L, Havel JJ, Makarov V, Desrichard A, Chan TA. The role of neoantigens in response to immune checkpoint blockade. *Int Immunol.* 2016;28(8):411-9. Epub 20160405. doi: 10.1093/intimm/dxw019. PubMed PMID: 27048318; PubMed Central PMCID: PMC4986233.

63. Coulie PG, Van den Eynde BJ, van der Bruggen P, Boon T. Tumour antigens recognized by T lymphocytes: at the core of cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2014;14(2):135-46. doi: 10.1038/nrc3670. PubMed PMID: 24457417.

64. Chan TA, Yarchoan M, Jaffee E, Swanton C, Quezada SA, Stenzinger A, et al. Development of tumor mutation burden as an immunotherapy biomarker: utility for the oncology clinic. *Ann Oncol.* 2019;30(1):44-56. doi: 10.1093/annonc/mdy495. PubMed PMID: 30395155; PubMed Central PMCID: PMC6336005.

65. Yao J, Xi W, Zhu Y, Wang H, Hu X, Guo J. Checkpoint molecule PD-1-assisted CD8. *Cancer Manag Res.* 2018;10:3419-31. Epub 20180911. doi: 10.2147/CMAR.S172039. PubMed PMID: 30237743; PubMed Central PMCID: PMC6138960.

66. Chevrier S, Levine JH, Zanutelli VRT, Silina K, Schulz D, Bacac M, et al. An Immune Atlas of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cell.* 2017;169(4):736-49.e18. doi:

10.1016/j.cell.2017.04.016. PubMed PMID: 28475899; PubMed Central PMCID: PMC5422211.

67. Zhang S, Zhang E, Long J, Hu Z, Peng J, Liu L, et al. Immune infiltration in renal cell carcinoma. *Cancer Sci.* 2019;110(5):1564-72. Epub 20190407. doi: 10.1111/cas.13996. PubMed PMID: 30861269; PubMed Central PMCID: PMC6501001.

68. Lavacchi D, Pellegrini E, Palmieri VE, Doni L, Mela MM, Di Maida F, et al. Immune Checkpoint Inhibitors in the Treatment of Renal Cancer: Current State and Future Perspective. *Int J Mol Sci.* 2020;21(13). Epub 20200630. doi: 10.3390/ijms21134691. PubMed PMID: 32630154; PubMed Central PMCID: PMC7369721.

69. Fuchs D, Weiss G, Wachter H. Neopterin, biochemistry and clinical use as a marker for cellular immune reactions. *Int Arch Allergy Immunol.* 1993;101(1):1-6. doi: 10.1159/000236491. PubMed PMID: 8499767.

70. Wachter H, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Werner ER. Neopterin as marker for activation of cellular immunity: immunologic basis and clinical application. *Adv Clin Chem.* 1989;27:81-141. doi: 10.1016/s0065-2423(08)60182-1. PubMed PMID: 2667296.

71. Melichar B, Gregor J, Solichová D, Lukes J, Tichý M, Pidrman V. Increased urinary neopterin in acute myocardial infarction. *Clin Chem.* 1994;40(2):338-9. PubMed PMID: 8313617.

72. Reibnegger G, Bollbach R, Fuchs D, Hausen A, Judmaier G, Prior C, et al. A simple index relating clinical activity in Crohn's disease with T cell activation: hematocrit, frequency of liquid stools and urinary neopterin as parameters. *Immunobiology.* 1986;173(1):1-11. doi: 10.1016/S0171-2985(86)80084-5. PubMed PMID: 3492436.

73. Chauvin M, Larsen M, Quirant B, Quentric P, Dorgham K, Royer L, et al. Elevated Neopterin Levels Predict Fatal Outcome in SARS-CoV-2-Infected Patients. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11:709893. Epub 20210823. doi: 10.3389/fcimb.2021.709893. PubMed PMID: 34497777; PubMed Central PMCID: PMC8419218.

74. Margreiter R, Fuchs D, Hausen A, Huber C, Reibnegger G, Spielberger M, et al. Neopterin as a new biochemical marker for diagnosis of allograft rejection. *Experience*

- based upon evaluation of 100 consecutive cases. *Transplantation*. 1983;36(6):650-3. doi: 10.1097/00007890-198336060-00013. PubMed PMID: 6362141.
75. Aulitzky W, Frick J, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Wachter H. Significance of urinary neopterin in patients with malignant tumors of the genitourinary tract. *Cancer*. 1985;55(5):1052-5. doi: 10.1002/1097-0142(19850301)55:5<1052::aid-cncr2820550521>3.0.co;2-9. PubMed PMID: 3967190.
76. Yildirim Y, Gunel N, Coskun U, Pasaoglu H, Aslan S, Cetin A. Serum neopterin levels in patients with breast cancer. *Med Oncol*. 2008;25(4):403-7. Epub 20080305. doi: 10.1007/s12032-008-9054-2. PubMed PMID: 18320364.
77. Isci Bostanci E, Ugras Dikmen A, Girgin G, Gungor T, Baydar T, Nuri Danisman A. A New Diagnostic and Prognostic Marker in Endometrial Cancer: Neopterin. *Int J Gynecol Cancer*. 2017;27(4):754-8. doi: 10.1097/IGC.0000000000000952. PubMed PMID: 28383326.
78. Denz H, Fuchs D, Huber H, Nachbaur D, Reibnegger G, Thaler J, et al. Correlation between neopterin, interferon-gamma and haemoglobin in patients with haematological disorders. *Eur J Haematol*. 1990;44(3):186-9. doi: 10.1111/j.1600-0609.1990.tb00374.x. PubMed PMID: 2109703.
79. Melichar B, Tousková M, Solichová D, Králicková P, Kopecký G. CD4+ T-lymphocytopenia and systemic immune activation in patients with primary and secondary liver tumours. *Scand J Clin Lab Invest*. 2001;61(5):363-70. doi: 10.1080/003655101316911404. PubMed PMID: 11569483.
80. Wirleitner B, Schroecksnadel K, Winkler C, Fuchs D. Neopterin in HIV-1 infection. *Mol Immunol*. 2005;42(2):183-94. doi: 10.1016/j.molimm.2004.06.017. PubMed PMID: 15488607.
81. Michalak Ł, Bulska M, Strząbała K, Szcześniak P. Neopterin as a marker of cellular immunological response. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2017;71(1):727-36. doi: 10.5604/01.3001.0010.3851. PubMed PMID: 28894045.
82. Yasuda Y, Saito K, Yuasa T, Kitsukawa S, Urakami S, Yamamoto S, et al. Prognostic impact of pretreatment C-reactive protein for patients with metastatic renal cell carcinoma treated with tyrosine kinase inhibitors. *Int J Clin Oncol*. 2013;18(5):884-9. Epub 20120811. doi: 10.1007/s10147-012-0454-0. PubMed PMID: 22886358.

83. Ishihara H, Tachibana H, Takagi T, Kondo T, Fukuda H, Yoshida K, et al. Predictive Impact of Peripheral Blood Markers and C-Reactive Protein in Nivolumab Therapy for Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Target Oncol.* 2019;14(4):453-63. doi: 10.1007/s11523-019-00660-6. PubMed PMID: 31359231.
84. Martens A, Wistuba-Hamprecht K, Geukes Foppen M, Yuan J, Postow MA, Wong P, et al. Baseline Peripheral Blood Biomarkers Associated with Clinical Outcome of Advanced Melanoma Patients Treated with Ipilimumab. *Clin Cancer Res.* 2016;22(12):2908-18. Epub 20160119. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2412. PubMed PMID: 26787752; PubMed Central PMCID: PMC5770142.
85. Heng DY, Xie W, Regan MM, Warren MA, Golshayan AR, Sahi C, et al. Prognostic factors for overall survival in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with vascular endothelial growth factor-targeted agents: results from a large, multicenter study. *J Clin Oncol.* 2009;27(34):5794-9. Epub 20091013. doi: 10.1200/JCO.2008.21.4809. PubMed PMID: 19826129.
86. Stenman M, Laurell A, Lindskog M. Prognostic significance of serum albumin in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Med Oncol.* 2014;31(3):841. Epub 20140130. doi: 10.1007/s12032-014-0841-7. PubMed PMID: 24477648.
87. Teishima J, Kobatake K, Shinmei S, Inoue S, Hayashi T, Ohara S, et al. The effect of kinetics of C-reactive protein in the prediction of overall survival in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with tyrosine kinase inhibitor. *Urol Oncol.* 2017;35(11):662.e1-.e7. Epub 20170801. doi: 10.1016/j.urolonc.2017.07.008. PubMed PMID: 28778585.
88. Teng MW, Ngiow SF, Ribas A, Smyth MJ. Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. *Cancer Res.* 2015;75(11):2139-45. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0255. PubMed PMID: 25977340; PubMed Central PMCID: PMC4452411.
89. Hegde PS, Karanikas V, Evers S. The Where, the When, and the How of Immune Monitoring for Cancer Immunotherapies in the Era of Checkpoint Inhibition. *Clin Cancer Res.* 2016;22(8):1865-74. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1507. PubMed PMID: 27084740.
90. Rodriguez-Vida A, Strijbos M, Hutson T. Predictive and prognostic biomarkers of targeted agents and modern immunotherapy in renal cell carcinoma. *ESMO Open.*

2016;1(3):e000013. Epub 20160525. doi: 10.1136/esmooopen-2015-000013. PubMed PMID: 27843601; PubMed Central PMCID: PMC5070260.

91. Peng L, Wang Y, Liu F, Qiu X, Zhang X, Fang C, et al. Peripheral blood markers predictive of outcome and immune-related adverse events in advanced non-small cell lung cancer treated with PD-1 inhibitors. *Cancer Immunol Immunother.* 2020;69(9):1813-22. Epub 20200429. doi: 10.1007/s00262-020-02585-w. PubMed PMID: 32350592; PubMed Central PMCID: PMC7413896.

11. SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA DISERTAČNÍ PRÁCE

1. Práce související s disertační prací:

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

Spisarova M, Melichar B, Juranova J, Zemankova A, Adam T, Matousova K, Javorska L, Kujovska Kr cmova L, Turonova D, Studentova H. Biomarkers of Inflammation and Progression During Immunotherapy in Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma – přijato 10.11.2022 k publikaci (No 6509-S) v *In Vivo - journal of International Institute of Anticancer Research (IIAR)* - IF 2.406

Spisarova M, Losse S, Jakubec P, Hartmann I, Kral M, Ehrmann J, Szkorupa M, Studentova H, Melichar B. Bacillus Calmette-Guérin pneumonitis after intravesical instillation: Report of two cases and a review of the literature – přijato 24.11.2022 k publikaci (art. no. 3353) v *Biomedical Papers* – IF 1.648

Kopecky J, Kubecek O, Buchler T, Spisarová M. et al. Administration of Nivolumab in Metastatic Renal Cell Cancer Following Treatment With mTOR Inhibitors. *In Vivo*. 2021 Sep-Oct 2021;35(5):2981-2990. doi:10.21873/invivo.12593 – IF 2.35

Studentova H, Zemankova A, Spisarova M, et al. A Pathological Complete Response to the Combination of Ipilimumab and Nivolumab in a Patient with Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Medicina (Kaunas)*. Feb 23 2022;58(3) doi:10.3390/medicina58030336 – IF 2.43

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

Spisarová M, Melichar B, Vitásková D, Študentová H. Pembrolizumab plus axitinib combination and the paradigm change in the treatment of advanced renal cell carcinoma. *Future Oncol*. Jan 2021;17(3):241-254. doi:10.2217/fon-2020-0079 – IF 3.21

Spisarová M, Melichar B, Vitásková D, Študentová H. Pembrolizumab plus axitinib for the treatment of advanced renal cell carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther.* 07 2021;21(7):693-703. doi:10.1080/14737140.2021.1903321 – IF 3.627

Melichar B, Spisarová M, Bartoušková M, Krčmová LK, Javorská L, Študentová H. Neopterin as a biomarker of immune response in cancer patients. *Ann Transl Med.* Jul 2017;5(13):280. doi:10.21037/atm.2017.06.29 – IF 0.904

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

Spisarová M., Využití imunoterapie v neoadjuvanci, *Onkologie* 2020, 14(5): 219-220

Spisarová M., Toxicita imuno-onkologické léčby – myokarditida, *Klinická Onkologie* 2020, 33(1): 20-22

Spisarová M., Melichar B., Úvod do imunoterapie, *Onkologická revue* 2019, 6(Suppl Imuno):11-13

Melichar B., Spisarová M., Kombinované režimy v imunoterapii, *Klinická Onkologie* 2017, 30(Suppl 3): 3S45-3S49

d) Seznam přednášek/posterů přednesených uchazečem na veřejných odborných fórech

Spisarová M., Diferenciální diagnostika pacienta na kombinované imunoterapii s neurologickými symptomy, *PragueONCO, Praha, 1/2022*

Spisarová M., XXII. Setkání Klubu mladých onkologů, *Epidemiologie, etiologie a diagnostika, histopatologické typy nádorů ledvin, Medlov, 6/2019*

Spisarová M., Novinky v léčbě a diagnostice karcinomu ledviny a močového měchýře, Cabozantinib v léčbě metastatického renálního karcinomu, *Olomouc, 10/2018*

Spisarová M., Novinky v léčbě a diagnostice karcinomu ledviny a močového měchýře, Diagnostika a léčba karcinomu močového měchýře z pohledu onkologa, *Olomouc, 6/2019*

Spisarová M., Onkologie Panta rhei, Léčba mCRC v roce 2018, Olomouc, 4/2018.

Spisarová M., Nové horizonty v léčbě gastrointestinálních nádorů, Lonsurf v každodenní klinické praxi, PragueONCO, Praha, 1/2020

e) Publikovaná abstrakta

Spisarová M., Diferenciální diagnostika pacienta na kombinované imunoterapii s neurologickými symptomy, PragueONCO, 1/2022

f) Kapitoly v monografiích

Spisarová M. Imunoterapie v léčbě nemalobuněčného karcinomu plic. In: Petruželka L et al. Nemalobuněčný karcinom plic. Praha: Farmakon Press, 2016. 128 stran, ISBN 978-80-906589-1-2

2. Ostatní publikace:

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

Lemstrova R, Flasarova D, Spisarova M, et al. Evaluation and management of toxicity of cytoreductive surgery/hyperthermic intraperitoneal chemotherapy: the initial experience of a single centre study. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* Sep 2020;164(3):300-306. doi:10.5507/bp.2019.035

Studentova H, Volakova J, Spisarova M, et al. Severe tyrosine-kinase inhibitor induced liver injury in metastatic renal cell carcinoma patients: two case reports assessed for causality using the updated RUCAM and review of the literature. *BMC Gastroenterol.* Feb 05 2022;22(1):49. doi:10.1186/s12876-022-02121-3

b) Přehledné/souborné vědecké práce uveřejněné v ostatních recenzovaných vědeckých

Spisarová M., Lonsurf v každodenní klinické praxi, PragueOnco 2020

Lemstrová R., Spisarová M., Kombinace inhibitoru BRAF a inhibitoru MEK v léčbě pokročilého maligního melanomu nesoucího mutaci onkogenu BRAF V600, *Onkologická Revue* 2019,6(1): 46-51

Spisarová M., Léčba sarkomů měkkých tkání, Practicus 2, S12-S13, 2/2016

Spisarová M., Léčba axitinibem po rychlé progresi metastazujícího světlobuněčného renálního karcinomu při podávání sunitinibu-kazuistika, Onkologická revue, 6/2019

Spisarová M, Melichar B. Léčebné možnosti metastatického maligního melanomu. Remedica 2018; 28: 336–339