

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Studijní program: Biologie a patologie buňky

Studijní obor: Biologie a patologie buňky



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

MUDr. Bc. Miroslav Důra

Morfologická a imunohistochemická analýza melanocytárních lézí

Morphological and Immunohistochemical Analysis of Melanocytic Lesions

Disertační práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel: prof. MUDr. Pavel Dunder, Ph.D.

Praha, 2021

Prohlášení:

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

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

V Praze, 6. 3. 2021

Miroslav Důra

Podpis

Identifikační záznam:

DŮRA, Miroslav. *Morfologická a imunohistochemická analýza melanocytárních lézí.* [Morphological and Immunohistochemical Analysis of Melanocytic Lesions]. Praha, 2020. 81 s., 9 příl. Disertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Ústav patologie 1. LF UK a VFN. Vedoucí práce Dundr, Pavel.

Abstrakt

Tématem této disertační práce je morfoloická a imunohistochemická analýza melanocytárních lézí. Melanom je nejnebezpečnějším maligním kožním nádorem s možným výskytem i mimo kůži. Jeho včasná diagnostika je zásadním aspektem dobré prognózy onemocnění. Melanom je typický zakládáním vzdálených metastáz v horizontu mnoha let po iniciální diagnóze.

Rozmanitost melanocytárních lézí činí jejich histopatologickou diferenciální diagnostiku extrémně složitou. Úsilím současného výzkumu je identifikace surogátních imunohistochemických či molekulárně-genetických markerů, které by byly schopny odhalit biologickou povahu dané léze a tím vnést světlo do šedé zóny melanocytárních lézí nejisté biologické povahy.

Tato disertační práce se zabývá imunohistochemickou analýzou exprese proteinu GLUT-1 u 400 případů benigních a maligních melanocytárních lézí. Bylo zjištěno, že tento marker byl exprimován u signifikantní skupiny melanomů, avšak prakticky v žádném případě melanocytárního névu. Exprese GLUT-1 byla též spojena s horší prognózou onemocnění.

Disertační práce se dále zabývá problematikou TIL u melanomu. Analýza TIL (tumor infiltrujících lymfocytů) na 213 melanomech srovnávala prognostický význam 5 různých skórovacích systémů. V základním barvení HE hodnotila rozložení a denzitu zánětlivé celulizace. Pouze u třech z pěti skórovacích systémů byl zjištěn signifikantní význam jakožto prognostického ukazatele.

Klíčová slova: melanocytární léze, melanom, imunohistochemie, tumor infiltrující lymfocyty, GLUT-1, prognóza

Abstract

This doctoral thesis deals with morphological and immunohistochemical analysis of melanocytic lesions. Melanoma is the most dangerous malignant skin tumor with its potential occurrence outside the skin. Its early diagnosis is the basic aspect of a favorable disease prognosis. Distant metastases development occurring several years after the initial diagnosis is a typical feature of melanoma.

Histopathological differential diagnostics of melanocytic lesions is extremely difficult because of the diversity of melanocytic lesions. Contemporary research is focused on the identification of new surrogate markers based on immunohistochemistry or molecular genetics, which would be able to estimate the behavior of a certain lesion and clarify the gray zone of melanocytic lesions of uncertain biological behavior.

The doctoral thesis is focused on the immunohistochemical analysis of GLUT-1 protein expression in 400 cases of benign and malignant melanocytic lesions. Significant expression of this marker was identified in the group of melanomas, it was not identified in melanocytic nevi. Expression of GLUT-1 corresponded to the worse prognosis of the disease.

The doctoral thesis also deals with the issue of TILs. The analysis of TILs (tumor infiltrating lymphocytes) in 213 melanomas compared the prognostic significance of 5 different scoring systems. The distribution and the density of the inflammatory infiltration were assessed in HE staining. Statistical significance regarding its prognostic value was identified in three from five scoring systems.

Key words: melanocytic lesion, melanoma, immunohistochemistry, tumor infiltrating lymphocytes, GLUT-1, prognosis

Poděkování

Rád bych na tomto místě poděkoval mému školiteli, prof. MUDr. Pavlu Dundrovi, Ph.D., za odborné vedení, ochotu a zejména za trpělivost.

Rád bych poděkoval kolegům z Ústavu patologie 1. LF UK a VFN, jmenovitě MUDr. Radkovi Jakšovi, doc. MUDr. Kristýně Němejcové, Ph.D. a RNDr. Ivaně Stružinské, Ph.D., za jejich odbornou pomoc a osobní přístup.

Poděkování patří i prof. MUDr. Jiřímu Štorkovi, CSc., přednostovi Dermatovenerologické kliniky 1. LF UK a VFN, za jeho odborné vedení, vstřícné jednání a nezištnou pomoc.

Na závěr bych rád poděkoval mé rodině, která mi byla a je po celou dobu nenahraditelnou oporou.

Obsah

Úvod.....	9
ČÁST OBECNÁ.....	11
1. Maligní melanom – trendy v současné medicíně.....	11
1.1. Obecný pohled na problematiku melanomu.....	11
1.2. Epidemiologie melanomu ve světě.....	12
1.3. Epidemiologie melanomu v ČR.....	13
1.4. Diagnostika a prevence melanomu.....	17
1.5. Terapie časných stádií melanomu.....	18
1.6. Terapie pozdních stádií melanomu.....	20
1.6.1. Protinádorová imunoterapie.....	20
1.6.2. Cílená léčba.....	22
1.6.3. Další modalita léčby.....	23
1.7. Problematika melanomu oka.....	23
2. Histopatologie melanocytárních lézí – současný pohled.....	25
2.1. Obecná charakteristika histopatologie melanocytárních lézí.....	25
2.2. Nová klasifikace kožních nádorů dle WHO (2018).....	27
2.3. Molekulárně genetická analýza melanocytárních lézí.....	28
2.4. Imunohistochemická analýza melanocytárních lézí.....	29
2.5. Koncept regrese u melanomu.....	31
3. GLUT-1 a jeho význam v diagnostice melanocytárních lézí.....	33
3.1. Struktura a funkce GLUT proteinů.....	33
3.2. Struktura a funkce proteinu GLUT-1.....	34
3.3. Význam GLUT-1 v imunohistochemii.....	35
3.4. Historie výzkumu GLUT-1 u melanocytárních lézí.....	36
4. Problematika tumor infiltrujících lymfocytů u melanomu.....	38
4.1. Obecný pohled na tumor infiltrující lymfocyty.....	38
4.2. TIL u melanomu.....	39
4.3. Skórovací systémy hodnocení TIL u melanomu.....	40
ČÁST VÝZKUMNÁ.....	43
5. Analýza exprese GLUT-1 u melanocytárních lézí.....	43
5.1. Cíle a hypotézy.....	43
5.2. Materiál a metody.....	43

5.3. <i>Výsledky a diskuse</i>	45
6. Porovnání 5 různých skórovacích systémů hodnocení TIL u melanomu	47
6.1. <i>Cíle a hypotézy</i>	47
6.2. <i>Materiál a metody</i>	47
6.3. <i>Výsledky a diskuse</i>	48
7. Závěr	50
8. Přílohy	52
9. Seznam zkratk	63
10. Literatura	65
10.1. <i>Odborné články</i>	65
10.2. <i>Knihy</i>	76
10.3. <i>Internetové zdroje</i>	77
11. Seznam publikací doktoranda	78
11.1. <i>Publikace s IF, které jsou podkladem disertace</i>	78
11.2. <i>Publikace bez vztahu k tématu disertace</i>	78
11.2.1. <i>Publikace s IF</i>	78
11.2.2. <i>Publikace bez IF</i>	78
11.2.3. <i>Kapitoly v knihách</i>	81

Úvod

Melanom je obávaným zhoubným nádorem kůže, který se může vyskytnout i mimo kůži, výjimečně se objevuje metastazující melanom bez známého origa. Melanom je znám svým agresivním biologickým chováním a jeho potenciálem zakládat vzdálené metastázy v horizontu řady let od iniciální diagnózy. Incidence melanomu stoupá meziročně nejen v České republice, tento trend je možno pozorovat prakticky po celém světě. Melanom se stále častěji vyskytuje i u mladších věkových skupin pacientů.

Melanom je zároveň preventabilním nádorem díky možnosti preventivních kontrol kožního krytu a samovyšetřování.

Rok 2011 byl přelomovým rokem v terapii melanomu, jelikož byl do klinické praxe zaveden první lék ze skupiny imunoterapeutik – ipilimumab. V dalších letech se objevily další imunoterapeutika a cílené léky namířené proti mutované kináze BRAF a kináze MEK. Tyto léky výrazně prodlužují celkové přežití a prodlužují dobu do progresu. Zároveň dochází k významnému zlepšení kvality života s metastazujícím nádorem.

Vývoj v léčbě metastazujícího melanomu postupuje dále a trend zvyšující se úspěšnosti léčby bude jistě pokračovat. Cílem je elevace Kaplan-Meierových křivek a dosažení jejich plateau.

Obrovská plasticita melanocytů a rozmanitost benigních a maligních nádorů pocházejících z melanocytů činí jejich histopatologickou diagnostikou extrémně složitou, v dermatohistopatologii patří patologie melanocytů mezi nejkomplicovanější problematiku.

Jedním z cílů současného výzkumu je nalézt surogátní imunohistochemické či molekulárně-genetické markery, které by umožnily zpřesnit odhad biologické povahy hodnocené léze.

Každý z těchto markerů s jistou vahou „přihazuje“ na pomyslné misky vah, avšak nejzásadnějším a dosud základním histologickým barvením je barvení v hematoxylinu-eozinu. Výsledná diagnóza je postavena na kombinaci klinického obrazu, anamnézy, dermatoskopického obrazu a obrazu histopatologického za případného použití pomocných analýz.

Tato disertační práce se zaměřuje na problematiku imunohistochemické exprese GLUT-1 (glukózového transportéru 1) u benigních a maligních melanocytárních lézí. Bylo zjištěno, že protein GLUT-1 je exprimován u významné skupiny melanomů, avšak v žádném případě benigního melanocytárního névu. U části melanomů byl zachycen zonální efekt exprese v závislosti na vzrůstající vzdálenosti od nádorového stromatu. Exprese proteinu GLUT-1 byla zároveň spojena se významně horší prognózou onemocnění.

Tato disertační práce se zároveň zabývá problematikou TIL (tumor infiltrujících lymfocytů) u melanomu. TIL byly dosud intenzivně studovány zejména u karcinomu prsu a kolorektálního karcinomu. Studován je jejich prognostický a prediktivní význam.

Analýza srovnávala 5 různých skórovacích systémů ve vztahu k jejich prognostickému významu. Studie hodnotila rozložení a denzitu zánětlivé celulizace v základním barvení HE. Pouze u třech z pěti těchto systémů byl zjištěn signifikantní význam jakožto prognostického ukazatele.

ČÁST OBECNÁ

1. Maligní melanom – trendy v současné medicíně

1.1. Obecný pohled na problematiku melanomu

Kůži postihuje řada benigních a maligních nádorů. Nejčastějšími zhoubnými kožními nádory jsou bazocelulární, spinocelulární karcinom a melanom. Bazocelulární karcinom, který je dnes považován za adnexální tumor, je dokonce nejčastějším zhoubným nádorem vůbec a jeho vznik souvisí s věkem a chronickou expozicí slunečnímu záření.

Maligní melanom, správně řečeno pouze melanom, je zhoubným nádorem kůže vycházejícím z melanocytů a svou agresivitou má na svědomí drtivou většinu úmrtí na zhoubné nádory kůže. Melanom se v obecné rovině může vyskytovat kdekoli, kde se fyziologicky nacházejí melanocyty – např. trávicí trubice, oblast ORL, leptomeningy, genitál či uveální trakt.

Diagnózu melanomu komplikuje existence různých klinických forem melanomu. Vedle klasického melanomu projevujícího se známými znaky ABCDE (A – asymmetry, B – border, C – color, D – diameter, E – evolving) existuje řada subtypů, které se typickému klinickému obrazu melanomu vymykají. Existuje však i celá řada benigních nádorů kůže, které mohou melanom klinicky imitovat. Např. klasický nodulární melanom díky absenci horizontální složky může imitovat benigní kapilární hemangiom.

Mezi obtížně diagnostikovatelné melanomy patří tzv. **amelanotický melanom**, který se díky absenci melaninu klinicky přibližuje bazocelulárnímu či spinocelulárnímu karcinomu či mesenchymálním tumorům. Projevuje se jako růžová papula či nodulus.

Desmoplastický melanom se projevuje jako papula barvy kůže nejčastěji v oblasti obličeje. Specifickou skupinou jsou **miniaturní melanomy**, za které jsou obecně považovány melanomy horizontálního rozměru menšího než 4 mm. Tyto melanomy často postrádají klinický příznak „ošklivého káčátka“, nevykazují klinické příznaky dle pravidla ABCDE a jejich dermatoskopický obraz je často nespecifický, typické dermatoskopické znaky melanomu často chybí.

Akrolentiginózní melanom postihuje kůži tlustého typu rukou a nohou. Vzhledem k její specifické struktuře s přítomností dermatoglyfů se liší i dermatoskopický nález. Akrolentiginózní melanomy (často amelanotické) bývají klinicky někdy dlouho považovány za vulgární veruky či za tzv. black heel, čili hemoragie do kůže nejčastěji na patách.

Specifickou skupinou jsou **melanomy nehtové jednotky**. Tyto melanomy mohou postihnout nehtovou matrix (proximální či distální) nebo nehtové lůžko. Nejčastěji se klinicky projevují

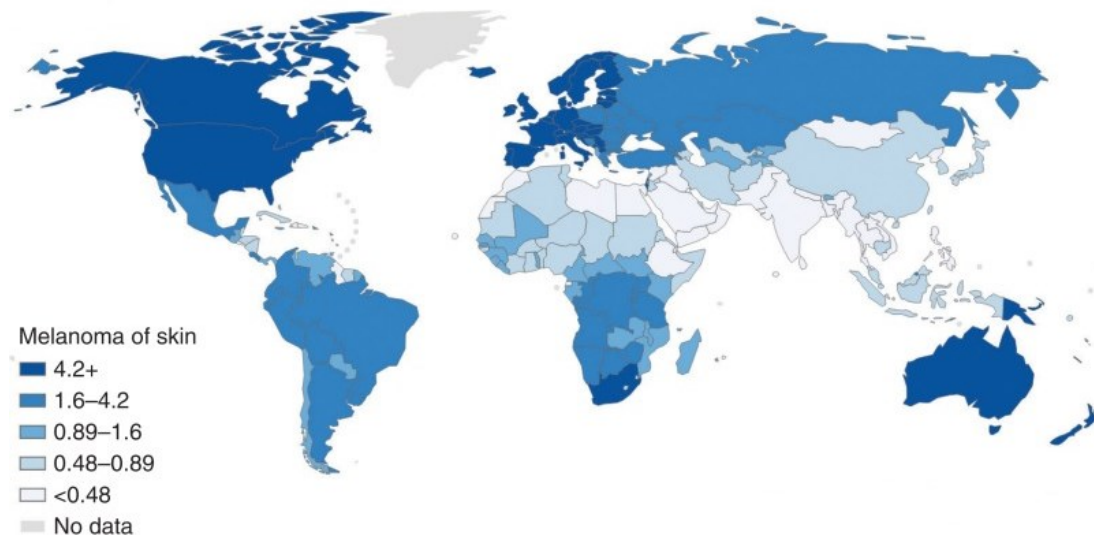
longitudinální nepravidelnou melanonychií, svou nepravidelností se liší od benigních névů této lokality. Známkou pokročilosti melanomu je disrupce nehtové ploténky a tzv. Hutchinsonovo znamení, tedy makroskopická pigmentace přilehlých nehtových valů.

1.2. Epidemiologie melanomu ve světě

Incidence kožního melanomu je celosvětově značně rozdílná. Její velikost záleží na zeměpisné šířce, nadmořské výšce, podnebí, oblačnosti či stavu atmosféry. Všechny tyto faktory souvisejí s absorpcí UV záření.

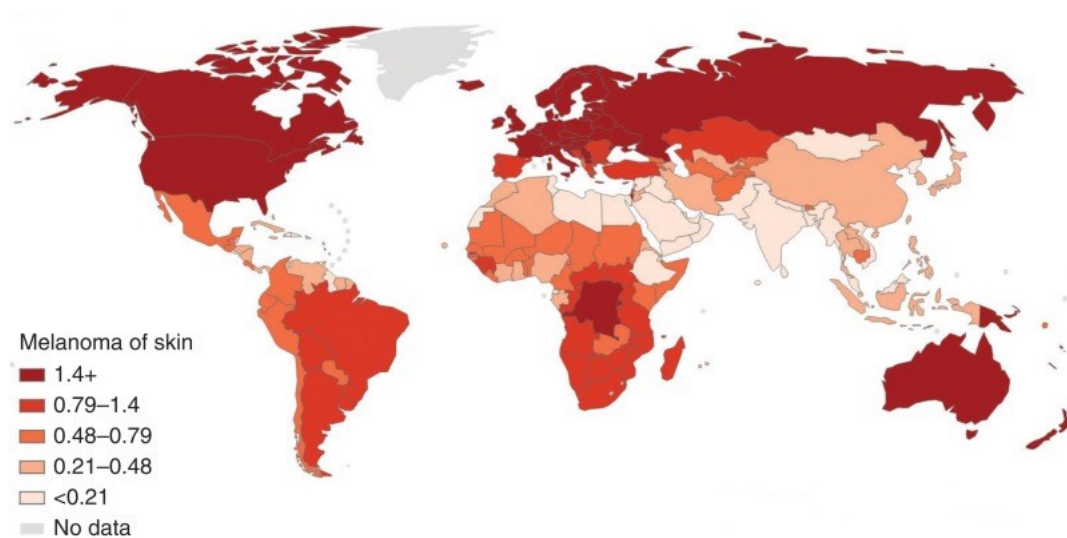
Na jižní polokouli incidence melanomu klesá se vzdáleností od rovníku, což je logicky dáno dávkou absorbovaného UV záření. Na severní polokouli je však gradient opačný, incidence melanomu roste s rostoucí vzdáleností od rovníku (Matthews NH. et al., 2017). Nejvyšší incidence melanomu v Evropě je v severských státech, Dánsku a též ve Švýcarsku a v Nizozemí. Tento fakt je pravděpodobně spojen s převažujícím světlým typem kůže místních obyvatel.

Mezi státy s tradičně nejvyšší celosvětovou incidencí melanomu patří Nový Zéland, Austrálie, následované severskými státy Evropy. Nízká incidence melanomu v arabském světě by mohla být způsobena zakrytím celého kožního krytu ortodoxním oděvem. Incidenci napříč kontinenty udává **obr. 1**.



Obr. 1 – Celosvětová incidence kožního melanomu (hodnoty jsou uvedeny na 100 000 obyvatel) (Matthews NH. et al., 2017).

Mortalita kožního melanomu je stejně jako incidence geograficky rozdílná (**obr. 2**). Mortalita melanomu stoupá se vzdáleností od rovníku, tento jev je v literatuře označován jako gradient zeměpisné šířky (Ward WH., Farma JM., 2017).

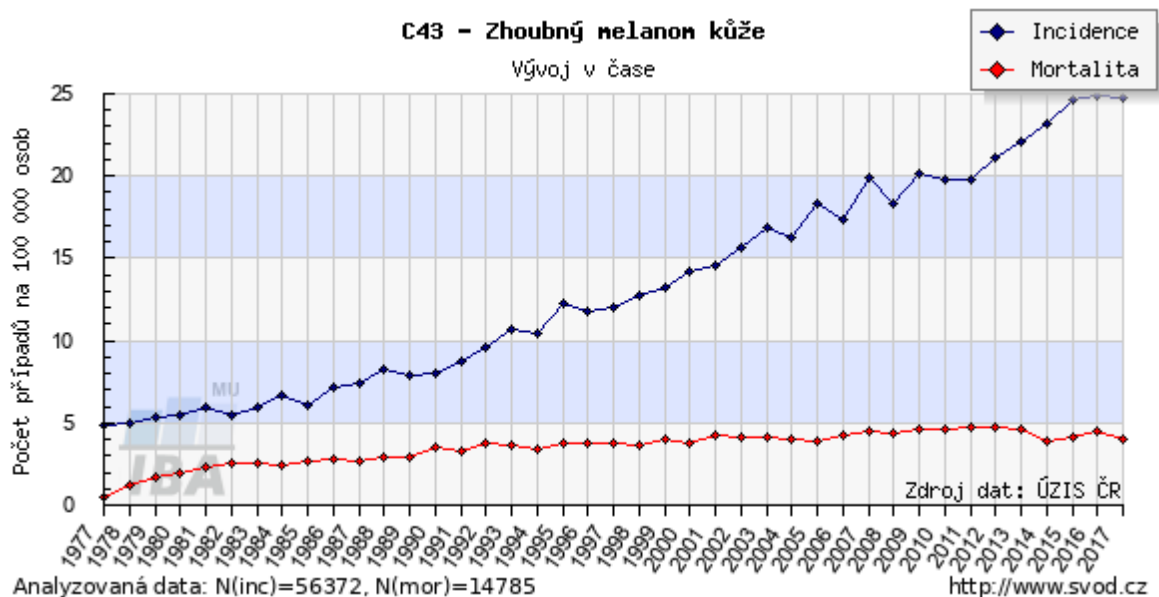


Obr. 2 – Celosvětová mortalita kožního melanomu (hodnoty jsou uvedeny na 100 000 obyvatel) (Matthews NH. et al., 2017).

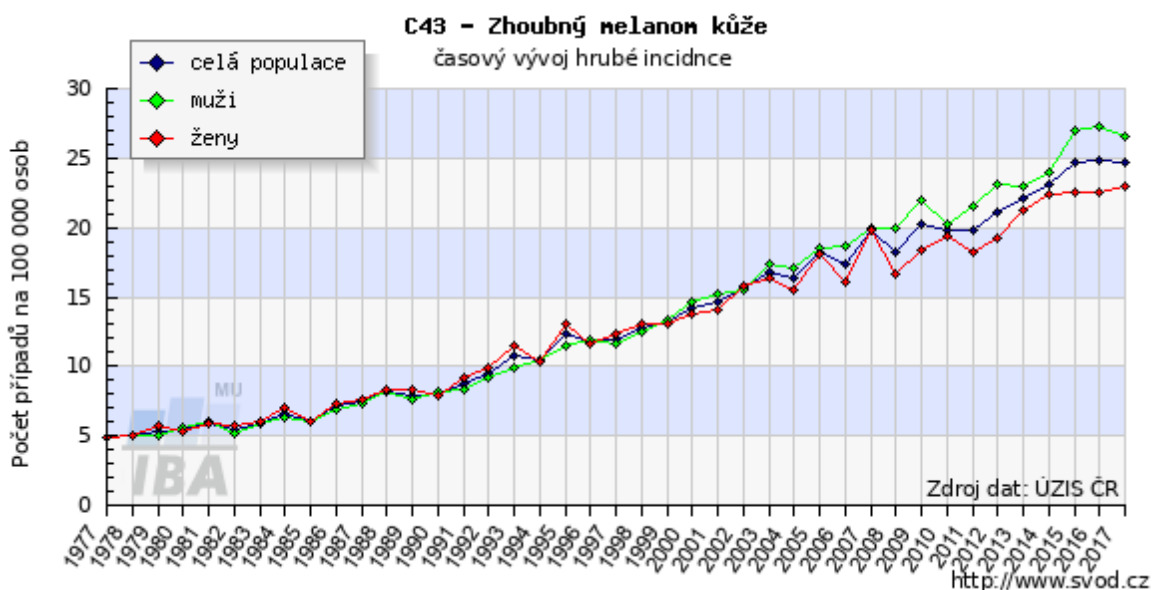
1.3. Epidemiologie melanomu v ČR

Incidence melanomu každoročně stoupá. Ukazuje to statistika incidence, která je vedená od roku 1977 (**graf 1**). Příčin vzrůstu incidence je několik. Na prvním místě stojí zvýšená expozice slunečnímu záření, která se stala v posledních desetiletích moderním trendem. Zájem o opalování a cestování za sluncem má negativní vliv na kůži Středoevropana. Zásadním faktorem je zde tzv. šokové osvětlení kůže, tedy intenzivní náhlá krátkodobá expozice kůže, která je po drtivou většinu roku zahalena oblečením. Vedle přirozeného zdroje slunečního záření je rizikovým faktorem i trend solárií, které poskytuje intenzivní šokové osvětlení celého kožního povrchu. Chorobná touha po dokonale opálené kůži se dnes nazývá tanorexie.

V rozložení hrubé incidence dle pohlaví je zřejmé, že mírně převažují muži nad ženami (**graf 2**).

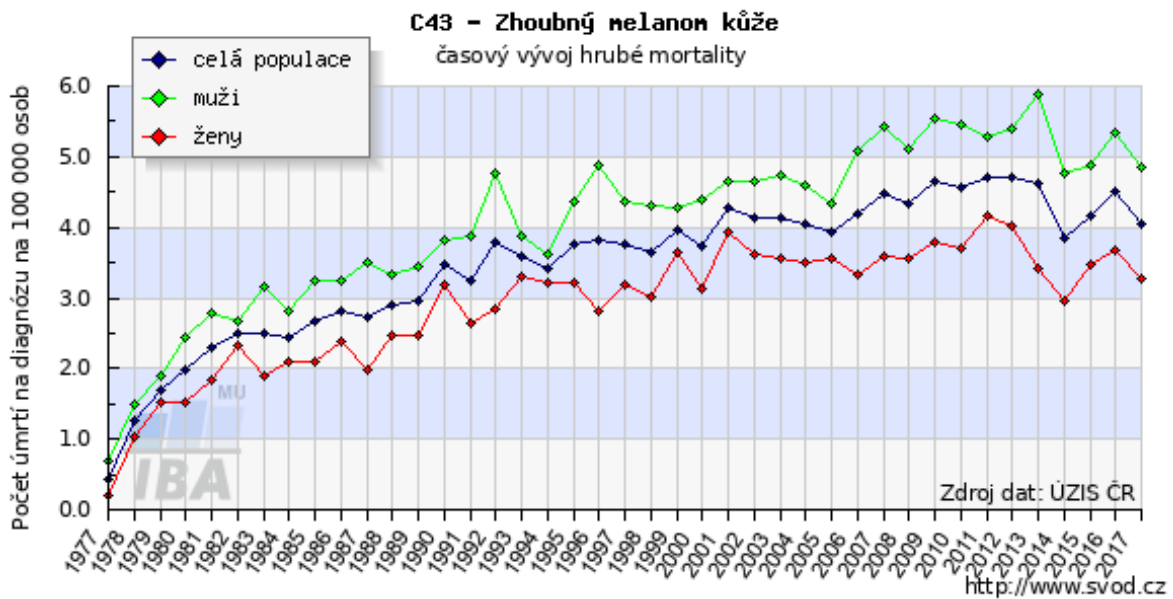


Graf 1 – Časový vývoj incidence a mortality na melanom kůže od roku 1977 (zdroj: www.svod.cz).

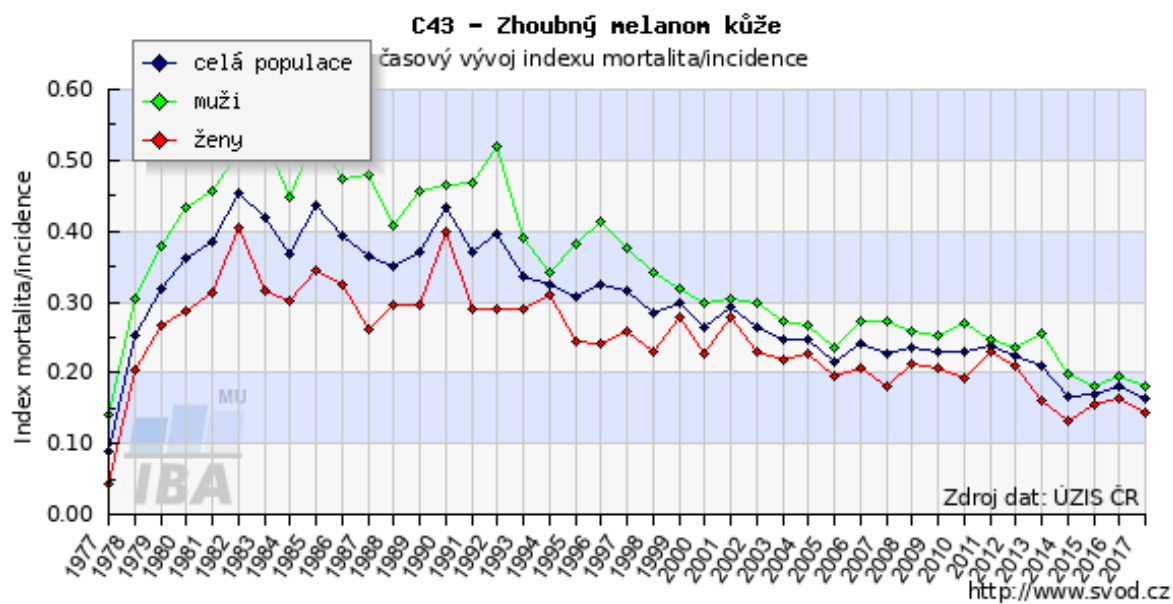


Graf 2 – Časový vývoj hrubé incidence melanomu kůže dle pohlaví (zdroj: www.svod.cz).

Ač trend hrubé mortality má mírně stoupající tendenci v souvislosti se vzrůstající incidencí (**graf 3**), mortalita korigovaná na příslušnou incidenci (index mortalita/incidence) má trvale výrazně klesající trend (**graf 4**). Trvale se specifická mortalita v ČR drží pod 5 úmrtí na 100 000 obyvatel (**graf 1**). Tento trend souvisí se zlepšující se prevencí a zejména s nástupem moderní léčby (viz dále).



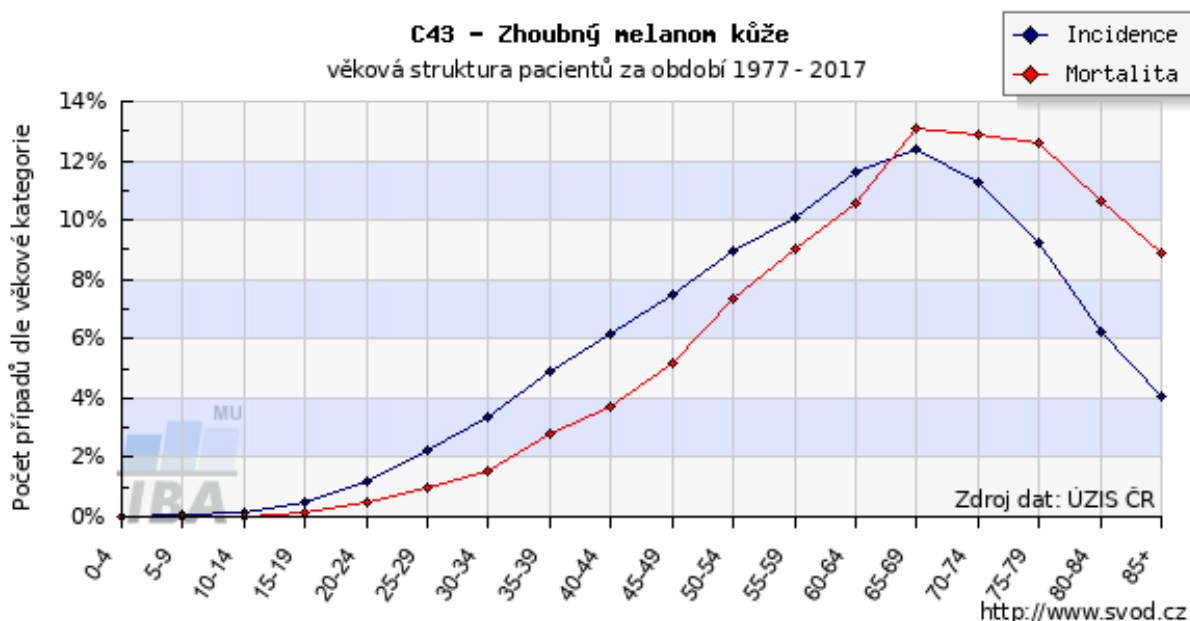
Graf 3 – Časový vývoj hrubé mortality melanomu kůže dle pohlaví (zdroj: www.svod.cz).



Graf 4 – Časový vývoj indexu mortalita/incidence melanomu kůže dle pohlaví (zdroj: www.svod.cz).

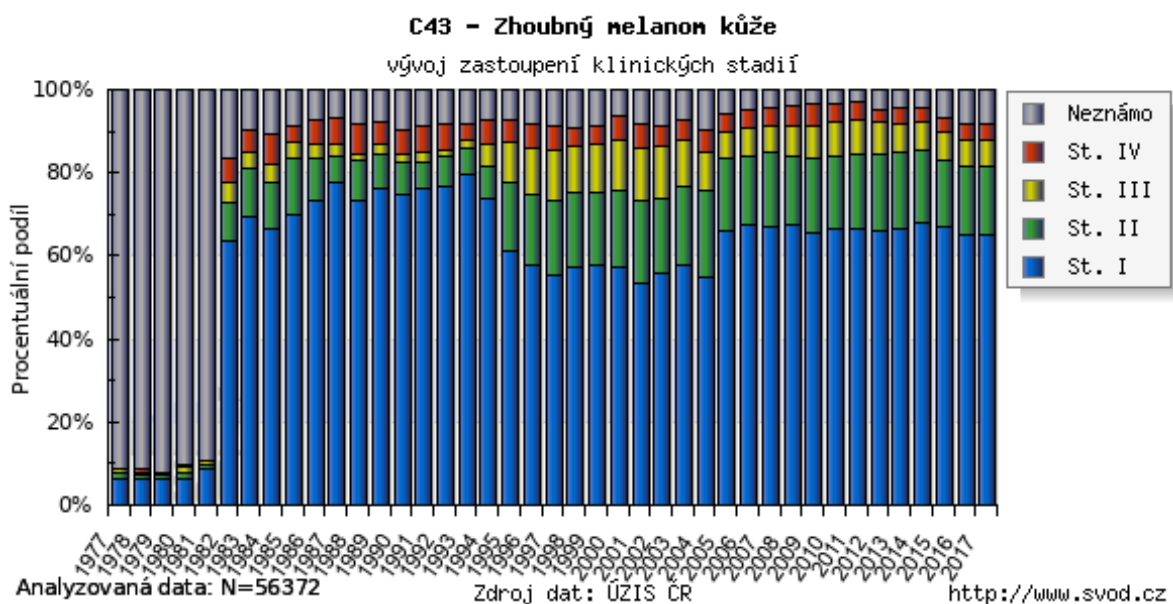
Maximum výskytu melanomu je ve věkové skupině 67–80 let (**graf 5**). Roli v tomto věkovém rozložení hraje vyšší procento výskytu lentigo maligna melanomu (nově tzv. high-CSD melanomy).

Od cca 25. roku života však pravděpodobnost výskytu melanomu strmě stoupá. Melanom v dětství je extrémně vzácným nálezem. U dětí do 10 let věku je jeho incidence méně než 1,8 na 1 000 000 obyvatel. Obvyklý je akcelerovaný a asymetrický růst pigmentové léze.



Graf 5 – Věková struktura pacientů s melanomem kůže za období 1977-2017 (zdroj: www.svod.cz).

Ve většině případů je diagnostikováno časně stádium onemocnění melanomem (stádium I a II, tedy časný či pokročilý primární tumor bez metastáz). Pouze jednotky procent zaujímají případy pokročilého onemocnění (stádia III a IV, tedy s postižením lymfatických uzlin či se vzdálenými metastázami) (**graf 6**).



Graf 6 – Vývoj zastoupení klinických stadií melanomu kůže (zdroj: www.svod.cz).

1.4. Diagnostika a prevence melanomu

Na vzrůstající incidenci melanomu má vliv zlepšující se povědomí o existenci zhoubných kožních nádorů a zlepšující se osvěta o jejich laickém rozpoznání. Pacienti jsou lépe informováni o prevenci a o faktorech zapříčiňujících vznik melanomu. Zlepšuje se povědomí pacientů o samovyšetření a časném rozpoznání melanomu (známé pravidlo ABCDE). Pacientům jsou nabízeny preventivní programy (např. Stan proti melanomu) a preventivní vyšetření kožního krytu hrazené zdravotní pojišťovnou. Neodmyslitelnou součástí ochrany před sluncem jsou krémy s SPF faktorem, které mají v kombinaci s oděvem prokázáný efekt na prevenci kožních nádorů.

Rizikovými faktory pro vznik melanomu je zejména výskyt melanomu v rodinné či osobní anamnéze, světlý fototyp kůže (fototyp I a II dle Fitzpatricka), časté spálení kůže (zejména v dětském věku), časté návštěvy solárií, syndrom mnohočetných dysplastických névů apod.

Ne zcela dořešenou otázkou stále zůstává neoptimálnější způsob provádění screeningu kožních nádorů. Ukazuje se, že populární akce typu Stanu proti melanomu nepřináší signifikantní zlepšení specifické mortality na melanom (Trautmann F. et al., 2016). Nastavil-li by se screening pouze na ohroženou skupinu populace, bude do programu zahrnuto pouze cca 20 % populace. Nejlepším způsobem se tedy v současné době jeví tzv. náhodný screening. Každý lékař může u pacienta, ať už přichází s jakýmkoli zdravotním problémem, objevit melanom při krátké aspekcii kožního krytu.

Výsledkem výše uvedeného je častější záchyt časných stádií melanomu, dle klasifikace TNM se stále častěji jedná o stádium pT1 melanomů či dokonce melanomy in situ. Část z těchto melanomů jsou pomalu rostoucí tumory typu lentigo maligna či lentigo maligna melanom, které by v budoucnu nezvýšily morbiditu či mortalitu.

Je známo, že pokročilost tumoru v době stanovení diagnózy nepřímo závisí na dostupnosti zdravotní péče. Melanomy časných stádií jsou častěji diagnostikovány ve městech nežli na vesnicích. Dokazuje to i ruská studie zabývající se geografickým rozložením výskytu melanomu v Ruské federaci (Muntyanu A. et al., 2020).

K časně diagnostice melanomu napomáhá dermatoskopie, která by měla být v současné době již rutinní součástí dermatologického vyšetření. Dermatoskopie zvyšuje diagnostickou přesnost až o desítky procent a závisí na zkušenosti dermatologa. Dermatoskopie v minulých letech zažila zlatý věk, kdy byly popisovány základní dermatoskopické struktury, které diferencují benigní a maligní léze. Počet vědeckých publikací zabývajících se dermatoskopií každým rokem exponenciálně roste. V současné době expanduje dermatoskopie i do oblasti

problematiky vlasů (trichoskopie), nehtů (onychoskopie), kapilár proximálního nehtového valu (kapilaroskopie) či zánětlivých dermatóz (inflamoskopie).

Komplexní pohled na diagnostiku a léčbu melanomu všech stádií přináší evropský konsensus vytvořený skupinou odborníků EADO (European Academy of Dermato Oncology).

1.5. Terapie časných stádií melanomu

Základem léčby časných stádií melanomu je chirurgická léčba, tedy široká excize tumoru a individuálně je indikováno mapování SLN (sentinelová lymfatická uzlina, viz dále). Doporučení mezinárodních společností se mírně liší, obecně jsou však evropské a americké guidelines srovnatelné. Radikálnost zákroku se odvíjí od aktuálně platného 8. vydání TNM klasifikace dle AJCC (**příloha 1**).

Přichází-li pacient již po provedené neširoké excizi melanomu, odvíjí se indikace mapování SLN dle stanovené výšky tumoru dle Breslowa. Pokud má pacient hodnotu tloušťky tumoru dle Breslowa nad 1,0 mm, pak je ve všech případech indikováno značení SLN. Pokud se hodnota dle Breslowa pohybuje mezi 0,8 a 1,0 mm, je značení SLN ke zvážení (např. mladý věk, velký počet mitóz, vysoká hodnota dle Clarka, přítomnost ulcerace, přítomnost mikrosatelitů či lymfangioinvasze). U melanomů s hodnotou Breslowa menší než 0,8 mm není obecně značení SLN doporučováno. Indikace provedení SLN však záleží na celkovém stavu pacienta a jeho interních komorbiditách. Ve všech případech je však indikována reexcize jizvy šíře od 5 do 20 mm, a to opět dle hodnoty dle Breslowa. Lem větší než 20 mm již dnes není doporučován, jelikož radikálnější zákroky neprokázaly ve srovnávacích studiích signifikantní zlepšení prognózy (Sladden MJ. et al., 2018).

Nežádoucí je široká excize pokročilého tumoru v první době, díky níž dochází ke změnám v drenáži tributárních lymfatických oblastí a tím je znemožněno mapování SLN v druhé době pro jeho nevytěžnost. Diagnosticko-terapeutický postup by měl být i z tohoto důvodu veden ve specializovaném dermatoonkologickém centru.

V případě pokročilých melanomů je před dalším chirurgickým zákrokem rutinní praxí provedení stagingového celotělového CT k vyloučení diseminace onemocnění.

Alternativou je užití PET/CT (pozitronová emisní tomografie/výpočetní tomografie) založená na tzv. Warburgově efektu, tedy aberantnímu silnému vychytávání glukózy nádorovou tkání ke glykolýze. Užívána je značená glukóza (FDG – fluorodeoxyglukóza). Melanomy vykazují téměř ve všech případech velmi intenzivní uptake FDG. Výhodou je též možnost celotělového skenu včetně končetin. PET/CT je schopno identifikovat metastázy velikosti cca 4 mm.

Přichází-li pacient s melanomem ještě neexcidovaným, rozhodnutí o indikaci mapování SLN se odvíjí podle charakteru melanomu (melanom s elevací nad niveau, s evidentní klinickou či dermatoskopickou ulcerací nebo regresí, krvácením, makroskopicky nodulární melanom apod.). Pokud není diagnóza melanomu klinicky zřejmá, jistotou je provedení neširoké excize s následným histologickým vyšetřením. Studie potvrzují, že probatorní excize z nádoru nezvyšuje pravděpodobnost postižení SLN a nezhoršuje jeho prognózu (Martin RC. et al., 2005).

Při standardizovaném histopatologickém vyšetření sentinelové uzliny je v sériových tkáňových lamelách cíleně hledána přítomnost nádorových buněk v barvení HE a imunohistochemicky. Hledány jsou ITC (isolated tumor cells), mikrometastázy (tedy metastázy do velikosti 2 mm v největším rozměru) a makrometastázy. V diferenciální diagnostice stojí tzv. nodální névus, tedy přítomnost benigních névocytů v lymfatické uzlině. Na rozdíl od metastáz se nodální névy nacházejí spíše ve vazivových septech. Prognosticky negativním nálezem je invaze metastázy přes vazivové pouzdro uzliny či spotřebování lymfatické tkáně nádorem.

U pacientů s melanomem v oblasti hlavy se obecně mapování SLN neindikuje vzhledem ke komplexní lymfatické drenáži v této oblasti.

Automatická indikace následné exenterace při pozitivitě sentinelové uzliny již dnes patří minulosti. Ve studiích se prokázal fakt, že exenterace nezlepšuje celkové přežití (overall survival) v porovnání s pravidelnými kontrolami (Faries MB. et al., 2017).

Samotné vyšetření sentinelové uzliny nezlepšuje prognózu onemocnění, je však zásadním stagingovým vyšetřením. Pozitivita sentinelové uzliny pacienta posunuje do klinického stádia III, které je v dnešní době indikací k zahájení adjuvantní terapie (**příloha 2**). Sporná a dosud nezodpovězená je otázka adjuvantní terapie u pacientů, kteří mají v SLN pouze ITC, tito pacienti nejsou v současné době rutinně do programu adjuvantní léčby zahrnováni.

Adjuvantní terapie cílenou léčbou či imunoterapií checkpoint inhibitory (podrobněji viz dále) prokázala signifikantní prodloužení doby do progresu onemocnění (Thomas D. et Bello DM., 2021). V současné době je tato terapie hrazena na 1 rok z veřejného zdravotního pojištění. Pro klinická stádia II, tedy pokročilý primární melanom bez postižení sentinelové uzliny, je tato terapie ve fázi klinických studií (informace k 12/2020).

Adjuvantní terapie interferonem alfa již dnes patří minulosti. Roční adjuvantní subkutánní interferonová terapie sice prodloužovala dobu do progresu onemocnění, ale nepřinesla zlepšení celkového přežití (Mocellin S. et al., 2013). Vykazovala vysoké procento nežádoucích účinků včetně hepatotoxicity, nefrotoxicity, chronické únavy, horeček, ztráty hmotnosti a poruch vizu.

Načasování dalších pravidelných kontrol se do jisté míry liší dle zvyklostí pracoviště, většinou se však jedná o intervaly 3 až 6 měsíců v prvních letech od diagnózy. Dle pokročilosti iniciálního onemocnění se odvíjí indikace pravidelných zobrazovacích vyšetření a odběry nádorových markerů (LDH a protein S100).

1.6. Terapie pozdních stádií melanomu

Metastazující melanom je závažným stavem. Doba dožití pacienta s metastatickým onemocněním se ještě před několika lety pohybovala v horizontu 3 až 6 měsíců.

Metastázy melanomu se mohou objevit prakticky kdekoli v organismu, nejčastěji se však objevují v kůži a podkoží, spádových lymfatických uzlinách, plicích, játrech a kostech. Metastázy CNS včetně leptomeningeální karcinomatózy mají často pozdní nástup a jsou známkou nepříznivé prognózy onemocnění, vzácně se vyskytují jako jediný příznak metastatického onemocnění.

Kožní metastázy se rozlišují trojího typu – satelitní (vzniknuvší do 2 cm od jizvy po primárním tumoru), intranzitní (vzniknuvší mezi jizvou a spádovými lymfatickými uzlinami) a vzdálené. Z terapeutických možností byla využívána onkochirurgie, paliativní radioterapie, systémová chemoterapie (nejčastěji kombinace vinblastinu, dacarbazinu a cykloplatiny) a pro izolované končetinové metastázy tzv. HILP (hypertermická izolovaná končetinová perfúze) za použití cytostatika melphalanu.

S nástupem moderní léčby došlo k signifikantnímu prodloužení doby bez progresu (progression free survival, PFS), prodloužení celkového přežití (overall survival, OS) včetně zlepšení kvality života.

Moderní protinádorová léčba metastazujícího melanomu v současnosti nabízí dvě možnosti – imunoterapii a cílenou léčbu.

Přehled registrovaných léčiv pro metastazující melanom, které byly schváleny FDA (Food and Drug Administration), udává **příloha 3**.

1.6.1. Protinádorová imunoterapie

Protinádorová imunoterapie checkpoint inhibitory, tedy monoklonálními protilátkami zesilujícími protinádorovou imunitní reakci, se do klinické praxe dostala v roce 2011. V tomto roce byl registrován první lék této skupiny – ipilimumab, plně humánní protilátka proti receptoru CTLA-4 (Krajsová I. et Bauer J., 2017). Tento receptor je exprimován na T

lymfocytech a při jeho vazbě na ligand CD80/CD86 na APC (antigen prezentujících buňkách) získává T lymfocyt inhibiční signál a dochází k jeho utlumení. Při blokaci receptoru CTLA-4 ipilimumabem není funkce T lymfocytu inhibována a imunitní reakce je tím potencována.

Postupně se objevily další monoklonální protilátky, které vykazaly vyšší účinnost v porovnání s ipilimumabem a vyšší četnost navozených parciálních a kompletních odpovědí, jmenovitě nivolumab a pembrolizumab. Tyto monoklonální protilátky jsou namířeny proti receptoru PD-1 (Programmed cell Death – 1) na T lymfocytech. Při navázání receptoru PD-1 na jeho ligand PDL-1, exprimovaný na nádorové buňce, dochází k inhibici funkce T lymfocytu. Při blokaci PD-1 nivolumabem či pembrolizumabem je tento inhibiční signál přerušen a dochází tím k posílení aktivity imunitního systému.

Podmínkou k zahájení imunoterapie je dobrý výkonnostní status pacienta, hodnocený dle skóre ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group). Kontraindikací jsou autoimunní choroby v anamnéze. Restaging se provádí pomocí CT trupu každé 3 měsíce.

Dojde-li při terapii checkpoint inhibitory na prvním restagingovém CT k obrazu progresie onemocnění, tedy zvětšení nádorové masy či dokonce vzniku dalších ložisek, nemusí se nutně jednat o reálnou progresi onemocnění. Zvětšení nádorové masy v úvodu terapie může značit tzv. pseudoprogresi, tedy přechodné zvětšení nádoru díky jeho infiltraci T lymfocyty (Ma Y. et al., 2019). O skutečnou progresi se tedy nejedná a v terapii je možno pokračovat. Progrese bude potvrzena či vyloučena na dalším restagingovém CT v horizontu minimálně 8 týdnů.

V literatuře se objevují kazuistiky tzv. hyperprogrese, akcelerované progresie při imunoterapii. Tento jev dosud není uspokojivě vysvětlen a etiologická souvislost s imunoterapií je stále předmětem diskusí (Yilmaz M. et Akovali B., 2020).

Vývoj onemocnění je hodnocen dle přesně definovaných radiologických kritérií iRECIST (Schwartz LH. et al., 2016). Nastat mohou 4 typy odpovědí na léčbu – progredující onemocnění, stabilizace onemocnění, parciální odpověď či kompletní odpověď. V léčbě je pokračováno do nevladatelné toxicity či do potvrzené skutečné progresie onemocnění.

Checkpoint inhibitory s sebou přináší četné a trvalé odpovědi. Dnes je znám fakt, že imunoterapie si ponechává dlouhodobý efekt i po jejím vysazení.

Vedle prokázaného protinádorového efektu vykazují checkpoint inhibitory i specifické spektrum nežádoucích účinků, mezi něž patří endokrinní toxicita (zejména hypofyzitida), gastroenterotoxicita (kolitida), pneumotoxicita (pneumonitida), hepatotoxicita, nefrotoxicita a kožní toxicita (Puzanov I. et al., 2017). Kožní toxicita je nejčastějším a zároveň nejčasnějším nežádoucím účinkem imunoterapie, ve většině případů se jedná o makulopapulózní exantém, pruritus či vitiligo. Samotná existence toxicity je spojena s lepší odpovědí na léčbu. Závažnost

nežádoucích účinků je hodnocena dle mezinárodní standardizované pětistupňové škály CTCAEv5.0 z roku 2017 (Common Terminology Criteria for Adverse Events, verze 5.0), od které se odvíjí i její management.

Terapie checkpoint inhibitory se dnes v indikovaných případech podává též ve fixních kombinacích (ipilimumab+nivolumab), které s sebou vedle signifikantně vyššího protinádorového efektu přinášejí i silnější nežádoucí účinky, se kterými má zkušenost většina pacientů (Larkin J. et al., 2019).

1.6.2. Cílená léčba

Druhou skupinou protinádorových léčiv jsou cílené léky, a to inhibitory mutované BRAF kinázy v kombinaci s MEK inhibitorem (Krajsová I. et Bauer J., 2017).

Přibližně polovina melanomů nese somatickou aktivační mutaci genu pro kinázu BRAF na pozici V600. Nejčastěji se jedná o substituci V600E, méně často V600K, ostatní mutace jsou vzácné a klinicky málo významné. Blokáce této mutované kinázy BRAF inhibitorem s sebou nese rychlou regresi nádorové masy, v horizontu několika měsíců však často dochází ke vzniku sekundární rezistence a další progresi onemocnění. Tato sekundární rezistence je často způsobena bypassem v signální kaskádě Ras vedoucí např. přes PI3K/AKT signální kaskádu. Kvůli časně sekundární rezistenci při monoterapii BRAF inhibitorem byl přidán MEK inhibitor do kombinace, čímž je signální kaskáda Ras-Raf-MEK-ERK blokována na dvou místech a tím je docíleno trvalejšího efektu.

BRAF inhibitory (vemurafenib, dabrafenib, encorafenib) a MEK inhibitory (kobimetinib, trametinib, binimetinib) jsou perorální malé molekuly s denním užíváním. Tyto léky tvoří fixní kombinace se specifickým dávkováním. Při vzniku toxicity umožňují dávkovací schémata redukci terapeutické dávky.

Spektrum nežádoucích účinků BRAF a MEK inhibitorů je opět specifické, jedná se zejména o silnou fotosenzibilizaci na složku UVA záření, folikulární keratózu, tvorbu palmoplantárních hyperkeratóz, keratoakantomů, zvýšené teploty, pyrexie a papulopustulózní exantém. Další nežádoucí účinky (jako např. reverzibilní centrální serózní retinopatie či plicní embolizace při terapii MEK inhibitorem) jsou vzácné. Gastrointestinální intolerance se vyskytuje vzácně. V případě vzniku nežádoucí příhody jsou dle její tíže léky vysazovány, případně je jejich dávka redukována. Management nežádoucích příhod se opět odvíjí od mezinárodní klasifikace CTCAEv5.0.

1.6.3. Další modalita léčby

Terapie moderními léčivými může být doplněna chirurgickou léčbou, kryodestrukcí exofytických kožních metastáz či konkomitantní zevní radioterapií. Radioterapie aplikovaná současně s protinádorovou imunoterapií může vzácně navodit tzv. abskopální efekt, při němž dochází k navození regrese i metastáz vzdálených, radioterapií neošetřených. Spíše již minulosti patří intralézionální aplikace rekombinantního interleukinu 2 do kožních metastáz.

Pro izolované jaterní metastázy se v indikovaných případech užívá chirurgická léčba, radiofrekvenční ablace či tzv. TACE (transarteriální chemoembolizace).

Pro izolované mozkové metastázy je využíváno selektivní ozáření stereotaktickou radiochirurgií, případně neurochirurgický zákrok. V případě nemožnosti ošetření pro jejich velikost či četnost se užívá WBRT (whole brain radiotherapy).

Novinkou v léčbě je intralézionální aplikace speciálně připravených onkolytických vakcín přímo do metastáz, např. tzv. T-VEC (talimogene laherparepvec), což je geneticky modifikovaný herpetický virus s protinádorovým efektem.

V pozdních stádiích onemocnění po vyčerpání moderních modalit léčby má své místo stále kombinovaná chemoterapie (vinblastin, dacarbazine, cykloplatina). Je známo, že chemoterapie může prokázat vyšší efekt, byl-li pacient předléčen imunoterapií.

Trendem současných klinických studií je kombinační léčba (checkpoint inhibitory + cílená léčba) a klinické hodnocení dalších molekul, jako např. atezolizumab, spartalizumab či bempegaldesleukin.

Důležitou součástí péče je symptomatická terapie, psychosociální podpora, paliativní péče a případně hospicová péče.

1.7. Problematika melanomu oka

Melanom oka postihuje jeho uveální trakt, vzniknout může v corpus ciliare, duhovce či cévnatce. Klinickými příznaky jsou stahování zorného pole, neostré vidění a případně změny na duhovce.

Genetické pozadí uveálního melanomu se diametrálně odlišuje od kožních melanomů. Uveální melanomy vykazují mutace zejména v genech GNA11 a GNAQ, které tvoří hlavní alfa podjednotku heterotrimerických G proteinů a hrají roli v signální kaskádě fosfatidylinozitolové signální dráhy.

Histologicky se uveální melanomy klasifikují dle Callendera na epiteloidní, vřetenobuněčné a smíšené. Histologický typ koreluje s prognózou onemocnění, přičemž vřetenobuněčný typ má prognózu nejlepší, epiteloidní typ nejhorší (Mooy CM. et Jong PTVM., 1996).

Léčebnou metodou je enukleace bulbu, případně radioterapie. Adjuvantní terapie v současné době není indikována.

Uveální melanom je typický zakládáním vzdálených metastáz v horizontu mnoha let po iniciální diagnóze. Výjimkou nejsou metastázy vznikuvší po 10, 15 či více letech. Vzhledem k absenci lymfatického zásobení oka nedochází k rozsevu do lymfatických uzlin, nýbrž hematogenně, prakticky pouze do jater a plic.

Léčebnými metodami metastazujícího uveálního melanomu je chirurgická resekce izolovaných metastáz, radiofrekvenční ablace izolovaných jaterních metastáz či TACE.

V systémové léčbě existují kontrolované studie pouze s ipilimumabem. Ipilimumab však vykázal u uveálního melanomu signifikantně nižší četnost léčebných odpovědí než u kožního melanomu (Maio M. et al., 2013).

Z dalších modalit existují omezené informace o použití multikinázových inhibitorů (např. sunitinib) či kombinované chemoterapie (Mahipal A. et al., 2012).

2. Histopatologie melanocytárních lézí – současný pohled

2.1. Obecná charakteristika histopatologie melanocytárních lézí

Samotné rozdělení melanocytárních nádorů pouze na benigní a maligní patří v dnešní době již minulosti. Melanocytární léze tvoří kontinuum od čistě benigních nádorů (névy) až po maligní nádory (melanom). Mezi těmito extrémami se nacházejí melanocytární tumory nejisté biologické povahy, pro něž se někdy užívají tři zavedené akronymy – **IAMPUS** (Intraepidermal Atypical Melanocytic Proliferations of Unknown Significance), **SAMPUS** (Superficial Atypical Melanocytic Proliferations of Unknown Significance) a **MELTUMP** (MELanocytic Tumors of Uncertain Malignant Potential), dvě posledně jmenované jednotky odlišuje zejména hloubka invaze, arbitrárně zvolenou hranicí je hodnota dle Breslowa 0,75 mm (Pock L., 2013).

Kromě klasických typů získaných **melanocytárních névů** (junkční, smíšený, intradermální, modrý) rozlišuje WHO klasifikace kožních nádorů dysplastický névus, nevus spilus, lentiginózní névus, akrální névus, Meyersonův (ekzematizovaný) névus, haló névus, rekurentní névus a névy speciálních lokalit (ucho, kštice, axila, mamma). Existují však i další, vzácné typy benigních névů – např. klonální névus, kombinovaný névus či névus s oseální metaplázií (Nantův osteonévus).

Mění se názor na koncept **dysplastického névu**. V minulosti byl dysplastický névus brán jako mezistupeň v progresi od benigního melanocytárního névu do invazivního melanomu (Duffy K. et Grossman D., 2012). V současné době je dysplastický névus považován za svébytný typ benigního névu. Pacient s mnohočetnými dysplastickými névy má sice vyšší pravděpodobnost vzniku melanomu kdekoli na kůži, samotný dysplastický névus však toto nebezpečí neskýtá. Současně platná WHO klasifikace nádorů kůže užívá pro dysplastický névus morfologický kód 8727/0, kterým je definována jeho benigní povaha (Elder DE. et al., 2018).

Jako na kontinuum je v současné době nahlíženo na skupinu **spitzoidních lézí**. Névus Spitzové byl původně popsán Sophií Spitzovou v roce 1948 jakožto juvenilní melanom, vykazuje však benigní biologické chování. Kontinuum spitzoidních lézí se pohybuje od benigního névu Spitzové přes atypický névus Spitzové, **STUMP** (Spitzoid Tumor of Uncertain Malignant Potential) až po spitzoidní melanom (Luo S. et al., 2011).

Podobné kontinuum platí u **primárně dermálních melanocytárních tumorů**. Do této skupiny se řadí tzv. modré tumory, hluboce penetrující névus (DPN, Deep Penetrating Nevus) a pigmentový epiteloidní melanocytom (PEM). PEM popsal v roce 2004 Zembowicz (Zembowicz A. et al., 2004).

Mezi tzv. modré tumory se řadí klasický modrý névus (což je primárně dermální névus s přítomností vřetenitých névocytů v koriu s pigmentem v melanofázích), celulární modrý névus, atypický celulární modrý névus a melanom vznikuvší v modrém névus. Recentně začal být odlišován tzv. Kamino névus, tedy superficiální modrý névus s přítomností junkční složky, jedná se tedy o smíšený modrý névus (Zembowicz A. et Phadke PA., 2011).

Recentně je skloňována existence tzv. **BAPomů**, tedy Wiesnerových névů. BAPomy jsou benigní melanocytární tumory, které byly popsány Wiesnerem v roce 2011 a které ztratily expresi proteinu BAP-1 (Wiesner T. et al., 2011). Tato nozologická jednotka je důležitou diferenciatně-diagnostickou jednotkou pro jejich osobitou strukturu složenou s mnohdy atypických dermálních epiteloidních melanocytů s monstrozitami jader, viditelnými buněčnými hranicemi a s často spitzoidním vzhledem.

Koncept **melanomu in situ** je znám od 80. let 20. století, kdy byl definován Ackermanem (Ackerman AB., 1985). Melanom in situ představuje melanom šířící se pouze v epidermis, bez přítomnosti invazivní komponenty. Melanom in situ na solárně chronicky osvětlené kůži je nazýván lentigo maligna, charakteristický je atrofií epidermis, vyhlazením rete ridges, solární elastózou v horním koriu a lentiginózním a pagetoidním šířením atypických melanocytů.

Invazivní melanom si až doposud zachoval v klinické praxi dělení na 4 základní typy – nodulární melanom, superficiálně se šířící melanom (SSM), lentigo maligna melanom (LMM) a akrolentiginózní melanom (ALM).

V histopatologické diferenciatní diagnostice melanomu stojí řada vzácných typů melanomu, které mohou napodobovat benigní léze či léze zcela jiné histogeneze. Patří mezi ně např. névoidní melanom (který může imitovat benigní névus), desmoplastický melanom (který může imitovat histologicky i imunohistochemicky nezralou jizvu), myxoidní melanom, bulózní melanom či melanom z balónových buněk (Patterson JW., 2015).

Histopatologické znaky malignity v barvení HE jsou stále základem diagnostické rozvahy (např. asymetrický růst, pagetoidní a lentiginózní šíření v epidermis, konsumpce epidermis, četné či atypické mitózy, jaderné atypie či monstrozity, viditelná jádérka, absence vyžrávání směrem ke spodině, asymetrická zánětlivá infiltrace, angioinvaze či perineurální invaze apod.) Vedle toho se však uplatňují pomocná imunohistochemická a molekulárně-genetická vyšetření (viz dále).

Nová **TNM klasifikace** z roku 2017 dle AJCC (8. vydání) s sebou přinesla jisté změny ve stagingu melanomu, čímž se zároveň změnila kritéria k indikaci mapování SLN či k zařazení do adjuvantní klinické studie (**příloha 1**).

2.2. Nová klasifikace kožních nádorů dle WHO (2018)

Nová klasifikace kožních nádorů dle WHO z roku 2018 přinesla kromě jiného změny v nomenklatuře melanomu (Elder DE. et al., 2018). Názvy SSM a LMM nahradila novými názvy CSD a low-CSD melanom (Cumulative Sun Damage). Tyto názvy tak reflektují etiologickou souvislost vzniku melanomu s expozicí UV záření. Ve výsledku tedy v současné době rozlišujeme 5 typů melanomu – high-CSD, low-CSD, akrální/mukozální melanom, uveální melanom a spitzoidní melanom (**tab. 1**). Nové názvy však zatím nevstoupily do hlubšího povědomí v klinické praxi.

Attribute	Type of melanoma				
	High-CSD	Low-CSD	Acral/mucosal	Uveal	Spitz
Mutation burden	Very high	High	Low	Very low	Probably low
UV radiation signature	Strong	Strong	Absent	Absent	Variable
DNA copy-number changes	Multiple	Multiple	Numerous	Few	Multiple
Type of aberrations	Typically chromosomal arms or entire chromosomes	Typically chromosomal arms or entire chromosomes	Multiple focused amplifications and deletions	Typically chromosomal arms or entire chromosomes	Typically chromosomal arms or entire chromosomes

High/low-CSD melanoma, melanoma in skin with a high/low degree of cumulative sun damage.

Tab. 1 – Nová klasifikace typů melanomu dle aktuálně platné WHO klasifikace kožních nádorů z roku 2018 (Elder DE. et al., 2018).

Nově dále došlo k rozdělení melanocytárních lézí na 5 tříd dle jejich biologické povahy (**tab. 2**). Do první skupiny („very low risk of progression“) byly zařazeny benigní névy. Tento fakt změnil náhled na vnímání biologické povahy névů, došlo k vymizení naprosté benigní povahy dané léze.

Class 1	Melanocytic tumours with very low risk of progression (e.g. common and mildly dysplastic naevi) No further treatment generally recommended ^a
Class 2	Melanocytic tumours with low (but currently unquantifiable) risk of progression (e.g. Spitz naevus without atypia and moderately dysplastic naevi) May warrant complete excision with narrow (e.g. < 5 mm) margins ^a
Class 3	Melanocytic tumours with higher risk of progression (e.g. severely dysplastic naevi and melanoma in situ) Usually warrants complete excision with wider (e.g. 5 mm) margins ^a
Class 4	AJCC stage pT1a and pT1b invasive melanomas Usually warrants wide excision (e.g. 1 cm margins), with consideration of sentinel lymph node biopsy according to national guidelines ^a
Class 5	AJCC stage pT2 (or higher) invasive melanomas, posing higher risk of metastasis Usually warrants wide excision (e.g. > 1 cm margins), additional prognostic/staging work-up (e.g. sentinel lymph node biopsy), and/or adjuvant therapy, according to national guidelines ^a

AJCC, American Joint Committee on Cancer.

^a The guidelines assume that the biopsy is representative and the margin is positive

Tab. 2 – Nová klasifikace melanocytárních lézí dle aktuálně platné WHO klasifikace kožních nádorů z roku 2018 (Elder DE. et al., 2018).

2.3. Molekulárně genetická analýza melanocytárních lézí

U melanomu, stejně jako u jiných zhoubných nádorů, dochází ke kumulaci somatických mutací, při nichž jsou v převaze vlivy protoonkogenů nad tumorsupresory.

Vzhledem k rozličné patogenezi melanomu je i rozložení mutací u různých podtypů melanomu různé.

Melanomy, na jejichž vznik má výraznější vliv chronické ozáření slunečním světlem (dle WHO nově nazvány high-CSD melanomy), kumulují velké množství bodových mutací, nejčastěji bodovou substitucí cytosinu za tymidin. Tato mutace je typicky ve spojení s patogenním vlivem UV záření na DNA. High-CSD melanomy jsou obecně jedny z nejvíce mutovaných tumorů.

Oproti tomu melanomy s nízkým stupněm expozice slunečnímu záření (low-CSD melanomy) obsahují signifikantně méně mutací.

Nejčastěji alterovanou signální dráhou u melanomu je kaskáda Ras, tedy Ras-Raf-MEK-ERK. Přibližně polovina melanomů vykazuje somatickou mutaci v kináze B-Raf na pozici V600. Tato mutace je negativním prognostickým markerem a zároveň pozitivním prediktivním markerem v léčbě melanomu cílenou léčbou malými molekulami.

U cca 15 až 20 % melanomů je detekována aktivační mutace genu NRAS. Tyto melanomy se též vyznačují agresivnějším chováním. V drtivé většině případů je tato mutace vylučující pro BRAF mutaci, tzn. při přítomnosti NRAS mutace je BRAF kináza wild type a naopak. U NRAS mutovaných melanomů mohou mít potenciální efekt MEK inhibitory – trametinib, binimetinib, selumetinib (Muñoz-Couselo E. et al., 2017).

U melanomu jsou též dysregulovány signální dráhy regulující buněčný cyklus, konkrétně delecí genu CDKN2A (kódující protein p16) a amplifikací genu CDK4. Mutace v genech pro řízení buněčného cyklu jsou zároveň nalézány jakožto germinální mutace způsobující výskyt familiárního melanomu.

Další často se vyskytující mutací u melanomu, včetně spitzoidního melanomu, je mutace v promotoru pro gen TERT, kódující enzym telomerázu (Thomas NE. et al., 2019). Její overexprese způsobuje patologickou elongaci telomer a tím imortalizaci nádorových buněk.

Pouze u malé části kožních melanomů je detekována aktivační mutace v genu KIT, tyto mutace jsou však častější u mukozálních sinonazálních melanomů a mohou být potenciálním terapeutickým cílem inhibitorů tyrozinkinázových receptorů, např. imatinib (Toscano de Mendonça UB. et al., 2018).

Akrální a slizniční melanomy vykazují oproti ostatním typům melanomů vyšší množství amplifikací. U těchto melanomů nenalzáme mutace typické pro mutagenní vliv UV záření.

Zcela odlišnými mutacemi se liší melanom uveální. U něj dochází k mutaci genů kódujících alfa-podjednotky heterotrimerických G proteinů, konkrétně GNAQ a GNA11.

2.4. Imunohistochemická analýza melanocytárních lézí

Vedle klasického obrazu v základním barvení HE jsou hledány imunohistochemické a molekulárně-genetické markery, které by pomohly při rozhodování o biologické povaze nádoru. Žádný z dosud objevených markerů nemá stoprocentní specifitu a jsou považovány za pomocné markery, základním obrazem je stále barvení hematoxylin-eozin.

Mezi nejčastěji používané imunohistochemické markery v diferenciální diagnostice melanocytárních lézí patří protein S100, SOX10, HMB-45, Melan A a nově též marker PRAME (Hosler GA., 2016).

Asi nejznámější marker **S100** má odvozené jméno od jeho 100% rozpustnosti v síranu amonném. Protein S100 je dimer složený ze dvou podjednotek (alfa a beta), jejichž vzájemnou kombinací vznikají tři izoformy. V imunohistochemii jsou používány polyklonální protilátky namířené proti všem izoformám proteinu. Pozitivita S100 přináší vysokou senzitivitu, avšak

poněkud nižší specificitu, jelikož pozitivitu vykazují nejen buňky melanocytární linie, ale též neuronální buněčné linie a z ní vzniknuvší tumory (např. schwannom, neurofibrom). Nejedná se tedy o čistě melanocytární marker.

SOX10 (sex determining region Y-box 10) je jaderný transkripční faktor, který je vysoce senzitivní a specifický pro buňky neurální lišty včetně Schwannových buněk a melanocytů. Pozitivní je v benigních i maligních melanocytárních lézích. Vzhledem k jaderné pozitivitě se hodí jeho užití k hodnocení oblasti dermoepidermální junkce a hodnocení pagetoidního šíření v epidermis. Expresí SOX10 je též detekována ve většině schwannomů a neurofibromů (Miettinen M. et al, 2015). Výhodou markeru SOX10 je jeho pozitivita v desmoplastických melanomech, u něhož selhávají jiné melanocytární markery. Diferenciálně diagnosticky je potřeba odlišit SOX10 pozitivní Schwannovy buňky ve vyzářující jizvě.

HMB-45 (Human Melanoma Black 45) je glykoprotein lokalizovaný v melanocytárních premelanozómech. Jeho exprese je nejvýraznější ve fetálních a aktivovaných melanocytech. Jeho pozitivita se s jejich vyzářáním a přechodem do klidové fáze vytrácí. Tento gradient je viditelný v benigním smíšeném či intradermálním melanocytárním névu. Pozitivní jsou i melanocyty modrých névů. Imunohistochemická pozitivita je cytoplazmatická, může být i granulární (Fuertes L. et al., 2013).

Přibližně 90 % melanomů vykazuje expresí HMB-45, která však nevykazuje gradient směrem ke spodině. Výjimku tvoří desmoplastické melanomy, které jsou většinou negativní. Expresí HMB-45 u metastáz melanomů je variabilní, pohybuje se od 70 do 90 % (Calonje E. et al., 2019).

HMB-45 je exprimován též u dalších tumorů, zejména u světlobuněčných sarkomů a tumorů ze skupiny PEComů (Perivascular Epithelioid Cell tumors) vykazující současnou myoidní a melanocytární diferenciaci (Dabbs DJ., 2018).

Melan A (MART-1, Melanoma Antigen Recognized by T cells 1) jsou označení pro dva různé klony protilátek, které jsou namířeny proti společnému epitopu – melanosome membrane protein, nacházející se v membráně premelanozomů normálních melanocytů. Jejich cytoplazmatická pozitivita je poměrně specifickým markerem melanocytární diferenciaci, používá se k hodnocení junkčních i smíšených melanocytárních lézí benigní a maligní povahy (Busam KJ. et al., 1998). Melan A, stejně jako HMB-45, je exprimován v PEComech. Melan A je exprimován asi u 80 % metastáz melanomů, stejně jako HMB-45 je negativní u desmoplastických melanomů. V obecné rovině je specificita markeru Melan A pro diagnostiku melanocytárních lézí nižší než HMB-45 (Jungbluth AA. et al., 1998).

MITF (Microphthalmia-associated Transcription Factor) je poměrně málo specifický marker melanocytární diferenciace s jadernou pozitivitou (Miettinen M. et al., 2001).

Marker **p16** (inhibitor buněčného cyklu) je poměrně recentně používaným markerem, který našel v kombinaci s ostatními markery roli v diferenciaci benigních spitzoidních lézí (s pozitivní jadernou a cytoplazmatickou pozitivitou) a spitzoidního melanomu (kde se jeho pozitivita vytrácí) (Koh SS. et Cassarino DS., 2018).

Tyrozináza je základním enzymem umožňujícím syntézu melaninu z tyrozinu v melanozómech. V rutinní diagnostice melanocytárních lézí je užíván méně často. Vykazuje cytoplazmatickou pozitivitu (Clarkson KS. et al., 2001).

BAP-1 (BRCA1 Associated Protein 1) je recentně popsaným markerem, jehož ztráta jaderné positivity značí tzv. BAP-1 inaktivované névy (Wiesnerovy névy, BAPomy). Vzhledem k tomu, že BAP-1 je tumorsupresorový protein, ztráta jeho exprese se vyskytuje i u maligních tumorů včetně melanomu.

PRAME (PReferentially expressed Antigen in MELanoma) je zcela nově objevený nukleární marker, jehož exprese byla imunohistochemicky preferenčně potvrzena u melanomu v porovnání s benigními melanocytárními névy (Lezcano C. et al., 2018). Výjimkou jsou desmoplastické melanomy, kde je jeho exprese nízká.

V rámci diagnostiky melanocytárních lézí se též užívá klasických proliferačních markerů, zejména Ki67 (MIB-1). **Ki67** je exprimován v jádru proliferačních buněk, je negativní v buňkách v G0 fázi buněčného cyklu. Dalším proliferačním markerem je **PHH3** (Phosphohistone H3), který je exprimován v jádře v pozdní G2 a M fázi buněčného cyklu.

Melanom může aberantně exprimovat celou řadu dalších markerů. Detekována může být přítomnost intermediálních filament desminu a cytokeratinů či synaptofyzinu (Romano RC. et al., 2015). Publikovány byly případy aberantní exprese vaskulárních markerů CD31 a CD34 u melanomu (Pisacane AM. et al., 2007).

2.5. Koncept regrese u melanomu

Tzv. regresivní změny u melanomu jsou popisovány u 10 až 35 % melanomů (Requena C. et al., 2009). Jedná se o imunitní reakci vůči přítomnosti tumoru v organismu. Regresivní změny si zaslouží pozornost nejen v souvislosti s prognózou onemocnění, ale též v souvislosti s TIL (tumor infiltrujícími lymfocyty), viz dále.

Samotný koncept regrese byl v minulosti zatížen nejednotností hodnocení autentické regrese. V roce 2009 Requena C. et al. navrhl histologická kritéria regrese u melanomu. Dle těchto kritérií je regrese klasifikována do dvou skupin – časná a rozvinutá.

V časně fázi regrese dochází k redukci počtu melanomových buněk. Objevuje se kulatobuněčný zánětlivý infiltrát často s příměsí plazmocytů, který může být asymetricky uspořádán. Dochází ke ztenčování epidermis (tzv. konsumpce epidermis). Zánětlivý infiltrát může postihnout i oblast přilehlé dermoepidermální junkce s obrazem vakuolizace bazální vrstvy epidermis, lichenoidního zánětlivého infiltrátu s přítomností cytoidních tělísek (Massi G. et LeBoit PE., 2016). Přítomny bývají melanofágy a zvýšená vaskulární denzita.

V pozdní fázi regrese dochází k novotvorbě vaziva. Novotvořené vazivo lze ozřejmit selektivním barvením na přítomnost elastických vláken, přičemž novotvořená fibrotizace tato vlákna neobsahuje.

Regresivní změny mohou postihnout i benigní melanocytární névy, jedná se o tzv. halo névy či Suttonovy névy. Kolem těchto névů se tvoří perifokální výbled a posléze může docházet ke kompletní regresi celého névu, zanechávající pouze elipsoidní hypo- či depigmentovanou makulu. Histologicky je přítomen symetrický kulatobuněčný zánětlivý infiltrát. Tzv. halo či Suttonův fenomén (perifokální depigmentace) je však považován i za obecný pojem, který může být příznakem extenzivně regredovaného melanomu (Nedelcu RI. et al., 2015). Je pravděpodobné, že část melanomů neznámého primárního origa jsou ve skutečnosti kompletně regredované metastazující kožní melanomy, které zůstaly pacientem nepovšimnuty.

Regrese u melanomu byla dlouhou dobu považována za negativní prognostický faktor. Regrese byla spojována s agresivnějším biologickým chováním melanomu a s vyšší pravděpodobností postižení spádových lymfatických uzlin. Zcela recentně však byl publikován článek porovnávající regredující a neregredující melanomy. Zjištěna byla příznivější prognóza regredujících melanomů stádia I a II (El Sharouni MA. et al., 2021).

3. GLUT-1 a jeho význam v diagnostice melanocytárních lézí

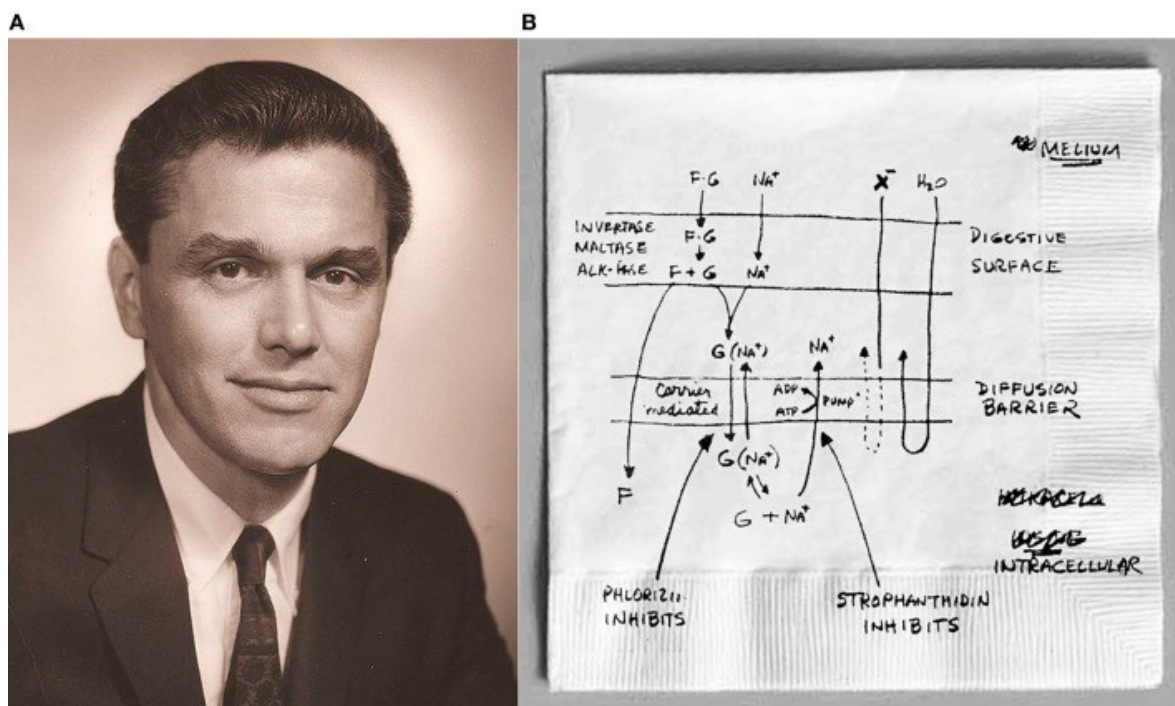
3.1. Struktura a funkce GLUT proteinů

Glukozové transportéry (zkráceně GLUT) jsou skupinou transmembránových proteinů, které umožňují transport glukózy (a dalších příbuzných hexóz) přes plazmatickou membránu buněk. Jedná se o sekundárně aktivní transport, při němž dochází ke kotransportu sodných iontů a hexózy jejich současným symportem. Hexóza prochází do buňky proti gradientu díky sodným iontům, které prochází pasivně díky gradientu, který je tvořen sodíko-draslíkovou pumpou (Na/K ATPáza).

Souhrnně se glukozové transportéry označují zkratkou SLC2A (Solute Carrier Family). Dosud bylo popsáno 14 typů GLUT transportérů. Klasifikovány jsou do tří skupin, přičemž do první z nich se řadí nejvýznamnější zástupci GLUT1-4 (Navale AM. et Paranjape AN., 2016).

Objev glukozových transportérů byl prezentován poprvé v roce 1960 v Praze, a to americkým biochemikem Robertem Kelloggem Cranem (1919-2010) (**obr. 3a**) (Crane RK., 1960).

Craneův první náčrt struktury GLUT transportérů vznikl na ubrousku (**obr. 3b**) (Hamilton KL., 2013).



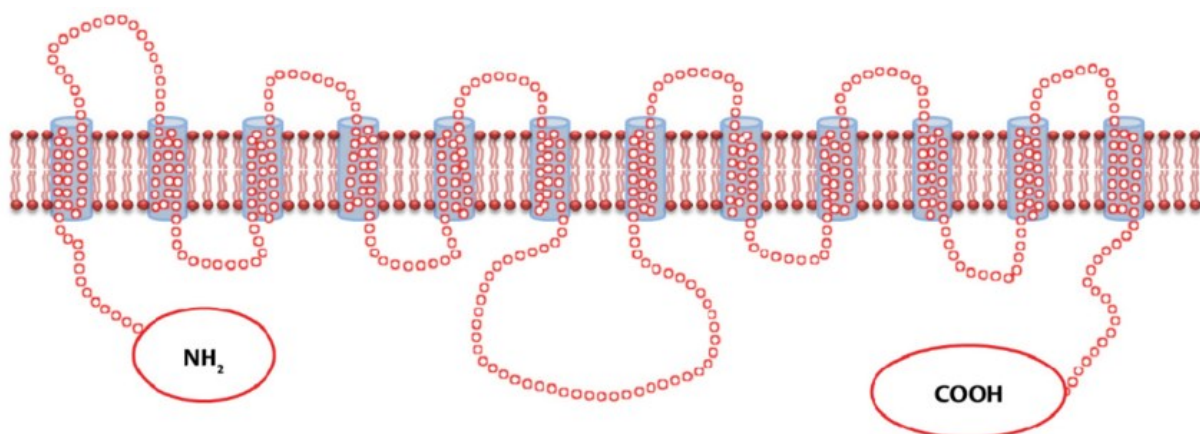
Obr. 3 – a) Robert Kellogg Crane (1919-2010), objevitel GLUT proteinů; b) První návrh podoby GLUT proteinů nakreslený na ubrousku.

Společným znakem GLUT proteinů je jejich terciární struktura, mají 12 transmembránových alfa-helikálních domén, N a C konec je nasměrován na cytoplazmatickou stranu buněčné membrány. Extracelulární a intracelulární část proteinů má vazebná místa pro vazbu glukózy, díky konformační změně proteinu dochází k vlastnímu přenosu glukózy.

3.2. Struktura a funkce proteinu GLUT-1

Glukozový transportér 1 (GLUT-1) patří do první skupiny glukozových transportérů. Jedná se o první z objevených glukozových transportérů. GLUT-1 je vysoce konzervovaným proteinem, je široce exprimován v celé řadě tkání (fetální tkáň, erytrocyty, hematoencefalická bariéra) (Galochkina T. et al., 2019).

Protein GLUT-1 je kódován genem SLC2A1 (Solute Carrier Family 2 Member 1), lokalizovaným na krátkém raménku chromozómu 1, v lokusu 1p34.2. Gen má 10 exonů, jeho proteinový produkt má molekulovou hmotnost 54,1 kDa a je složen z 492 aminokyselin. Protein neobsahuje signální sekvenci. Stejně jako ostatní GLUT proteiny, protein GLUT-1 má 12 transmembránových alfa-helikálních domén, každá je složena z 20 aminokyselin. N- a C-konec je nasměrován na cytoplazmatickou stranu plazmatické membrány (**obr. 4**). Krystalová struktura proteinu GLUT-1 byla poprvé publikována v roce 2014 v časopise Nature (Deng D. et al., 2014).



Obr. 4 – Dvourozměrný model proteinu GLUT-1 (podle Silva Filho TJ. et al., 2015).

Exprese proteinu GLUT-1 je silně spřažena s aktuální oxémií v buňce a množství exprimovaného proteinu je řízeno signální dráhou závislou na transkripčním faktoru HIF (hypoxií indukovaný faktor).

Za normálních podmínek, bez přítomnosti hypoxie, je hydroxylovaný protein HIF-1 alfa za pomoci ubikvitin-ligázy VHL (von Hippel Lindau) polyubikvitinován a následně degradován v proteazomu. V přítomnosti hypoxie dochází k útlumu degradace HIF alfa, protein přechází do jádra a jeho heterodimer s HIF-1 beta plní roli transkripčního faktoru nasednuvšího na promotor obsahující sekvenci HRE (hormon response element). Tímto mechanismem je nastartována transkripce dalších proteinů, mimo jiné proteinu GLUT-1 (Widmer DS. et al., 2013).

GLUT-1 hraje mnoho dalších rolí ve fungování organismu. Např. exprese GLUT-1 v endometriu napomáhá implantaci embrya pod vlivem estrogenu a progesteronu. Jelikož hyperglykémie při gestačním diabetu redukuje expresi GLUT-1, vede toto za overexpresi Bax k zániku plodu (von Wolff M. et al., 2003).

Exprese GLUT-1 je regulována basiginem (CD147) či serin-threoninovou kinázou Akt (Su J. et al., 2016; Barthel A. et al., 1999).

3.3. Význam GLUT-1 v imunohistochemii

Marker GLUT-1 je fyziologicky exprimován v membráně erytrocytů a v endotelu hematoencefalické bariéry, trofoblastu placenty, sítnice, ciliárního svalu či endoneuria periferních nervů (Pardridge WM. et al., 1990). Pozitivita v membráně erytrocytů bývá pravidelně silná a může být považována za vnitřní pozitivní kontrolu. Ač může pozitivitu vykazovat i cytoplazma buněk (pravděpodobně na vrub lysozomálním zásobám translatovaného proteinu), v praxi je hodnocena membránová imunohistochemická pozitivita. Overexprese GLUT-1 je známa u řady karcinomů, konkrétně urotelu, prsu, jícnu, tlustého střeva, pankreatobiliárního systému, ledviny, plic a vaječnicků (Němejcová K. et al., 2017). GLUT-1 je též ve většině případů pozitivní v nádorových buňkách kožního perineuriomu, což koresponduje s jeho fyziologickou expresí v perineurálních buňkách (Yamaguchi U. et al., 2003).

GLUT-1 je overexprimován i v řadě mezenchymálních nádorů. Pozitivita byla nalezena ve 100 % chordomů, v 63 % enkapsulovaných peritoneálních skleróz, ve 14 % gastrointestinálních stromálních tumorů (GIST), ve 40 % leiomyosarkomů, ve 27 % Ewingových sarkomů, ve 30 % synoviálních sarkomů a v 60 % nediferencovaných pleomorfních sarkomů (Ahrens WA. et al., 2008).

Známý je tzv. zonální efekt exprese v tumorózní tkáni (např. u tumorů endometria), při němž je exprese přímo závislá na vzdálenosti od stromatu (Němejcová K. et al., 2017). Tímto faktem

je potvrzen úzký vztah exprese GLUT-1 a současné hypoxie, která je očekávána v místech nejvzdálenějších od nádorového stromatu s obsahem novotvořených cév.

Svůj význam našel GLUT-1 v imunohistochemické analýze infantilních hemangiomů (Silva Filho TJ. et al., 2015). Infantilní hemangiomy (involuující i non-involuující) jsou pozitivní, na rozdíl od jiných vaskulárních malformací, kaposiformního hemangioendoteliomu či trsovitého (tufted) hemangiomu (van Vugt LJ. et al., 2017).

3.4. Historie výzkumu GLUT-1 u melanocytárních lézí

Literatura týkající se imunohistochemické analýzy proteinu GLUT-1 u melanocytárních lézí není příliš bohatá. Dosavadní studie byly provedeny na řádově několika desítkách vzorků.

Jedna z nejstarších studií analyzovala expresi GLUT-1 na 20 melanomech, z nichž všechny melanomy byly v průkazu GLUT-1 negativní (Baer SC. et al., 1997). V této studii byly zároveň studovány kožní dlaždicobuněčné neoplázie, z nichž drtivá většina vykazala pozitivní výsledek. Ve studii Parente P. et al. (2008) bylo studováno 12 melanocytárních névů, 12 névů Spitzové a 20 melanomů, z nichž všech 12 melanocytárních névů, 9 névů Spitzové a 9 melanomů bylo pozitivních v průkazu GLUT-1 (Parente P. et al., 2008).

Carvalho KC. et al. (2011) studoval expresi GLUT-1 na různých maligních tumorech včetně melanomu, všech 67 studovaných melanomů bylo v průkazu GLUT-1 negativních (Carvalho KC. et al., 2011).

Mihic-Probst D. et al. (2012) studovala expresi GLUT-1 v primárních melanomech a v metastázách s přihlédnutím k neoangiogenezi. Zjištěn byl signifikantní rozdíl mezi primárním tumorem a metastázou. V souboru metastáz melanomu bylo 45 ze 127 pozitivních v průkazu GLUT-1 minimálně v polovině hodnocených buněk. V souboru primárních melanomů bylo pozitivních pouze 6 ze 49 vzorků. Zaznamenána byla signifikantní inverzní korelace mezi denzitou krevních cév a expresí GLUT-1.

Slominski A. et al. (2014) analyzoval expresi GLUT-1 u 106 tkáňových vzorků benigních a maligních melanocytárních lézí od 84 pacientů. Membránovou pozitivitu vykazaly pouze melanomy, a to v 55 %. Cytoplazmatická pozitivita byla přítomna u benigních i maligních melanocytárních lézí, přičemž u maligních signifikantně převažovala.

Eichhoff OM. et al. (2010) publikoval imunohistochemickou studii u pacienta s metastazujícím melanomem. Za použití specifických markerů diferencoval tzv. proliferativní a invazivní fenotyp v primárním tumoru a v jeho metastáze. Proliferativní fenotyp vykazoval expresi Melan-A a MITF. Invazivní fenotyp vykazoval pozitivní Wnt5a a GLUT-1. Tento poznatek

potvrdil již dříve vyslovenou teorii o schopnosti přesmyku melanomových buněk mezi proliferativním a invazivním fenotypem, čímž je potencován maligní potenciál melanomu (Hoek KS. et al., 2008).

Expres GLUT-1 se též ukázala být ukazatelem kratšího TDT (tumor doubling time) u plicních metastáz melanomu (Lee JH. et al., 2009). U GLUT-1 pozitivních metastáz byl medián TDT pouze 56 dnů, v případě GLUT-1 negativních metastáz činil TDT 165 dní.

Expres GLUT-1 v melanomových buňkách byla též studována pomocí Western blotu (Wachsberger PR. et al., 2002). Analyzováno bylo 31 melanomů, u nichž byla provedena analýza aktivity hexokinázy a exprese GLUT-1. Zjištěna byla vysoká variabilita exprese GLUT-1, která nekorelovala s aktivitou hexokinázy.

Ve studii Parka SG. et al. (2012) byla korelována intenzita vychytávání FDG (fluorodeoxyglukózy) při vyšetření PET/CT a exprese GLUT-1. Tkáň 19 pacientů s provedeným vyšetřením PET/CT před léčbou byla podrobena imunohistochemické analýze GLUT-1. Zjištěna byla signifikantní korelace mezi intenzitou exprese GLUT-1 a intenzitou vychytávání FDG, čímž byla potvrzena role GLUT-1 v tzv. Warburgově efektu (viz výše).

4. Problematika tumor infiltrujících lymfocytů u melanomu

4.1. Obecný pohled na tumor infiltrující lymfocyty

Nádorové mikroprostředí je důležitým faktorem, který ovlivňuje chování maligního tumoru. V rámci něho dochází k interakci mezi fyziologickými buňkami hostitele a nádorovými buňkami. V této interakci hraje roli i zánětlivá celulizace, tedy TIL (tumor infiltrující lymfocyty).

Tumor infiltrující lymfocyty, tedy zánětlivá celulizace uvnitř a v bezprostřední blízkosti tumoru, se stávají důležitou součástí rutinního histopatologického hodnocení. Analýza TIL se ukazuje být důležitým prognostickým a prediktivním markerem.

Počátek výzkumu TIL sahá do roku 2006, kdy se zastoupením buněk imunitního systému začal zabývat Galon (Galon J. et al., 2006). Následně bylo vypracováno tzv. imunoskóre (zejména poměr CD3+ a CD8+ lymfocytů) uvnitř a na periférii tumoru. Tato hodnota se v některých případech ukázala z hlediska prognózy jako lepší klasifikační faktor než TNM klasifikace (Galon J. et al., 2014).

TIL hrají důležitou roli v protinádorové imunoterapii či v nových terapeutických možnostech (viz dále).

Imunoterapie mechanismem svého působení nelikviduje nádorové buňky přímo cytotoxickým působením, ale posiluje přesně definovaným molekulárně-biologickým mechanismem vlastní imunitní systém (inhibicí inhibičních kontrolních bodů imunity) a tím dochází k vlastní imunitně zprostředkované likvidaci tumoru. Odpověď na terapii imunoterapií a spektrum nežádoucích účinků se liší od jiných typů protinádorové léčby právě díky partikulárnímu efektu imunoterapie. U imunoterapie je známá existence opožděné odpovědi, která souvisí s dobou nutnou ke stimulaci imunitního systému. Tumor se může přechodně na zobrazovacích metodách zvětšit a tím budít dojem progresu, avšak jedná se ve skutečnosti pouze o tzv. pseudoprogresi, při níž je tumorózní masa infiltrována lymfocyty tvořící zvětšení objemu. Léčebné odpovědi imunoterapie jsou obvykle dlouhodobé a intenzita TIL může korelovat s odpovědí na léčbu na checkpoint inhibitory.

Kromě výše popsaného je využíváno znalostí o TIL ke zcela nové terapii, tzv. CAR T-cell therapy (CAR – Chimeric Antigen Receptor), tedy terapii geneticky modifikovanými T lymfocyty (Graham C. et al., 2018). Od pacienta jsou získány vlastní T lymfocyty z periferní krve. Tyto T lymfocyty jsou následně izolovány a reprogramovány (do DNA je vložen gen pro CAR), který je následně exprimován na plazmatické membráně. Geneticky modifikované T

lymfocyty jsou multiplikovány a jsou intravenózní cestou vráceny pacientovi. Tyto reprogramované buňky poté ničí na imunitním podkladě nádorové buňky.

Histopatologické hodnocení TIL je zatíženo nejednotností hodnotících algoritmů. TIL byly a jsou intenzivně studovány u karcinomu prsu, kolorektálního karcinomu či u melanomu. Studium TIL u jednotlivých nádorů je zatíženo různorodostí vzoru jejich růstu. Obecným pravidlem hodnocení zánětlivé reakce je hodnocení jen mononukleárního infiltrátu, nikoli polymorfonukleárního.

V případě melanomu jsou hodnoceny lymfocyty v těsné souvislosti s nádorovými buňkami, nejsou hodnoceny infiltráty v okolí či ve vzdáleném nádorovém stromatu. Obecným pravidlem je hodnocení pouze vertikální růstové fáze, nikoli horizontální. Oproti tomu např. u karcinomu prsu jsou dle některých postupů hodnoceny pouze stromální lymfocyty (Kos Z. et al., 2020).

4.2. TIL u melanomu

Stanovení TIL u melanomu (primárního i metastatického) se stává rutinní součástí histopatologického hodnocení. První studie zaměřená na nádorovou zánětlivou celulizaci pochází z roku 1981 (Day CL. et al., 1981).

Náležitosti úplného histopatologického reportování primárního melanomu jsou tedy: typ melanomu (klasická, případně nová nomenklatura dle WHO), šíře tumoru dle Breslowa v milimetrech, hodnota dle Clarka (nabývající hodnoty I – V dle hloubky invaze do struktur kůže), přítomnost ulcerace, mitotická aktivita, angioinvaze, přítomnost satelitů, regresivní změny, minimální lem zdravé tkáně a zánětlivá celulizace.

Na rozdíl od hodnocení TIL u karcinomu prsu se hodnotí u melanomu jak infiltrace nádorových čepů, tak přilehlého nádorového stromatu. Výhodou je možnost hodnocení z barvení v hematoxylinu a eozinu. Hodnocení TIL u melanomu je doporučováno prakticky všemi důležitými zapojenými institucemi (The Royal College of Pathologists, The Royal College of Pathologists of Australasia, College of American Pathologists).

Význam TIL jakožto prognostického a případně prediktivního markeru se prokázal v několika studiích na velkém počtu vyšetřovaných vzorků, statistická signifikance se však prokázala pouze při určitém naprahování. Vliv může mít též výběr vzorku, u nichž je jako nejzásadnějším faktorem šíře tumoru dle Breslowa a přítomnost ulcerace.

Na dosud největším studovaném vzorku 1865 melanomů (Azimi F. et al., 2012), u kterého bylo použito skórování dle MIA (Melanoma Institute Australia, viz dále), byla zjištěna korelace mezi stupněm intenzity infiltrace TIL a postižením SLN. Se vzrůstajícím stupněm infiltrace bylo

postižení sentinelových uzlin nižší. Studie však byla zatížena nerovnoměrným rozložením různých stupňů infiltrace TIL, grade 3 se např. nacházel pouze v několika jednotkách procent. Vyšetření SLN nebylo provedeno u všech pacientů.

Limitace reprodukovatelnosti hodnocení TIL se odvíjí od řady faktorů, na kterých je interakce mezi imunitním systémem hostitele a tumorem závislá. Ze strany hostitele se jedná zejména o celkový stav imunitního systému, přítomnost dalšího (např. hematologického) onemocnění, vrozenou dysfunkci imunitního systému, imunosupresivní léčbu, přítomnost autoimunitního onemocnění či stav mikrobiomu. Ze strany tumoru to jsou vlastnosti stromálního mikroprostředí, biologická povaha tumoru, tvorba neoantigenů apod. (Dundr P. et al., 2017).

4.3. Skórovací systémy hodnocení TIL u melanomu

Pro melanom bylo použito několik skórovacích systémů, z nichž nejznámější a též nejstarší je **hodnocení dle Clarka** (Clark WH. Jr. et al., 1989). Toto hodnocení je stále mezi histopatology nepopulárnější zejména pro svou jednoduchost a dobrou přenositelnost mezi odborníky, čímž je dosaženo vysoké interpersonální shody.

Zánětlivá celulizace je dle Clarka rozdělována do třech jednoduchých skupin – *absent*, *non-brisk*, *brisk*. Pokud se jedná o stupeň *absent*, v nádorových čepích nejsou přítomny prakticky žádné lymfocyty, mohou však být přítomny v okolí nádoru. V případě *non-brisk* infiltrace se jedná o přítomnost jednoho či několika fokusů nádorových lymfocytů ve vertikálně rostoucích nádorových čepích. Nádorové lymfocyty mohou být lokalizovány predominantně periferně (periferní *non-brisk*) či difúzně (difúzní *non-brisk*). Silnější infiltrace, ať už difúzní či na periférii vertikálně rostoucích čepů, je označována jako *brisk*.

Toto hodnocení je i přes svoji oblíbenost limitováno jistou subjektivitou. Validní zhodnocení je závislé na zkušenosti patologa, hodnocení nedefinuje absolutní počet lymfocytů, který je hodnocen. Další nevýhodou je poměrně velký rozdíl v absolutním počtu a rozložení lymfocytů v hodnocení velkých resekátů, kde může nastat signifikantní rozdíl v infiltraci v centru či na jeho periférii. Jakožto nejproblematičtější skupina se jeví stupeň *non-brisk*, jelikož v této skupině se objeví tumory s různou intenzitou a různým rozložením zánětlivého infiltrátu, což z výsledného hodnocení není zřejmé. Dalším problémem je omezená možnost komparace v hodnocení malého versus objemného tumoru. Z tohoto důvodu byly v některých studiích skupiny *absent* a *non-brisk* sloučeny.

Hodnocení podle **Melanoma Institute Australia** (MIA) z roku 2012 hodnotí TIL na čtyřstupňové škále (0–3) (Azimi F. et al., 2012). V každém stupni hodnotí dvě proměnné –

rozsah a denzitu infiltrátu. Rozsah infiltrátu může být fokální, multifokální či difúzní. Denzita infiltrátu může být mírná, střední či výrazná. Grade 0 značí naprostou absenci TIL. Hodnocení v ostatních gradech ukazuje **tab. 3**. Toto hodnocení oproti metodě dle Clarka přesněji semikvantitativně kvantifikuje denzitu a rozložení zánětlivého infiltrátu.

Grade	Rozsah	Denzita
0	žádný	žádná
1	fokální	mírná
	fokální	střední
	multifokální	mírná
2	fokální	výrazná
	multifokální	střední
	multifokální	výrazná
	difúzní	mírná
3	difúzní	střední
	difúzní	výrazná

Tab. 3 – Hodnocení dle rozsahu a denzity TIL v rámci algoritmu dle MIA (Azimi F. et al., 2012)

Hodnocení dle Saldanhy zohledňuje pouze rozsah infiltrace nádorovými lymfocyty, nezohledňuje její denzitu. Hodnocení je procentuální se zaokrouhlením na celé desítky (tzn. 10 %, 20 % atd.). V případě téměř negativní a téměř stoprocentní infiltrace je povoleno užívání 5 % a 95 % (Saldanha G. et al., 2017). Systém nehodnotí peritumorální infiltraci TIL. Vzhledem k tomu, že systém hodnotí pouze procentuální rozsah, nerozlišuje tedy rozložení infiltrátu (periferní, centrální, fokální, multifokální atd.), což se může jevit jako nevýhoda systému. Avšak v porovnání s Clarkovou metodou bude mít velký tumor se silnou periferní infiltrací TIL poměrně nízké hodnocení podle Saldanhy, což jej činí lepším obrazem skutečnosti.

Hodnocení dle Parka, které bylo použito ve studii TCGA (The Cancer Genome Atlas), se odlišuje od ostatních tím, že hodnotí 2 kompartmenty – vlastní tumor (nádorové čepy a nádorové stroma) a okolí nádoru. V každém kompartmentu hodnotí distribuci a denzitu na čtyřstupňové škále, kterou udává **tab. 4** (Park CK. et al., 2017).

Grade	Distribuce (% infiltrované nádorové tkáně)	Denzita
0	0	žádná
1	< 25 %	mírná
2	25 - 50 %	střední
3	> 50 %	výrazná

Tab. 4 – Škála pro hodnocení TIL dle Parka (Park CK. et al., 2017).

Hodnocení dle **International Immuno-Oncology Biomarker Working Group (IIOBWG)** vychází z hodnocení TIL u karcinomu prsu (Hendry S. et al., 2017). Toto hodnocení bylo vytvořeno i stejnou pracovní skupinou. Při tomto hodnocení se hodnotí pouze invazivní tumor, a to zvlášť nádorové struktury a zvlášť nádorové stroma. Toto hodnocení dokonce rozlišuje tzv. invazivní okraj a centrální část invazivního tumoru. Invazivní okraj je definován jako zóna na periferii nádoru zaujímající 0,5 mm nádorového čepu a 0,5 mm přilehlého stromatu, celkově tedy 1 mm široký lem.

ČÁST VÝZKUMNÁ

5. Analýza exprese GLUT-1 u melanocytárních lézí

5.1. Cíle a hypotézy

Cílem této studie byla imunohistochemická analýza exprese proteinu GLUT-1 u benigních a maligních melanocytárních lézí a její korelace s prognózou onemocnění. Cílem bylo provést analýzu na 400 vzorcích, čímž se jedná o dosud největší imunohistochemickou analýzu proteinu GLUT-1 u melanocytárních lézí.

Prognóza melanomu byla u každého pacienta hodnocena třemi ukazateli – specifické přežití (DSS), přežití bez lokálního relapsu (RFS) a přežití bez vzdálených metastáz (MFS).

Byly vysloveny 2 hypotézy:

- **Expres proteinu GLUT-1 se liší u benigních a maligních melanocytárních lézí.**
- **Expres proteinu GLUT-1 koreluje s prognózou kožního melanomu.**

5.2. Materiál a metody

Pro analýzu bylo vybráno celkově 400 FFPE (formalin-fixed paraffin-embedded) melanocytárních lézí, z nichž bylo 225 primárních kožních melanomů všech stádií (viz dále). Zbytek (175) vzorků byl tvořen melanocytárními névy, z nichž 89 bylo smíšených, 83 intradermálních, 3 byly jiného typu (junkční, modrý, kombinovaný). Jiné typy melanocytárních névů (dysplastické, DPN, kongenitální atd.) a melanocytární léze nejisté biologické povahy do studie nebyly zařazeny.

Melanomy byly excidovány na I. chirurgické klinice VFN a 1. LF UK a jejich zpracování proběhlo na Ústavu patologie VFN a 1. LF UK v období let 2006 až 2010.

Melanocytární névy byly excidovány na Dermatovenerologické klinice VFN a 1. LF UK v období let 2012-2014, zpracovány byly v tamní dermatohistopatologické laboratoři.

Melanomy byly rozděleny do 4 skupin dle (v průběhu studie platné) TNM klasifikace 7. vydání dle AJCC (pT1 \leq 1 mm, pT2 > 1–2 mm, pT3 > 2–4 mm, pT4 > 4 mm). Dále byly rozděleny dle jejich lokality na 4 skupiny – hlava a krk (35 případů, z toho jeden byl konjunktivální melanom, 2 případy pocházely z krku, 2 případy pocházely z ušního boltce), horní končetina včetně

ramene (42 případů), dolní končetina včetně kyčle (37 případů) a 111 případů bylo lokalizováno na trupu. U všech melanomů byla evidována přítomnost ulcerace (přítomna vs. nepřítomna).

U všech pacientů s excidovaným melanomem zařazených do studie byl sledován follow-up. Zjišťováno bylo specifické přežití (DSS), přežití bez lokálního relapsu (RFS) a přežití bez vzdálených metastáz (MFS). Tyto informace byly zjištěny z dokumentace Dermatovenerologické kliniky I.LF a UK, kam pacienti docházeli na další kontroly.

Průměrný věk pacientů s melanomem byl 63 let (medián 65 let, od 15 do 93 let). Průměrný věk pacientů s excidovanými névy byl 36 let (medián 35 let, od 5 do 79 let). Ve skupině melanomů bylo zastoupeno 134 mužů a 91 žen, ve skupině névů bylo zastoupeno 50 mužů a 125 žen.

Výzkum probíhal v souladu s Helsinskou deklarací a výzkum byl schválen Etickou komisí VFN.

K manuální imunohistochemické analýze metodou ABC (avidin-biotin complex) byla použita validovaná protilátka Glut-1 (polyklonální, 1:100, Cell Marque, Rocklin, California). Odhalení antigenu byl provedeno užitím 0,01 molárního citrátového pufru (pH 9,0) po 40 min. ve vodní lázni při 98°C.

Pro imunohistochemickou vizualizaci byla využita reakce za vniku DAB (diaminobenzidin), čili hnědé koncovky, jejíž imunohistochemická pozitivita má srovnatelný odstín hnědé jako intracelulární pigment nádorových buněk. Jejich rozložení však není zcela identické. IHC pozitivita je difuzní či jemně granulární, melanozomy a hrudky pigmentu tvoří objemná hrubá granula.

Vyřazeny však přes to byly vysoce pigmentované melanomy včetně tzv. „animal type“ melanomů, které by mohly znemožnit validní imunohistochemické vyšetření s použitím klasického imunohistochemického vizualizování využívající reakci DAB.

Pozitivní vnitřní kontrolou byly erytrocyty, perineurium a keratinocyty bazální epidermis, které byly hodnoceny u každého jednotlivého případu. Vnitřní negativní kontrolou byly kolagenní snopce, tuková tkáň, buňky hladkého svalů.

Vzhledem k pozitivitě exprese GLUT-1 střední až silné intenzity v bazálních buňkách epidermis bylo hodnocení lentiginózně a pagetoidně rozmístěných melanocytů ztíženo. Pozitivitu GLUT-1 bylo však možno hodnotit v junkčních melanocytárních hnízdech.

Nehodnotitelné byly nekrotické oblasti tumoru, v těchto lokalitách dochází k falešné pozitivitě nádorových buněk.

Odečet byl proveden dvěma nezávislými hodnotiteli, sporné a nejednoznačné případy byly diskutovány s třetím patologem. Hodnocena byla pouze membránová pozitivita.

K semikvantitativnímu zhodnocení bylo využito H-skóre. *H-skóre* hodnotí imunohistochemickou pozitivitu na 4-stupňové škále (0 – žádná, 1 – slabá, 2 – střední, 3 – silná) a zároveň procento pozitivních buněk (0-100 %). Výsledné H-skóre je výsledkem následující formule a nabývá hodnot 0 až 300.

$$\text{H skóre} = [1 \times (\% \text{ buněk } 1+) + 2 \times (\% \text{ buněk } 2+) + 3 \times (\% \text{ buněk } 3+)].$$

Za pozitivní byl vzorek považován tehdy, bylo-li H-skóre membránové imunohistochemické positivity minimálně 15. Při této hodnotě byla nalezena nejvyšší specificita a sensitivita.

5.3. Výsledky a diskuse

Membránová pozitivita GLUT-1 byla nalezena v 69 z 225 případů (30,7 %) melanomů. Exprese GLUT-1 se zvyšovala se zvyšující se hodnotou dle Breslowa ($p < 0,00001$). Pozitivita GLUT-1 byla pozorována u 10 ze 101 melanomů stádia pT1 (10 %, medián H-skóre pro pozitivní případy byl 30,5; průměr 47); u 17 z 47 melanomů stádia pT2 (36 %, medián H-skóre pro pozitivní případy byl 48; průměr 53,2); u 16 z 44 melanomů stádia pT3 (36,4 %, medián H-skóre pro pozitivní případy byl 34,5; průměr 41,5) a u 26 z 33 melanomů stádia pT4 (78,8 %, medián H-skóre pro pozitivní případy byl 67,5; průměr 82,9).

V některých případech byl u melanomů (zejména pokročilých, stádia pT4) pozorován vyjádřený zonální efekt, kdy se síla exprese zvyšovala se vzdáleností od nádorového stromatu (ať už od neovaskularizovaného nádorového stromatu či od invazivního marginálního stromatu). Ve velké části případů byla však exprese rozložena heterogenně, bez viditelné závislosti na vzdálenosti od stromatu či od okrsků nekrózy (**příloha 4**).

Ve skupině melanocytárních névů vykazalo všech 175 případů negativní membránovou expresi GLUT-1 (exprese GLUT-1 s mediánem H-skóre pouze 2 byla nalezena u 24 z 175 případů melanocytárních névů, tzn. 13,7 %).

Ve studii nebyla nalezena signifikantní souvislost mezi silou exprese GLUT-1 a pohlavím, věkem pacientů a lokalitou tumoru ($p > 0,05$).

U pacientů byla též hodnocena závislost exprese GLUT-1 na prognóze onemocnění. Na základě multivariantní analýzy bylo potvrzeno, že šíře tumoru dle Breslowa je nejsilnějším prognostickým faktorem.

H-skóre exprese GLUT-1 se ukázalo být statisticky signifikantním markerem v univariantní analýze, v níž zvýšená membránová exprese GLUT-1 koreluje s horším desetiletým

specifickým přežitím pacientů (DSS, $p = 0.00734$; 24 pacientů zemřelo z důvodu progresu melanomu); koreluje s horším desetiletým přežíváním bez lokálního relapsu (RFS, $p = 0.00003$; 36 pacientů vyvinulo lokální recidivu) a též koreluje s kratším přežitím bez vzdálených metastáz (MFS, $p = 0.00050$; 41 pacientů vyvinulo vzdálené metastázy) (**příloha 5**).

Na základě výše popsaného byly potvrzeny obě hypotézy. Byl potvrzen signifikantní rozdíl v expresi GLUT-1 u benigních a maligních melanocytárních lézí, přičemž dle našich výsledků prakticky není GLUT-1 u benigních lézí imunohistochemicky detekovatelný. Exprese proteinu GLUT-1 signifikantně koreluje s prognózou onemocnění, přičemž vyšší exprese GLUT-1 koreluje s horší prognózou kožního melanomu.

6. Porovnání 5 různých skórovacích systémů hodnocení TIL u melanomu

6.1. Cíle a hypotézy

Cílem této studie bylo porovnání pěti různých skórovacích systémů hodnocení TIL u kožního melanomu a jeho korelace s prognózou onemocnění. Jednalo se o následující skórovací systémy:

- hodnocení dle Clarka (Clark WH. Jr. et al., 1989)
- hodnocení dle Melanoma Institute Australia (MIA) (Azimi F. et al., 2012)
- hodnocení dle Saldanhy (Saldanha G. et al., 2017)
- hodnocení dle Parka ze studie TCGA (Park CK. et al., 2017)
- hodnocení dle International Immuno-Oncology Biomarker Working Group (IIOBWG) (Hendry S. et al., 2017).

V této studii byla vyslovena následující hypotéza:

- **Výsledek výše jmenovaných skórovacích systémů hodnocení TIL u kožního melanomu koreluje s jeho prognózou.**

6.2. Materiál a metody

K analýze bylo použito celkově 213 FFPE (formalin-fixed paraffin-embedded) vzorků kožních melanomů, zahrnuty byly superficiálně se šířící a nodulární melanomy.

Veškerý bioptický materiál byl získán z archivu Ústavu patologie 1. LF UK a VFN. Pro samotné hodnocení bylo použito základní barvení HE. Vzácnější typy melanomů (např. akrolentiginózní či desmoplastické melanomy) byly ze souboru vyloučeny. U všech pacientů byly sledovány prognostické faktory (viz dále).

Výzkum probíhal v souladu s Helsinskou deklarací a byl schválen Etickou komisí VFN.

Tumor infiltrující lymfocyty byly hodnoceny dvěma nezávislými zkušenými patology. Nejednoznačné vzorky byly reevaluovány, aby bylo dosaženo konsenzu.

Použito bylo 5 různých skórovacích systémů: hodnocení dle Clarka (Clark WH. Jr. et al., 1989), hodnocení dle Melanoma Institute Australia (MIA) (Azimi F. et al., 2012), hodnocení dle

Saldanhy (Saldanha G. et al., 2017), hodnocení dle Parka ze studie TCGA (Park CK. et al., 2017) a hodnocení dle International Immuno-Oncology Biomarker Working Group (IIOBWG) (Hendry S. et al., 2017).

Pro hodnocení bylo stanoveno několik premis. Hodnoceny byly pouze kulatobuněčné zánětlivé elementy, nebyly hodnoceny polymorfonukleární leukocyty. Byla hodnocena pouze zánětlivá lymfocytární celulizace, která přímo infiltrovala hnízda nádorových buněk či byla v jejich bezprostředním kontaktu, nebyla hodnocena infiltrace v okolí nádorových buněk či v nádorovém stromatu. Hodnocena byla pouze oblast vertikální růstové fáze nádoru, nikoli horizontální růstové fáze (**příloha 6**).

Z prognostických ukazatelů byly hodnoceny tři parametry – DFS (disease free survival), LFS (local recurrence free survival), DMFS (distant metastasis free survival).

Ke statistickému hodnocení byl použit software Statistica 10 (StatSoft, Tulsa, Oklahoma, USA) za využití univariální analýzy a konstrukce Kaplan-Meierových křivek. Statistické zhodnocení bylo provedeno pro každý skórovací systém zvlášť.

Kromě algoritmu IIOBWG byly ostatní 4 skórovací systémy hodnoceny u všech 213 případů primárních kožních melanomů. Algoritmus IIOBWG mohl být hodnocen pouze u 156 melanomů, jelikož pouze u 156 melanomů byla šíře dle Breslowa dostatečná k validnímu odečtu.

6.3. Výsledky a diskuse

Medián šíře melanomu dle Breslowa byl 2,05 mm a jeho střední hodnota činila 2,94 mm. Regresivní změny byly přítomny u 59 melanomů (27 %).

Statistická signifikance byla nalezena u skórovacího systému dle Clarka (Kappa index = 0.98; $p < 0.001$), dle Saldanhy (Kappa index = 0.99; $p < 0.001$), dle Parka (Kappa index = 0.97 pro peritumorální celulizaci a 1,00 pro intratumorální celulizaci; $p < 0.001$), dle IIOBWG (Kappa index = 0.88 v hodnocení infiltrace invazivního okraje; $p < 0.001$). Dobrá shoda byla nalezena i u hodnocení dle IIOBWG pro hodnocení infiltrace invazivního stromatu (Kappa index = 0.76; $p < 0.001$) a infiltrace invazivních nádorových buněk (Kappa index = 0.69; $p < 0.001$).

Prognostický význam v hodnocení TIL dle Clarka (skóre 0 + 1, vs. 2), hodnocení dle MIA (skupiny 0, 1, 2, 3) a IIOBWG (hodnocení infiltrace stromální komponenty ve skupinách 0, 1, 2) byl v těchto algoritmech statisticky signifikantní v univariální analýze ve všech třech sledovaných prognostických faktorech (DFS, LFS, DMFS) (**příloha 7**).

V analýze hodnocení dle Saldanhy (pro skupiny 0, 1, 2) a hodnocení dle Parka (s hodnocením intratumorální a peritumorální infiltrace) nebyla nalezena žádná statistická signifikance pro žádný z prognostických faktorů (DFS, LFS, DMFS).

Skórovací systém IIOBWG v hodnocení intratumorální komponenty a invazivních okrajů taktéž nebyl statisticky signifikantní.

Závěrem shrnuto, prognostický význam byl statisticky signifikantní u některých proměnných u hodnocení dle Clarka, hodnocení dle MIA a hodnocení dle International Immuno-Oncology Biomarker Working Group (IIOBWG). Ve zbylých skórovacích systémech nebyl nalezen statisticky signifikantní význam ve vztahu k prognóze onemocnění. Tímto faktem byla částečně potvrzena úvodem vyslovená hypotéza.

7. Závěr

Cílem této disertační práce bylo v obecné rovině shrnout současný pohled na problematiku epidemiologie, diagnostiky, prevence a terapie časných a pozdních stádií melanomu s důrazem na moderní nechirurgické modalitiny léčby. Zároveň měla práce za cíl stručně shrnout úskalí histopatologické diagnostiky melanocytárních lézí s přihlédnutím k pomocným imunohistochemickým a molekulárně-genetickým markerům.

V souvislosti s výzkumnou částí byla shrnuta struktura a funkce proteinu GLUT-1 a jeho role v imunohistochemii, dále pak problematika tumor infiltrujících lymfocytů u melanomu včetně přehledu skórovacích systémů.

Výzkumná část byla zaměřena na imunohistochemickou analýzu proteinu GLUT-1 u benigních a maligních melanocytárních lézí a na porovnání 5 různých skórovacích systémů TIL u melanomu jakožto potenciálního prognostického markeru.

Zjištěna byla statisticky signifikantní exprese GLUT-1 u melanomu, exprese nebyla detekována u žádného melanocytárního névu. Exprese GLUT-1 u melanomu se též ukázala být statisticky signifikantním prognostickým markerem. U některých melanomů vyšší hodnoty dle Breslawa byl identifikován známý zonální efekt exprese se vzrůstající vzdáleností od nádorového stromatu.

Analýza porovnání různých skórovacích systémů pro hodnocení TIL vykazala statistickou signifikanci jakožto prognostického markeru pouze u 3 z 5 hodnocených skórovacích systémů (dle Clarka, dle MIA a dle International Immuno-Oncology Biomarker Working Group – IIOBWG). Hodnoceny byly tři faktory – DFS (disease free survival), LFS (local recurrence free survival), DMFS (distant metastasis free survival).

Základem histopatologického hodnocení melanocytární léze je barvení HE. Doplňující vyšetření přidávají validitu konečné histopatologické diagnózy. Finální diagnóza je stanovena na základě klinicko-patologické korelace, v níž hraje roli klinický a dermatoskopický obraz dané léze, anamnéza atd.

Léčba metastazujícího melanomu prožívá v posledních letech svůj „zlatý věk“, v němž dochází k neustálému prodlužování celkového přežití. Do klinické praxe přichází řada nových léčiv na bázi protinádorové imunoterapie či malých molekul inhibujících signální kaskádu Ras. Léčba s sebou přináší nebývalé léčebné odpovědi, které byly v éře chemoterapie jen těžko představitelné. Léčba s sebou přináší i zcela nové obzory nepoznaných nežádoucích účinnů.

Současná doba zlepšující se včasné diagnostiky melanomu včetně dermatoskopie, současný rozvoj účinné protinádorové terapie v kombinaci se zpřesňující se histopatologickou diagnostikou otevírá nevídané obzory onkologické péče.

8. Přílohy

Příloha 1

Patologický staging melanomu na základě 8. vydání TNM klasifikace dle AJCC

(zdroj: www.cancerstaging.org)

T	Breslow (mm)	ulcerace
pTis	NA	NA
T1a	< 0,8	ne
T1b	> 0,8	ano
T1b	0,8 - 1,0	ano/ne
T2a	1,1 - 2,0	ne
T2b	1,1 - 2,0	ano
T3a	2,1 - 4,0	ne
T3b	2,1 - 4,0	ano
T4a	> 4,0	ne
T4b	> 4,0	ano

N	klinicky okultní metastáza	klinicky detekovatelná metastáza	intranzitní, satelitní metastáza
N1a	1	0	ne
N1b	0	1	ne
N1c	0	0	ano
N2a	2–3	0	ne
N2b	2–3, z nich ≥ 1 detekovatelná		ne
N2c	1 okultní nebo 1 detekovatelná		ano
N3a	≥ 4	0	ne
N3b	≥ 4 , z nich ≥ 1 detekovatelná nebo spečené uzliny		ne
N3c	≥ 2 okultní nebo ≥ 2 detekovatelné nebo spečené uzliny		ano

M	lokalizace	hladina LDH
M0	NA	NA
M1	vzdálené metastázy	NA
M1a	meta do kůže, měkkých tkání, vzdálených uzlin	nezjištěno
M1a (0)	dtto	nezvýšena
M1a (1)	dtto	zvýšena
M1b	meta do plic s/bez M1a	nezjištěno
M1b (0)	dtto	nezvýšena
M1b (1)	dtto	zvýšena
M1c	meta do viscerálních orgánů (kromě CNS) s/bez M1a, M1b	nezjištěno
M1c (0)	dtto	nezvýšena
M1c (1)	dtto	zvýšena
M1d	meta do CNS s/bez M1a, M1b, M1c	nezjištěno
M1d (0)	dtto	nezvýšena
M1d (1)	dtto	zvýšena

Příloha 2

Klinický staging melanomu na základně 8. vydání TNM klasifikace dle AJCC

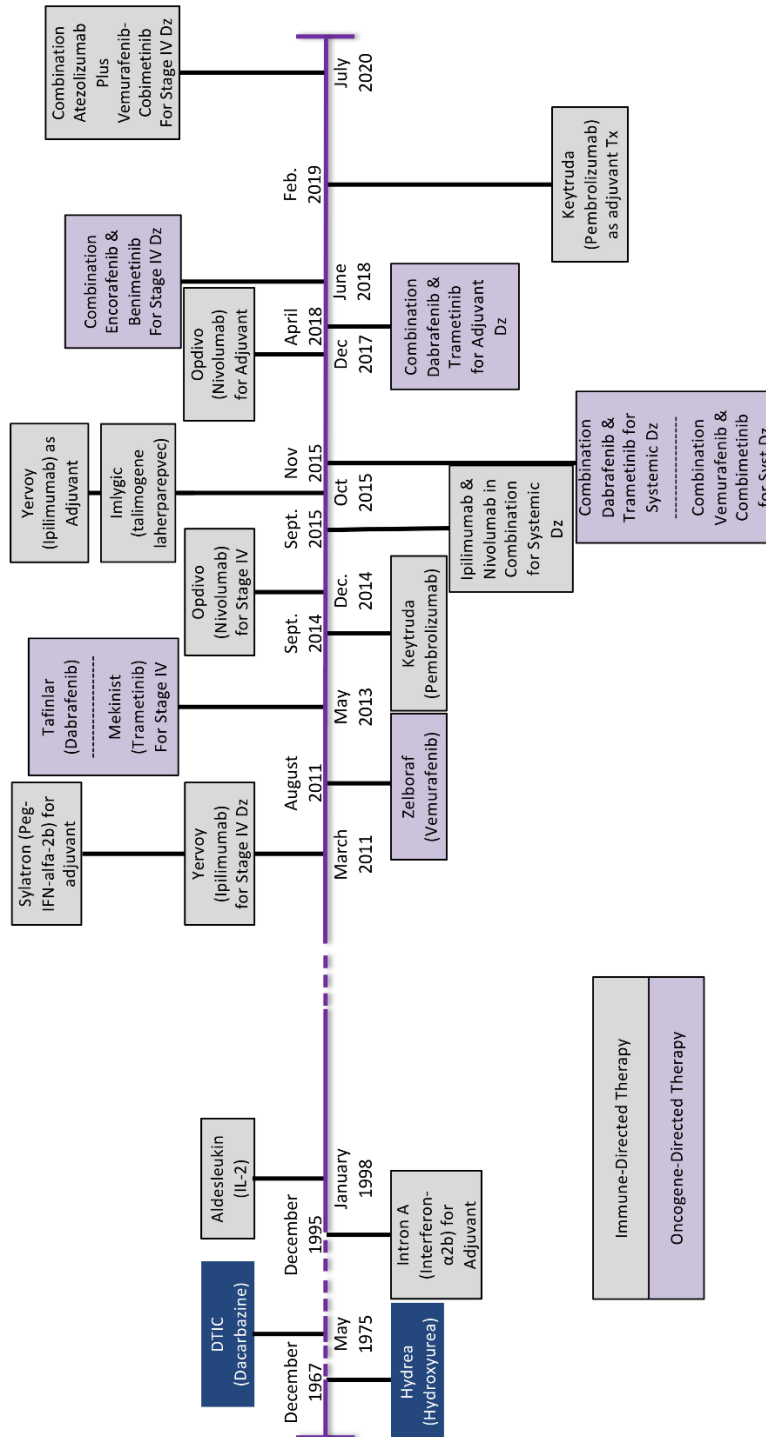
(zdroj: www.cancerstaging.org)

Stádium	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1a/T1b	N0	M0
IB	T2a	N0	M0
IIA	T2b/T3a	N0	M0
IIB	T3b/T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1a/T1b/T2a	N1a/N2a	M0
IIIB	T0	N1b/N1c	M0
IIIB	T1a/T1b/T2a	N1b/N1c/N2b	M0
IIIB	T2b/T3a	N1a-N2b	M0
IIIC	T0	N2b-c/N3b-c	M0
IIIC	T1a-T3a	N2c/N3a-c	M0
IIIC	T3b/T4a	≥ N1	M0
IIIC	T4b	N1a-N2c	M0
IIID	T4b	N3a-c	M0
IV	jakékoli T	jakékoli N	M1

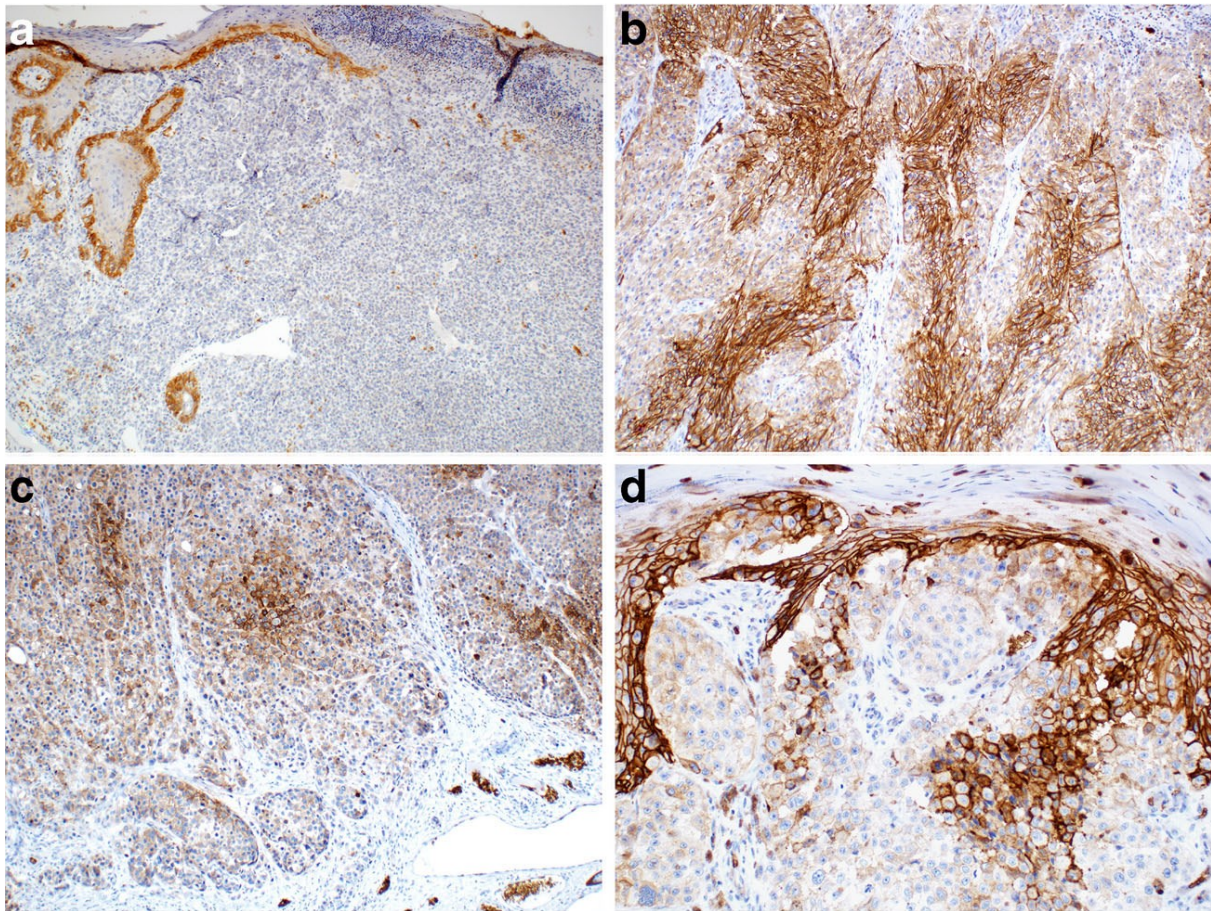
Příloha 3

Časová osa terapeutických možností metastazujícího melanomu, které byly schváleny FDA

(zdroj: <https://www.themillerlab.io>)



Příloha 4

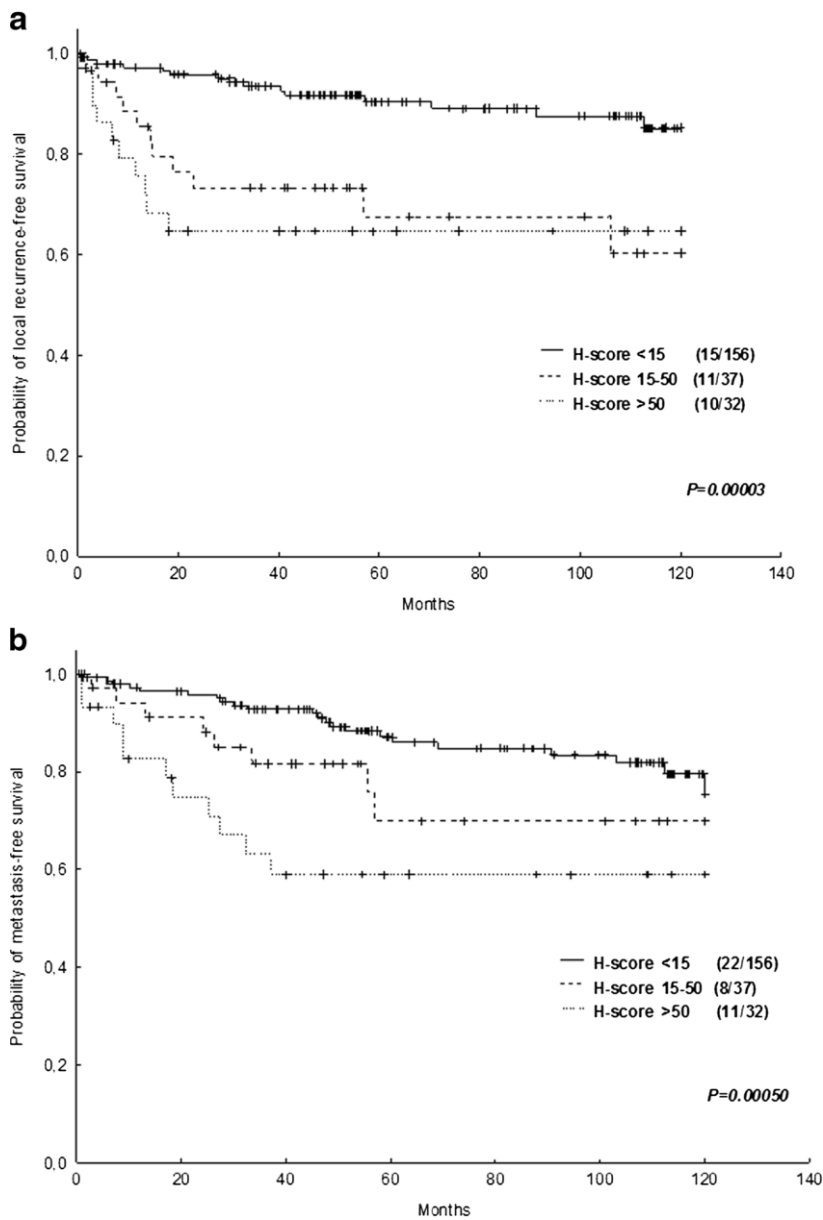


Reprezentativní příklady imunohistochemického hodnocení exprese GLUT-1.

a – kompletní negativita exprese v melanomových buňkách (vnitřní pozitivní kontrolu tvoří membrána erytrocytů a bazální keratinocyty); **b, c** – silná membránová pozitivita v melanomových buňkách (v obou případech je vyjádřena zonalita exprese v závislosti na vzdálenosti od nádorového stromatu); **d** – slabá membránová pozitivita v některých melanomových buňkách (vnitřní pozitivní kontrolou jsou bazální keratinocyty, které vykazují silnou pozitivitu). Zvětšení 100x (a-c), 200x (d).

Zdroj: Důra M, Němejcová K, Jakša R, Bártů M, Kodet O, Tichá I, Michálková R, Dundr P. Expression of Glut-1 in malignant melanoma and melanocytic nevi: an immunohistochemical study of 400 cases. *Pathol Oncol Res.* 2019;25(1):361-368.

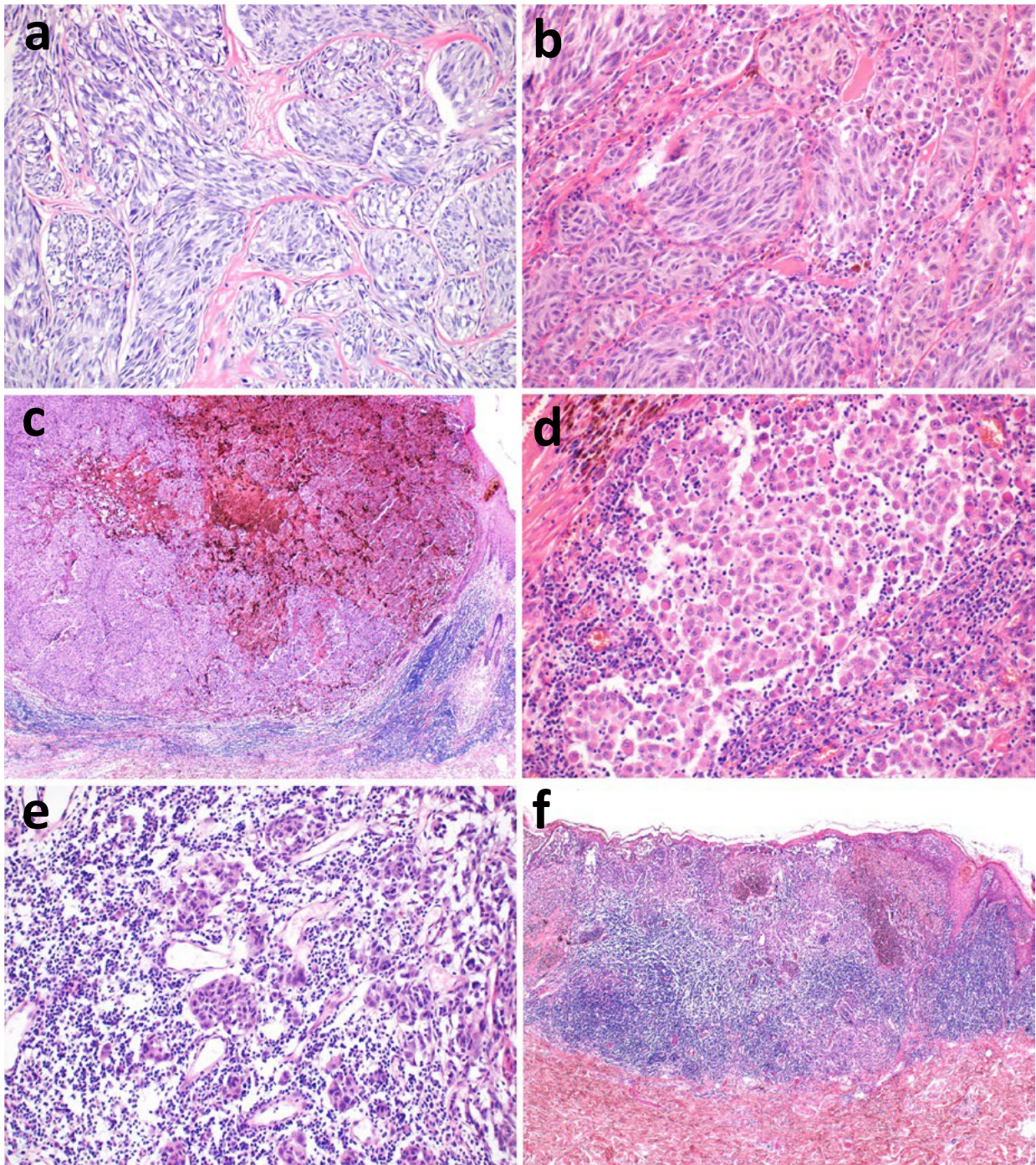
Příloha 5



Silnější membránová exprese GLUT-1 hodnocená na základě H-skóre je spojena s vyšším rizikem lokální rekurence (**a**) a vyšším rizikem vzniku vzdálených metastáz (**b**), což dokládají Kaplan-Meierovy křivky.

Zdroj: Důra M, Němejcová K, Jakša R, Bártů M, Kodet O, Tichá I, Michálková R, Dundr P. Expression of Glut-1 in malignant melanoma and melanocytic nevi: an immunohistochemical study of 400 cases. *Pathol Oncol Res.* 2019;25(1):361-368.

Příloha 6



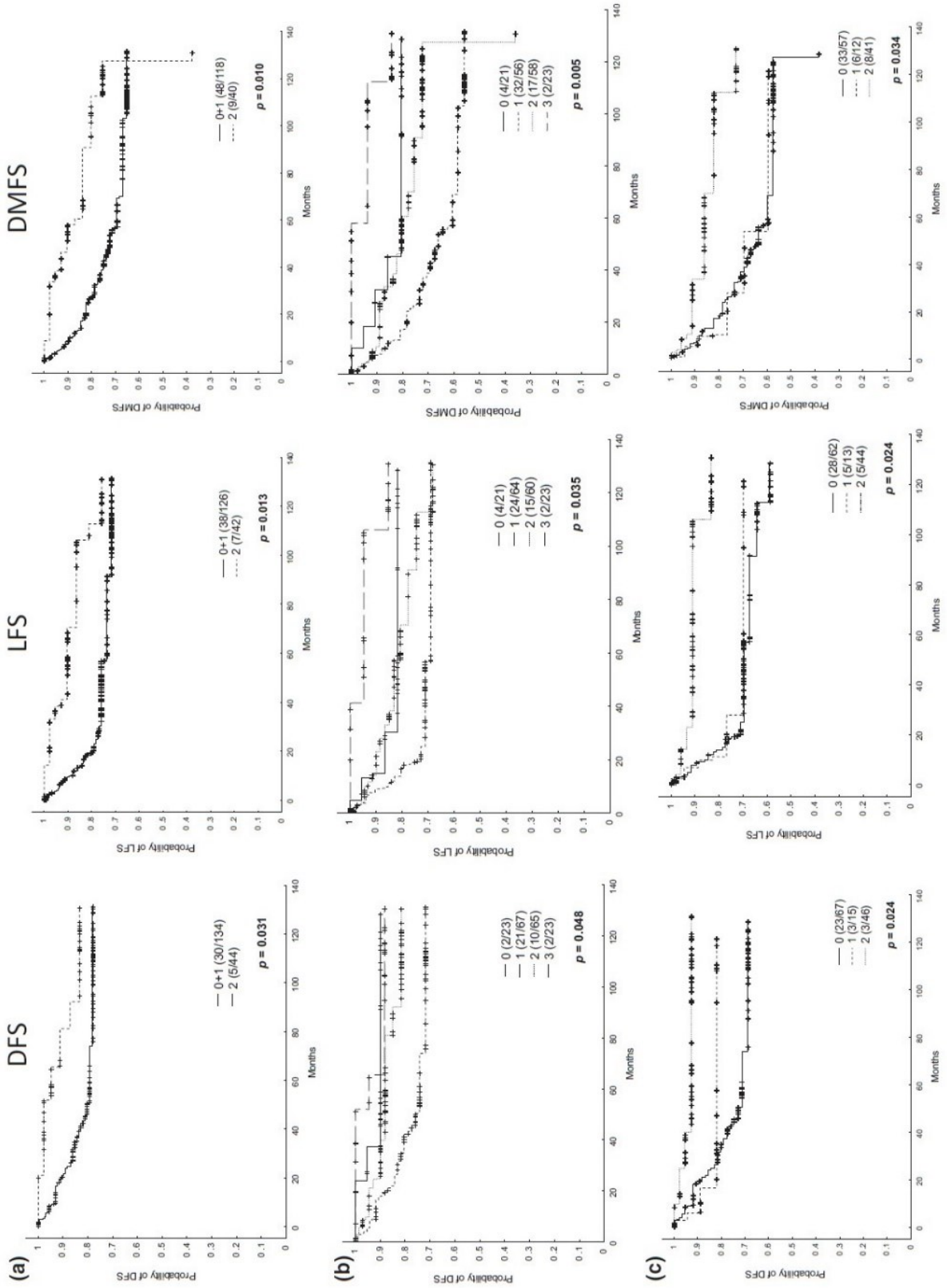
Spektrum zánětlivého infiltrátu u různých případů melanomu.

a) kompletní absence zánětlivého infiltrátu (HE, 100x); **b)** nečetné lymfocyty lokalizované převážně v nádorovém stromatu, jednotlivé lymfocyty pronikají i do nádorových hnízd (HE, 100x); **c)** nodulární melanom se silnou zánětlivou celulizací na periferii tumoru, avšak s kompletní absencí lymfocytů uvnitř tumoru včetně nádorového stromatu (HE, 40x); **d)**

výrazná zánětlivá celulizace nádorového stromatu s přítomností rozptýlených lymfocytů v nádorových hnízdech (HE, 200x); **e**) výrazná zánětlivá celulizace nádorového stromatu s přítomností zcela ojedinělých lymfocytů v nádorových hnízdech (HE, 100x); **f**) výrazná zánětlivá celulizace ve všech kompartmentech – nádorovém stromatu, nádorových hnízdech i v peritumorální oblasti včetně tzv. invazivního okraje (HE, 20x).

Zdroj: Němejcová K, Tichá I, Bártů M, Kodet O, Důra M, Jakša R, Michálková R, Dundr P. Comparison of five different scoring methods in the evaluation of inflammatory infiltration (tumor-infiltrating lymphocytes) in superficial spreading and nodular melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2019;32(3):412-423.

Příloha 7



Korelace prognózy melanomu a infiltrace TIL. Reprezentativní Kaplan-Meierovy křivky znázorňují přežití bez nemoci (disease free survival, DFS), přežití bez lokálního relapsu (local recurrence free survival, LFS) a přežití bez vzdálených metastáz (distant metastasis free survival, DMFS) u tří skórovacích systémů:

- a) hodnocení dle Clarka (skupiny 0 + 1 versus skupina 2)
- b) hodnocení dle MIA (skupina 0, 1, 2, 3)
- c) hodnocení dle IIOBWG (skupina 0, 1, 2).

Zdroj: Němejcová K, Tichá I, Bártů M, Kodet O, Důra M, Jakša R, Michálková R, Dundr P. Comparison of five different scoring methods in the evaluation of inflammatory infiltration (tumor-infiltrating lymphocytes) in superficial spreading and nodular melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2019;32(3):412-423.

Příloha 8

Publikace doktoranda s IF *in extenso*, které jsou podkladem disertační práce

Důra M, Němejcová K, Jakša R, Bártů M, Kodet O, Tichá I, Michálková R, Dundr P. Expression of Glut-1 in malignant melanoma and melanocytic nevi: an immunohistochemical study of 400 cases. *Pathol Oncol Res.* 2019 Jan;25(1):361-368. doi: 10.1007/s12253-017-0363-7. Epub 2017 Nov 11. PMID: 29128957. **IF – 2,701**

Němejcová K, Tichá I, Bártů M, Kodet O, Důra M, Jakša R, Michálková R, Dundr P. Comparison of five different scoring methods in the evaluation of inflammatory infiltration (tumor-infiltrating lymphocytes) in superficial spreading and nodular melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2019 May;32(3):412-423. doi: 10.1111/pcmr.12757. Epub 2018 Dec 21. PMID: 30506645. **IF – 3,704**

Příloha 9

Seznam obrázků, grafů a tabulek

Obr. 1 – Celosvětová incidence kožního melanomu (hodnoty jsou uvedeny na 100 000 obyvatel) (Matthews NH. et al., 2017).

Obr. 2 – Celosvětová mortalita kožního melanomu (hodnoty jsou uvedeny na 100 000 obyvatel) (Matthews NH. et al., 2017).

Obr. 3 – **a)** Robert Kellogg Crane (1919-2010), objevitel GLUT proteinů; **b)** První návrh podoby GLUT proteinů nakreslený na ubrousku.

Obr. 4 – Dvourozměrný model proteinu GLUT-1 (podle Silva Filho TJ. et al., 2015)

Graf 1 – Časový vývoj incidence a mortality na melanom kůže od roku 1977 (zdroj: www.svod.cz).

Graf 2 – Časový vývoj hrubé incidence melanomu kůže dle pohlaví (zdroj: www.svod.cz).

Graf 3 – Časový vývoj hrubé mortality melanomu kůže dle pohlaví (zdroj: www.svod.cz).

Graf 4 – Časový vývoj indexu mortalita/incidence melanomu kůže dle pohlaví (zdroj: www.svod.cz).

Graf 5 – Věková struktura pacientů s melanomem kůže za období 1977-2017 (zdroj: www.svod.cz).

Graf 6 – Vývoj zastoupení klinických stádií melanomu kůže (zdroj: www.svod.cz).

Tab. 1 – Nová klasifikace typů melanomu dle aktuálně platné WHO klasifikace kožních nádorů z roku 2018 (Elder DE. et al., 2018).

Tab. 2 – Nová klasifikace melanocytárních lézí dle aktuálně platné WHO klasifikace kožních nádorů z roku 2018 (Elder DE. et al., 2018).

Tab. 3 – Hodnocení dle rozsahu a denzity TIL v rámci algoritmu dle MIA (Azimi F. et al., 2012).

Tab. 4 – Škála pro hodnocení TIL dle Parka (Park CK. et al., 2017).

9. Seznam zkratek

ABC – avidin-biotin complex

AJCC – American Joint Committee on Cancer

APC – antigen presenting cell

BAP – BRCA1 associated protein 1

CAR – chimeric antigen receptor

CD – cluster of differentiation

CDK4 – cyclin-dependent kinase 4

CDKN2A – cyclin-dependent kinase inhibitor 2A

CSD – cumulative sun damage

CTCAE – Common Terminology Criteria for Adverse Events

CTLA-4 – cytotoxic T lymphocyte antigen 4

DAB – diaminobenzidin

DFS – disease free survival

DMFS – distant metastasis free survival

DPN – deep penetrating nevus

DSS – disease specific survival

ECOG – Eastern Cooperative Oncology Group

FDA – Food and Drug Administration

FDG – fluorodeoxyglukóza

FFPE – formalin-fixed paraffin-embedded

GIST – gastrointestinální stromální tumor

GLUT – glucose transporter

HE – hematoxylin – eozin

HIF – hypoxia-inducible factor

HILP – hyperthermic isolated limb perfusion

HMB-45 – Human Melanoma Black 45

HRE – hormon response element

IAMPUS – Intraepidermal Atypical Melanocytic Proliferations of Unknown Significance

IIOBWG – International Immuno-Oncology Biomarker Working Group

LDH – laktát dehydrogenáza

LFS – local recurrence free survival

MART-1 – Melanoma Antigen Recognized by T cells 1

MELTUMP – MELanocytic Tumors of Uncertain Malignant Potential
MFS – metastasis free survival
MIA – Melanoma Institute Australia
MITF – MICrophthalmia-associated Transcription Factor
OS – overall survival
PD-1 – Programmed cell Death protein 1
PEComa – Perivascular Epithelioid Cell tumor
PET/CT – pozitronová emisní tomografie/výpočetní tomografie
PFS – progression free survival
PHH3 – phosphohistone H3
PRAME – PReferentially expressed Antigen in MELanoma
RECIST – Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
RFS – relaps free survival
SAMPUS – Superficial Atypical Melanocytic Proliferations of Unknown Significance
SLCA – SoLute Carrier subfamily A
SLN – sentinel lymph node
SOX10 – sex determining region Y-box 10
SSM – superficially spreading melanoma
TACE – transarteriální chemoembolizace
TCGA – The Cancer Genome Atlas
TDT – tumour doubling time
TIL – tumor infiltrující lymfocyty
TNM – klasifikace zhoubných tumorů (Tumor, Node, Metastasis)
T-VEC – talimogene laherparepvec
VHL – von Hippel Lindau

10. Literatura

10.1. Odborné články

1. Ackerman AB. Malignant melanoma in situ: The flat, curable stage of malignant melanoma. *Pathology*. 1985;17(2):298-300.
2. Ahrens WA, Ridenour RV 3rd, Caron BL, Miller DV, Folpe AL. GLUT-1 expression in mesenchymal tumors: an immunohistochemical study of 247 soft tissue and bone neoplasms. *Hum Pathol*. 2008;39(10):1519-26.
3. Azimi F, Scolyer RA, Rumcheva P, Moncrieff M, Murali R, McCarthy SW, Saw RP, Thompson JF. Tumor-infiltrating lymphocyte grade is an independent predictor of sentinel lymph node status and survival in patients with cutaneous melanoma. *J Clin Oncol*. 2012;30(21):2678-83.
4. Baer SC, Casaubon L, Younes M. Expression of the human erythrocyte glucose transporter Glut1 in cutaneous neoplasia. *J Am Acad Dermatol*. 1997;37(4):575-7.
5. Barthel A, Okino ST, Liao J, Nakatani K, Li J, Whitlock JP Jr, Roth RA. Regulation of GLUT1 gene transcription by the serine/threonine kinase Akt1. *J Biol Chem*. 1999;274(29):20281-6.
6. Busam KJ, Chen YT, Old LJ, Stockert E, Iversen K, Coplan KA, Rosai J, Barnhill RL, Jungbluth AA. Expression of melan-A (MART1) in benign melanocytic nevi and primary cutaneous malignant melanoma. *Am J Surg Pathol*. 1998;22(8):976-82.
7. Carvalho KC, Cunha IW, Rocha RM, Ayala FR, Cajaíba MM, Begnami MD, Vilela RS, Paiva GR, Andrade RG, Soares FA. GLUT1 expression in malignant tumors and its use as an immunodiagnostic marker. *Clinics (Sao Paulo)*. 2011;66(6):965-72.
8. Clark WH Jr, Elder DE, Guerry D 4th, Braitman LE, Trock BJ, Schultz D, Synnestvedt M, Halpern AC. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J Natl Cancer Inst*. 1989;81(24):1893-904.

9. Clarkson KS, Sturdge IC, Molyneux AJ. The usefulness of tyrosinase in the immunohistochemical assessment of melanocytic lesions: a comparison of the novel T311 antibody (anti-tyrosinase) with S-100, HMB45, and A103 (anti-melan-A). *J Clin Pathol.* 2001;54:196–200.
10. Crane RK. Intestinal absorption of sugars. *Physiol Rev.* 1960;40:789-825.
11. Day CL, Sober AJ, Kopf AW, Lew RA, Mihm MC, Golomb FM, Postel A, Hennessey P, Harris MN, Gumport SL, Raker JW, Malt RA, Cosimi AB, Wood WC, Roses DF, Gorstein F, Fitzpatrick TB. A prognostic model for clinical stage I melanoma of the trunk: Location near the midline is not an independent risk factor for recurrent disease. *Am J Surg.* 1981;142(2):247-251.
12. Deng D, Xu C, Sun P, Wu J, Yan C, Hu M, Yan N. Crystal structure of the human glucose transporter GLUT1. *Nature.* 2014;510(7503):121-5.
13. Duffy K, Grossman D. The dysplastic nevus: from historical perspective to management in the modern era: part I. Historical, histologic, and clinical aspects. *J Am Acad Dermatol.* 2012;67(1):1.e1-16; quiz 17-8.
14. Dunder P, Němejcová K, Bártů M, Matěj R, Rohan Z, Tichá I. Hodnocení zánětlivé celulizace (tumor infiltrujících lymfocytů) u solidních nádorů. *Klin Onkol.* 2017;30(Suppl 3):3S10-3S21.
15. Eichhoff OM, Zipser MC, Xu M, Weeraratna AT, Mihic D, Dummer R, Hoek KS. The immunohistochemistry of invasive and proliferative phenotype switching in melanoma: a case report. *Melanoma Res.* 2010;20(4):349-55.
16. El Sharouni MA, Aivazian K, Witkamp AJ, Sigurdsson V, van Gils CH, Scolyer RA, Thompson JF, van Diest PJ, Lo SN. Association of histologic regression with a favorable outcome in patients with stage 1 and stage 2 cutaneous melanoma. *JAMA Dermatol.* 2021;157(2):166-173.

17. Faries MB, Thompson JF, Cochran AJ, Andtbacka RH, Mozzillo N, Zager JS, Jahkola T, Bowles TL, Testori A, Beitsch PD, Hoekstra HJ, Moncrieff M, Ingvar C, Wouters MWJM, Sabel MS, Levine EA, Agnese D, Henderson M, Dummer R, Rossi CR, Neves RI, Trocha SD, Wright F, Byrd DR, Matter M, Hsueh E, MacKenzie-Ross A, Johnson DB, Terheyden P, Berger AC, Huston TL, Wayne JD, Smithers BM, Neuman HB, Schneebaum S, Gershenwald JE, Ariyan CE, Desai DC, Jacobs L, McMasters KM, Gesierich A, Hersey P, Bines SD, Kane JM, Barth RJ, McKinnon G, Farma JM, Schultz E, Vidal-Sicart S, Hoefler RA, Lewis JM, Scheri R, Kelley MC, Nieweg OE, Noyes RD, Hoon DSB, Wang HJ, Elashoff DA, Elashoff RM. Completion dissection or observation for sentinel-node metastasis in melanoma. *N Engl J Med.* 2017;376(23):2211-2222.
18. Fuertes L, Santonja C, Kutzner H, Requena L. Immunohistochemistry in dermatopathology: a review of the most commonly used antibodies (part I). *Actas Dermosifiliogr.* 2013;104(2):99-127.
19. Fuertes L, Santonja C, Kutzner H, Requena L. Immunohistochemistry in dermatopathology: a review of the most commonly used antibodies (part II). *Actas Dermosifiliogr.* 2013;104(3):181-203.
20. Galochkina T, Ng Fuk Chong M, Challali L, Abbar S, Etchebest C. New insights into GLUT1 mechanics during glucose transfer. *Sci Rep.* 2019;9(1):998.
21. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoué F, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Pagès F. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science.* 2006;313(5795):1960-4.
22. Galon J, Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, Berger A, Lagorce C, Lugli A, Zlobec I, Hartmann A, Bifulco C, Nagtegaal ID, Palmqvist R, Masucci GV, Botti G, Tatangelo F, Delrio P, Maio M, Laghi L, Grizzi F, Asslaber M, D'Arrigo C, Vidal-Vanaclocha F, Zavadova E, Chouchane L, Ohashi PS, Hafezi-Bakhtiari S, Wouters BG, Roehrl M, Nguyen L, Kawakami Y, Hazama S, Okuno K, Ogino S, Gibbs P, Waring P, Sato N, Torigoe T, Itoh K, Patel PS, Shukla SN, Wang Y, Kopetz S, Sinicrope FA, Scripcariu

- V, Ascierto PA, Marincola FM, Fox BA, Pagès F. Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. *J Pathol.* 2014;232(2):199-209.
23. Graham C, Hewitson R, Pagliuca A, Benjamin R. Cancer immunotherapy with CAR-T cells - behold the future. *Clin Med (Lond).* 2018;18(4):324-328.
24. Hamilton KL, Robert K. Crane-Na(+)-glucose cotransporter to cure? *Front Physiol.* 2013;4:53.
25. Hendry S, Salgado R, Gevaert T, Russell PA, John T, Thapa B, Christie M, van de Vijver K, Estrada MV, Gonzalez-Ericsson PI, Sanders M, Solomon B, Solinas C, Van den Eynden GGM, Allory Y, Preusser M, Hainfellner J, Pruneri G, Vingiani A, Demaria S, Symmans F, Nuciforo P, Comerma L, Thompson EA, Lakhani S, Kim SR, Schnitt S, Colpaert C, Sotiriou C, Scherer SJ, Ignatiadis M, Badve S, Pierce RH, Viale G, Sirtaine N, Penault-Llorca F, Sugie T, Fineberg S, Paik S, Srinivasan A, Richardson A, Wang Y, Chmielik E, Brock J, Johnson DB, Balko J, Wienert S, Bossuyt V, Michiels S, Ternes N, Burchardi N, Luen SJ, Savas P, Klauschen F, Watson PH, Nelson BH, Criscitiello C, O'Toole S, Larsimont D, de Wind R, Curigliano G, André F, Lacroix-Triki M, van de Vijver M, Rojo F, Floris G, Bedri S, Sparano J, Rimm D, Nielsen T, Kos Z, Hewitt S, Singh B, Farshid G, Loibl S, Allison KH, Tung N, Adams S, Willard-Gallo K, Horlings HM, Gandhi L, Moreira A, Hirsch F, Dieci MV, Urbanowicz M, Brcic I, Korski K, Gaire F, Koeppen H, Lo A, Giltnane J, Rebelatto MC, Steele KE, Zha J, Emancipator K, Juco JW, Denkert C, Reis-Filho J, Loi S, Fox SB. Assessing tumor-infiltrating lymphocytes in solid tumors: A practical review for pathologists and proposal for a standardized method from the International Immunooncology Biomarkers Working Group: Part 1: Assessing the host immune response, TILs in invasive breast carcinoma and ductal carcinoma in situ, metastatic tumor deposits and areas for further research. *Adv Anat Pathol.* 2017;24(5):235-251.
26. Hendry S, Salgado R, Gevaert T, Russell PA, John T, Thapa B, Christie M, van de Vijver K, Estrada MV, Gonzalez-Ericsson PI, Sanders M, Solomon B, Solinas C, Van den Eynden GGM, Allory Y, Preusser M, Hainfellner J, Pruneri G, Vingiani A, Demaria S, Symmans F, Nuciforo P, Comerma L, Thompson EA, Lakhani S, Kim SR,

Schnitt S, Colpaert C, Sotiriou C, Scherer SJ, Ignatiadis M, Badve S, Pierce RH, Viale G, Sirtaine N, Penault-Llorca F, Sugie T, Fineberg S, Paik S, Srinivasan A, Richardson A, Wang Y, Chmielik E, Brock J, Johnson DB, Balko J, Wienert S, Bossuyt V, Michiels S, Ternes N, Burchardi N, Luen SJ, Savas P, Klauschen F, Watson PH, Nelson BH, Criscitiello C, O'Toole S, Larsimont D, de Wind R, Curigliano G, André F, Lacroix-Triki M, van de Vijver M, Rojo F, Floris G, Bedri S, Sparano J, Rimm D, Nielsen T, Kos Z, Hewitt S, Singh B, Farshid G, Loibl S, Allison KH, Tung N, Adams S, Willard-Gallo K, Horlings HM, Gandhi L, Moreira A, Hirsch F, Dieci MV, Urbanowicz M, Brcic I, Korski K, Gaire F, Koeppen H, Lo A, Giltane J, Rebelatto MC, Steele KE, Zha J, Emancipator K, Juco JW, Denkert C, Reis-Filho J, Loi S, Fox SB. Assessing tumor-infiltrating lymphocytes in solid tumors: A practical review for pathologists and proposal for a standardized method from the International Immuno-Oncology Biomarkers Working Group: Part 2: TILs in melanoma, gastrointestinal tract carcinomas, non-small cell lung carcinoma and mesothelioma, endometrial and ovarian carcinomas, squamous cell carcinoma of the head and neck, genitourinary carcinomas, and primary brain tumors. *Adv Anat Pathol*. 2017;24(6):311-335.

27. Hoek KS, Eichhoff OM, Schlegel NC, Döbbeling U, Kobert N, Schaerer L, Hemmi S, Dummer R. In vivo switching of human melanoma cells between proliferative and invasive states. *Cancer Res*. 2008;68(3):650-6.
28. Jungbluth AA, Busam KJ, Gerald WL, Stockert E, Coplan KA, Iversen K, MacGregor DP, Old LJ, Chen YT. A103: An anti-melan-a monoclonal antibody for the detection of malignant melanoma in paraffin-embedded tissues. *Am J Surg Pathol*. 1998;22(5):595-602.
29. Koh SS, Cassarino DS. Immunohistochemical expression of p16 in melanocytic lesions: An updated review and meta-analysis. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142(7):815-828.
30. Kos Z, Roblin E, Kim RS, Michiels S, Gallas BD, Chen W, van de Vijver KK, Goel S, Adams S, Demaria S, Viale G, Nielsen TO, Badve SS, Symmans WF, Sotiriou C, Rimm DL, Hewitt S, Denkert C, Loibl S, Luen SJ, Bartlett JMS, Savas P, Pruneri G, Dillon DA, Cheang MCU, Tutt A, Hall JA, Kok M, Horlings HM, Madabhushi A, van der

Laak J, Ciompi F, Laenkholm AV, Bellolio E, Gruosso T, Fox SB, Araya JC, Floris G, Hudeček J, Voorwerk L, Beck AH, Kerner J, Larsimont D, Declercq S, Van den Eynden G, Puzstai L, Ehinger A, Yang W, AbdulJabbar K, Yuan Y, Singh R, Hiley C, Bakir MA, Lazar AJ, Naber S, Wienert S, Castillo M, Curigliano G, Dieci MV, André F, Swanton C, Reis-Filho J, Sparano J, Balslev E, Chen IC, Stovgaard EIS, Pogue-Geile K, Blenman KRM, Penault-Llorca F, Schnitt S, Lakhani SR, Vincent-Salomon A, Rojo F, Braybrooke JP, Hanna MG, Soler-Monsó MT, Bethmann D, Castaneda CA, Willard-Gallo K, Sharma A, Lien HC, Fineberg S, Thagaard J, Comerma L, Gonzalez-Ericsson P, Brogi E, Loi S, Saltz J, Klausen F, Cooper L, Amgad M, Moore DA, Salgado R; International Immuno-Oncology Biomarker Working Group. Pitfalls in assessing stromal tumor infiltrating lymphocytes (sTILs) in breast cancer. *NPJ Breast Cancer*. 2020;6:17.

31. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Rutkowski P, Lao CD, Cowey CL, Schadendorf D, Wagstaff J, Dummer R, Ferrucci PF, Smylie M, Hogg D, Hill A, Márquez-Rodas I, Haanen J, Guidoboni M, Maio M, Schöffski P, Carlino MS, Lebbé C, McArthur G, Ascierto PA, Daniels GA, Long GV, Bastholt L, Rizzo JJ, Balogh A, Moshyk A, Hodi FS, Wolchok JD. Five-year survival with combined nivolumab and ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med*. 2019;381(16):1535-1546.
32. Lee JH, Gulec SA, Kyshtoobayeva A, Sim MS, Morton DL. Biological factors, tumor growth kinetics, and survival after metastasectomy for pulmonary melanoma. *Ann Surg Oncol*. 2009;16(10):2834-9.
33. Lezcano C, Jungbluth AA, Nehal KS, Hollmann TJ, Busam KJ. PRAME expression in melanocytic tumors. *Am J Surg Pathol*. 2018;42(11):1456-1465.
34. Luo S, Sepehr A, Tsao H. Spitz nevi and other spitzoid lesions part I. Background and diagnoses. *J Am Acad Dermatol*. 2011;65(6):1073-84.
35. Ma Y, Wang Q, Dong Q, Zhan L, Zhang J. How to differentiate pseudoprogession from true progression in cancer patients treated with immunotherapy. *Am J Cancer Res*. 2019;9(8):1546-1553.

36. Mahipal A, Tijani L, Chan K, Laudadio M, Mastrangelo MJ, Sato T. A pilot study of sunitinib malate in patients with metastatic uveal melanoma. *Melanoma Res.* 2012;22(6):440-6.
37. Maio M, Danielli R, Chiarion-Sileni V, Pigozzo J, Parmiani G, Ridolfi R, De Rosa F, Del Vecchio M, Di Guardo L, Queirolo P, Picasso V, Marchetti P, De Galitiis F, Mandalà M, Guida M, Simeone E, Ascierto PA. Efficacy and safety of ipilimumab in patients with pre-treated, uveal melanoma. *Ann Oncol.* 2013;24(11):2911-5.
38. Martin RC 2nd, Scoggins CR, Ross MI, Reintgen DS, Noyes RD, Edwards MJ, McMasters KM. Is incisional biopsy of melanoma harmful? *Am J Surg.* 2005;190(6):913-7.
39. Miettinen M, Fernandez M, Franssila K, Gatalica Z, Lasota J, Sarlomo-Rikala M. Microphthalmia transcription factor in the immunohistochemical diagnosis of metastatic melanoma: comparison with four other melanoma markers. *Am J Surg Pathol.* 2001;25:205–211.
40. Mihic-Probst D, Ikenberg K, Tinguely M, Schraml P, Behnke S, Seifert B, Civenni G, Sommer L, Moch H, Dummer R. Tumor cell plasticity and angiogenesis in human melanomas. *PLoS One.* 2012;7(3):e33571.
41. Miettinen M, McCue PA, Sarlomo-Rikala M, Biernat W, Czapiewski P, Kopczynski J, Thompson LD, Lasota J, Wang Z, Fetsch JF. Sox10--a marker for not only schwannian and melanocytic neoplasms but also myoepithelial cell tumors of soft tissue: a systematic analysis of 5134 tumors. *Am J Surg Pathol.* 2015;39(6):826-35.
42. Mocellin S, Lens MB, Pasquali S, Pilati P, Chiarion Sileni V. Interferon alpha for the adjuvant treatment of cutaneous melanoma. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013;(6):CD008955.
43. Mooy CM, Jong PTVM. Prognostic parameters in uveal melanoma: a review. *Surv Ophthalmol.* 1996;41(3):215-228.

44. Muñoz-Couselo E, Adelantado EZ, Ortiz C, García JS, Perez-Garcia J. NRAS-mutant melanoma: current challenges and future prospect. *Onco Targets Ther.* 2017;10:3941-3947.
45. Muntyanu A, Savin E, Ghazawi FM, Alakel A, Zubarev A, Litvinov IV. Geographic variations in cutaneous melanoma distribution in the Russian federation. *Dermatology.* 2020;236(6):500-507.
46. Navale AM, Paranjape AN. Glucose transporters: physiological and pathological roles. *Biophys Rev.* 2016;8(1):5-9.
47. Nedelcu RI, Zurac SA, Brînzea A, Cioplea MD, Turcu G, Popescu R, Popescu CM, Ion DA. Morphological features of melanocytic tumors with depigmented halo: review of the literature and personal results. *Rom J Morphol Embryol.* 2015;56(2 Suppl):659-63.
48. Nemejcova K, Rosmusova J, Bartu M, Dura M, Ticha I, Dundr P. Expression of Glut-1 in normal endometrium and endometrial lesions. *Int J Surg Pathol.* 2017;25:389–396.
49. Pardridge WM, Boado RJ, Farrell CR. Brain-type glucose transporter (GLUT-1) is selectively localized to the blood-brain barrier. Studies with quantitative western blotting and in situ hybridization. *J Biol Chem.* 1990;265:18035–18040.
50. Parente P, Coli A, Massi G, Mangoni A, Fabrizi MM, Bigotti G. Immunohistochemical expression of the glucose transporters Glut-1 and Glut-3 in human malignant melanomas and benign melanocytic lesions. *J Exp Clin Cancer Res.* 2008;27-34.
51. Park CK, Kim SK. Clinicopathological significance of intratumoral and peritumoral lymphocytes and lymphocyte score based on the histologic subtypes of cutaneous melanoma. *Oncotarget.* 2017;8(9):14759-14769.
52. Park SG, Lee JH, Lee WA, Han KM. Biologic correlation between glucose transporters, hexokinase-II, Ki-67 and FDG uptake in malignant melanoma. *Nucl Med Biol.* 2012;39(8):1167-72.

53. Pisacane AM, Picciotto F, Risio M. CD31 and CD34 expression as immunohistochemical markers of endothelial transdifferentiation in human cutaneous melanoma. *Cell Oncol.* 2007;29(1):59-66.
54. Pock L. Atypické melanocytární léze. *Čes-slov Derm.* 2013;88(3):107-122.
55. Puzanov I, Diab A, Abdallah K, Bingham CO 3rd, Brogdon C, Dadu R, Hamad L, Kim S, Lacouture ME, LeBoeuf NR, Lenihan D, Onofrei C, Shannon V, Sharma R, Silk AW, Skondra D, Suarez-Almazor ME, Wang Y, Wiley K, Kaufman HL, Ernstoff MS; Society for Immunotherapy of Cancer Toxicity Management Working Group. Managing toxicities associated with immune checkpoint inhibitors: consensus recommendations from the Society for Immunotherapy of Cancer (SITC) Toxicity Management Working Group. *J Immunother Cancer.* 2017;5(1):95.
56. Requena C, Botella-Estrada R, Traves V, Nagore E, Almenar S, Guillén C. Problems in defining melanoma regression and prognostic implication. *Actas Dermosifiliogr.* 2009;100(9):759-66.
57. Romano RC, Carter JM, Folpe AL. Aberrant intermediate filament and synaptophysin expression is a frequent event in malignant melanoma: an immunohistochemical study of 73 cases. *Mod Pathol.* 2015;28(8):1033-42.
58. Saldanha G, Flatman K, Teo KW, Bamford M. A novel numerical scoring system for melanoma tumor-infiltrating lymphocytes has better prognostic value than standard scoring. *Am J Surg Pathol.* 2017;41(7):906-914.
59. Schwartz LH, Litière S, de Vries E, Ford R, Gwyther S, Mandrekar S, Shankar L, Bogaerts J, Chen A, Dancey J, Hayes W, Hodi FS, Hoekstra OS, Huang EP, Lin N, Liu Y, Therasse P, Wolchok JD, Seymour L. RECIST 1.1-Update and clarification: From the RECIST committee. *Eur J Cancer.* 2016;62:132-7.

60. Silva Filho TJ, Oliveira DHIP, Moura IS, Medeiros LKS, Gonzaga, AKG, Brasil VLM, Queiroz LMG. Importance of GLUT1 in differential diagnosis of vascular anomalies. *Jornal Vascular Brasileiro*. 2015;14(2):168-176.
61. Sladden MJ, Nieweg OE, Howle J, Coventry BJ, Thompson JF. Updated evidence-based clinical practice guidelines for the diagnosis and management of melanoma: definitive excision margins for primary cutaneous melanoma. *Med J Aust*. 2018;208(3):137-142.
62. Slominski A, Kim TK, Brożyna AA, Janjetovic Z, Brooks DL, Schwab LP, Skobowiat C, Jóźwicki W, Seagroves TN. The role of melanogenesis in regulation of melanoma behavior: melanogenesis leads to stimulation of HIF-1 α expression and HIF-dependent attendant pathways. *Arch Biochem Biophys*. 2014;563:79-93.
63. Su J, Gao T, Jiang M, Wu L, Zeng W, Zhao S, Peng C, Chen X. CD147 silencing inhibits tumor growth by suppressing glucose transport in melanoma. *Oncotarget*. 2016;7(40):64778-64784.
64. Thomas D, Bello DM. Adjuvant immunotherapy for melanoma. *J Surg Oncol*. 2021;123:789– 797.
65. Thomas NE, Edmiston SN, Tsai YS, Parker JS, Googe PB, Busam KJ, Scott GA, Zedek DC, Parrish EA, Hao H, Slater NA, Pearlstein MV, Frank JS, Kuan PF, Ollila DW, Conway K. Utility of TERT promoter mutations for cutaneous primary melanoma diagnosis. *Am J Dermatopathol*. 2019;41(4):264-272.
66. Toscano de Mendonça UB, Cernea CR, Matos LL, Monteiro de Araujo Lima RR. Analysis of KIT gene mutations in patients with melanoma of the head and neck mucosa: a retrospective clinical report. *Oncotarget*. 2018;9(33):22886-22894.
67. Trautmann F, Meier F, Seidler A, Schmitt J. Effects of the German skin cancer screening programme on melanoma incidence and indicators of disease severity. *Br J Dermatol*. 2016;175(5):912-919.

68. van Vugt LJ, van der Vleuten CJM, Flucke U, Blokkx WAM. The utility of GLUT1 as a diagnostic marker in cutaneous vascular anomalies: A review of literature and recommendations for daily practice. *Pathol Res Pract.* 2017;213(6):591-597.
69. Wachsberger PR, Gressen EL, Bhala A, Bobyock SB, Storck C, Coss RA, Berd D, Leeper DB. Variability in glucose transporter-1 levels and hexokinase activity in human melanoma. *Melanoma Res.* 2002;12(1):35-43.
70. Widmer DS, Hoek KS, Cheng PF, Eichhoff OM, Biedermann T, Raaijmakers MIG, Hemmi S, Dummer R, Levesque MP. Hypoxia contributes to melanoma heterogeneity by triggering HIF1 α -dependent phenotype switching. *J Invest Dermatol.* 2013;133(10):2436-2443.
71. Wiesner T, Obenauf AC, Murali R, Fried I, Griewank KG, Ulz P, Windpassinger C, Wackernagel W, Loy S, Wolf I, Viale A, Lash AE, Pirun M, Socci ND, Rütten A, Palmedo G, Abramson D, Offit K, Ott A, Becker JC, Cerroni L, Kutzner H, Bastian BC, Speicher MR. Germline mutations in BAP1 predispose to melanocytic tumors. *Nat Genet.* 2011;43(10):1018-21.
72. von Wolff M, Ursel S, Hahn U, Steldinger R, Strowitzki T. Glucose transporter proteins (GLUT) in human endometrium: expression, regulation, and function throughout the menstrual cycle and in early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(8):3885-92.
73. Yamaguchi U, Hasegawa T, Hirose T, Fugo K, Mitsuhashi T, Shimizu M, Kawai A, Ito Y, Chuman H, Beppu Y. Sclerosing perineurioma: a clinicopathological study of five cases and diagnostic utility of immunohistochemical staining for GLUT1. *Virchows Arch.* 2003;443(2):159-63.
74. Yilmaz M, Akovali B. Hyperprogression after nivolumab for melanoma: A case report. *J Oncol Pharm Pract.* 2020;26(1):244-251.
75. Zembowicz A, Carney JA, Mihm MC. Pigmented epithelioid melanocytoma: a low-grade melanocytic tumor with metastatic potential indistinguishable from animal-type melanoma and epithelioid blue nevus. *Am J Surg Pathol.* 2004;28(1):31-40.

76. Zembowicz A, Phadke PA. Blue nevi and variants: an update. *Arch Pathol Lab Med.* 2011;135(3):327-36.

10.2.Knihy

1. Calonje E, Brenn T, Lazar AJ, Billings SD. *McKee's Pathology of the Skin.* 5th Edition. Amsterdam: Elsevier/Saunders, 2019, 2 vol., 1980 p. ISBN 978-0-7020-6983-3.
2. Dabbs DJ. *Diagnostic Immunohistochemistry: Theranostic and Genomic Applications.* 5th Edition. Philadelphia: Elsevier – Health Sciences Division, 2018, 944 p. ISBN 978-03-234-7732-1.
3. Elder DE, Massi D, Scolyer RA, Willemze R. *WHO Classification of Skin Tumours.* 4th Edition. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2018, 469 p. ISBN 978-92-832-2440-2.
4. Hosler GA. *Diagnostic Dermatopathology: A Guide to Ancillary Tests Beyond the H&E.* JP Medical Ltd, 2016, 276 p. ISBN 978-19-098-3612-9.
5. Krajsová I, Bauer J. *Melanom – imunoterapie a cílená léčba.* 1. vydání. Praha: Maxdorf, 2017, 382 s. ISBN 978-80-7345-515-6.
6. Massi G, LeBoit PE. *Histological Diagnosis of Nevi and Melanoma.* 2nd Edition. Berlin Heidelberg: Springer, 2016, 752 p. ISBN 978-3-6625-0015-6.
7. Patterson JW. *Weedon's Skin Pathology.* 4th Edition. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier, 2015, 1262 p. ISBN 978-0-7020-5183-8.
8. Matthews NH, Li WQ, Qureshi AA, Weinstock MA, Cho E. Epidemiology of Melanoma. In: Ward WH, Farma JM, editors. *Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy [Internet].* Brisbane: Codon Publications, 2017. Chapter 1. PMID: 29461782.

10.3. Internetové zdroje

<https://www.cancerstaging.org/>

<https://www.eado.org/>

<https://svod.cz/>

<https://www.themillerlab.io/>

11. Seznam publikací doktoranda

11.1. *Publikace s IF, které jsou podkladem disertace*

Důra M, Němejcová K, Jakša R, Bártů M, Kodet O, Tichá I, Michálková R, Dundr P. Expression of Glut-1 in malignant melanoma and melanocytic nevi: an immunohistochemical study of 400 cases. *Pathol Oncol Res.* 2019;25(1):361-368. **IF – 2,701**

Němejcová K, Tichá I, Bártů M, Kodet O, Důra M, Jakša R, Michálková R, Dundr P. Comparison of five different scoring methods in the evaluation of inflammatory infiltration (tumor-infiltrating lymphocytes) in superficial spreading and nodular melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2019;32(3):412-423. **IF – 3,704**

11.2. *Publikace bez vztahu k tématu disertace*

11.2.1. Publikace s IF

Němejcová K, Rosmusová J, Bártů M, Důra M, Tichá I, Dundr P. Expression of Glut-1 in normal endometrium and endometrial lesions: Analysis of 336 cases. *Int J Surg Pathol.* 2017;25(5):389-396. **IF – 0,927**

Tichá I, Hojný J, Michálková R, Kodet O, Krkavcová E, Hájková N, Němejcová K, Bártů M, Jakša R, Důra M, Kanwal M, Martinikova AS, Macurek L, Zemánková P, Kleibl Z, Dundr P. A comprehensive evaluation of pathogenic mutations in primary cutaneous melanomas, including the identification of novel loss-of-function variants. *Sci Rep.* 2019;9(1):17050. **IF – 3,998**

11.2.2. Publikace bez IF

Důra M, Krajsová I, Štork J, Kodet O. Puchýře a eroze na rukou. *Čes-slov Derm.* 2016;91(2):76-78.

Plzáková Z, Důra M, Dundr P, Štork J. Kongenitální forma dermatofibrosarcoma protuberans. *Čes-slov Derm.* 2016;91(1):18-21.

Důra M, Kodet O, Šlajsová M, Štork J. Sweetův syndrom při myelodysplastickém syndromu – popis případu. Čes-slov Derm. 2017;92(3):128-131.

Kodet O, Důra M, Šlajsová M, Štork J. Recidivující noduly na bércei. Čes-slov Derm. 2017;92(2):73-76.

Kučera J, Důra M, Petráčková M, Štork J. Klinický případ: „Eroze“ na dlani. Čes-slov Derm. 2017;92(6):280-282.

Štork J, Důra M, Petráčková M, Kojanová M. Prurigo pigmentosa – popis případu. Čes-slov Derm. 2018;93(3):102-106.

Důra M, Štork J. Biopsie v dermatologii. Čes-slov Derm. 2018;93(4):127-134.

Mináriková M, Důra M, Šlajsová M, Štork J. Papulonekrotický tuberkulid – popis případu. Čes-slov Derm. 2018;93(4):141-145.

Důra M, Lacina L, Kodet O, Horažďovský J, Štork J. Lupus miliaris disseminatus faciei. Čes-slov Derm. 2018;93(5):181-184.

Důra M, Polášková S, Petráčková M, Štork J. Shluk žlutavých papul u kojence. Stručný přehled. Čes-slov Derm. 2018;93(6):272-275.

Důra M. S kytarou a na fotbal. Onkol Revue. 2019;6(2):30-31.

Důra M, Plzáková Z, Polášková S, Šlajsová M, Štork J. Vrozené makulózní ložisko u kojence. Stručný přehled. Čes-slov Derm. 2019;94(2):68-70.

Kuklová I, Benáková N, Důra M. Co je v posledním období nového v dermatologii. Medicína po promoci. 2019;20(3):187-190. ISSN: 1212-9445.

Důra M, Petráčková M, Štork J. Klinický případ: Krvácející nodulus na zádech. Stručný přehled. Čes-slov Derm. 2019;94(4):170-171.

Vojnarovičová K, Důra M, Šlajsová M, Štork J. Průsvitná papula na prstu nohy. Stručný přehled. Čes-slov Derm. 2019;94(5):210-212.

Důra M. Kožní toxicita imunoterapie. Onkol Revue. 2020;7(2):24-28.

Důra M, Šlajsová M, Štork J. Červené makulopapuly na levé straně krku. Čes-slov Derm. 2020;95(1):24-26.

Důra M. Kožní nežádoucí účinky protinádorové léčby. Onkologie. 2020;14(Suppl. C):30-34.

Důra M, Štork J. Darierova choroba: současný pohled. Část I. Čes-slov Derm. 2020;95(2):43–56.

Důra M, Šlajsová M, Štork J. Mnohočetné kožní noduly. Stručný přehled. Čes-slov Derm. 2020;95(2):80-82.

Důra M, Štork J. Darierova choroba: současný pohled. Část II. Čes-slov Derm. 2020;95(3):87-98.

Císařová K, Důra M, Havlínová A, Petráčková M, Štork J. Lokalizované edémy bérců. Čes-slov Derm. 2020;95(3):116-118.

Důra M, Petráčková M, Krajsová I, Štork J. Solitární ložisko na skrotu. Stručný přehled. Čes-slov Derm. 2020;95(5):154-156.

Důra M. Kožní komplikace u onkologických pacientů. Onkologie. 2021;15(1):25-29.

Důra M, Pánková R, Štork J. Ložisková alopecie s exkoriacemi. Stručný přehled. Čes-slov Derm, 96, 2021, No. 1, p. 23–25.

Důra M. Současné možnosti nechirurgické terapie melanomu v praxi. Dermatologie pro praxi – přijato do tisku

Důra M, Kodet O, Petráčková M, Štork J. Mnohočetné drsné papuly s pozitivním Auspitzovým fenoménem. *Čes-slov Derm – přijato do tisku*

Důra M, Štork J, Plzáková Z, Kodet O. Pustuly a krusty ve kštici. *Čes-slov Derm – přijato do tisku*

Šmejkalová D, Důra M, Rosmusová J, Štork J. Asymetrické zbytnění mamily. *Čes-slov Derm – přijato do tisku*

Kuklová I, Kojanová M, Důra M, Záveská H, Pánková R, Kreidlová M, Šmajš D, Vrbová E. Porovnání hospitalizačních záznamů pacientů se syfilis z let 2007-2009 a 2017-2019. *Čes-slov Derm – přijato do tisku*

11.2.3. Kapitoly v knihách

Důra M. Atypická melanocytární léze. In: Krajsová I. et al. Kazuistiky z dermatologických a dermatoonkologických ordinací. 1. vydání. Praha: Current Media, 2018, 300 s. ISBN 978-80-88129-32-5.

Důra M. Papuly obličeje a axil – případ motorkářky. In: Krajsová I. et al. Kazuistiky z dermatologických a dermatoonkologických ordinací. 1. vydání. Praha: Current Media, 2018, 300 s. ISBN 978-80-88129-32-5.

Důra M. Darierova choroba. In: Benáková N. et al. Moderní farmakoterapie v dermatologii. 1. vydání. Praha: Maxdorf, 2020, 664 s. ISBN 978-80-7345-653-5.