

Univerzita Karlova

Lékařská fakulta v Plzni

Studijní program: Chirurgie

Maligní melanom

Nové vědecké poznatky

Malignant melanoma

New scientific knowledge

Disertační práce

Školitel: doc. MUDr. Inka Třešková, Ph.D.

Plzeň 2023

MUDr. Vlastimil Woznica

1 Abstrakt

- *Úvod*

Maligní melanom je jedním z nejagresivnějších kožních nádorů s nepříznivou prognózou a vysokou mortalitou, která je spojena především s pokročilými stádii této choroby. Incidence v posledních deseti letech zaznamenala nárůst o 50 %. Pro dobrou prognózu pacientů je zcela zásadní odhalení nádoru v počátečním stádiu a jeho včasné chirurgické odstranění. V posledních letech byl prokázán přínos cílené léčby a imunoterapie (adjuvantní léčba) u pacientů s lokálně pokročilým stádiem maligního melanomu po resekcii primárního nádoru a uzlinových metastáz.

- *Cíle*

Cílem projektu je detekce pacientů s vysokým rizikem recidivy pomocí biomarkerů z fluidní biopsie (volná cirkulující DNA), kteří jsou po operaci s kurativním záměrem, a pro které by byla vhodná finančně nákladná adjuvantní terapie. Dalším cílem je využití uvedených biomarkerů k časnému odhalení vlastní recidivy onemocnění a reziduální choroby po excizi primárního ložiska tumoru.

- *Metodika*

U pacientů, s časným stádiem melanomu, podstupujících kurativní chirurgický zákrok, byly nabírány vzorky plné krve v pravidelných časových odstupech. Z nabrané plné krve byla nejdříve dvoufázovou centrifugací separována plazma. Cell-free DNA (cfDNA) byla izolována v MD Anderson Cancer Center v Houstonu v USA. Využitím kapkové digitální polymerázové řetězové reakce (ddPCR) byla stanovena přítomnost BRAF V600E mutace ve tkáňových i plazmatických vzorcích pacientů. Pacienti následně podstoupili pravidelné kontroly v ambulanci Oddělení plastické chirurgie a Dermatovenerologické kliniky ve Fakultní nemocnici v Plzni. Jednotlivé výsledky jsme následně statisticky zpracovali. K analýze dat byl využit software IBM SPSS Statistics (v.26.0, IBM Corp.). Za statisticky významné jsme brali hodnoty $P < 0.05$.

- *Výsledky*

Z osmdesáti pacientů, zařazených do naší studie, pouze v 52 případech byly k dispozici vzorky primárního tumoru pro stanovení BRAF V600E mutace. Co se týče RR (recurrence rate), DFI (disease free interval) a OS (overall survival), nebyl prokázán vliv BRAF V600E mutace ve vzorku tumoru. V souboru předoperačních náběrů se zjistilo, že přítomnost BRAF mutace v předoperačním náběru je spojena s vysokým rizikem recidivy i úmrtí oproti BRAF V600E WT. V náběrech, které byly provedeny jednu

hodinu po chirurgickém výkonu u 76 pacientů, byla nalezena mutace BRAF V600E ve 26.3 % případů (n = 20). Pacienti s BRAF V600E mutací v ctDNA mají oproti pacientům s BRAF V600E WT ctDNA vyšší celkový výskyt recidivy, RR do 6 měsíců od výkonu, RR do 2 let. Pacienti s BRAF V600E mutací také vykazovali kratší DFI i OS. V náběrech provedených druhý pooperační den vychází opět BRAF mutace ctDNA s vyšším rizikem recidivy. Ve všech dalších kontrolních náběrech již mezi BRAF mutantní ctDNA a BRAF WT ctDNA nebyl signifikantní rozdíl v RR, DFI ani OS.

- *Shrnutí*

Naše výsledky poukazují na skutečnost, že stanovením ctDNA jednu hodinu po chirurgickém výkonu je možné identifikovat vysoce rizikové nemocné, kteří by z adjuvantní terapie výrazně profitovali. Ačkoli je tuto studii ještě nutné potvrdit na širším vzorku nemocných, testování ctDNA je možné zvažovat jako budoucí parametr indikace adjuvantní terapie u pacientů s časným stadiem maligního melanomu.

2 Abstract

- *Introduction*

Malignant melanoma is one of the most aggressive skin tumors with unfavorable prognosis and high mortality, especially in the connection with advanced stages. Regarding the incidence growth, it has recorded an increase of 50 % in the last 10 years. The most important for prognosis of the patient with this malignant disease is early diagnosis and radical surgery without delay. In recent years, the benefit of targeted treatment and immunotherapy has been demonstrated in the patients with locally advanced melanoma after resection of primary tumor and nodal metastases.

- *Aims*

The main goal of our study is to identify patients with a high risk of relapse using biomarkers from fluid biopsy (sections of free DNA circulating in blood) who went through a curative surgical treatment and for whom costly adjuvant therapy would be beneficial. Another goal is to use the above-mentioned biomarkers to detect early recurrence itself and residual disease after excision of the primary tumor site.

- *Methods*

Whole blood samples were collected at regular time intervals from patients with early-stage malignant melanoma undergoing curative surgery. Plasma was first separated from the collected whole blood samples by two-phase centrifugation. Cell-free DNA (cfDNA) was isolated at the MD Anderson Cancer Center in Houston, USA. The presence of the BRAF V600E mutation in patient tissue and plasma samples was determined using droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR). The patients subsequently underwent regular follow-up care at the Department of Plastic Surgery and the Dermatovenerology Clinic of the University Hospital in Pilsen. We then processed the individual results statistically. IBM SPSS Statistics software (v.26.0, IBM Corp.) was used for data analysis. We considered values of $P < 0.05$ to be statistically significant.

- *Results*

Only 52 of the eighty patients included in our study had primary tumor samples available for BRAF V600E mutation determination. Regarding RR (recurrence rate), DFI (disease free interval) and OS (overall survival), the effect of the BRAF V600E mutation in the tumor sample was not proven. In a preoperative plasma samples, the presence of a BRAF mutation was found to be associated with a high risk of both recurrence and death probability compared with BRAF V600E WT. In plasma samples taken one

hour after surgery in 76 patients, the BRAF V600E mutation was found in 26.3 % of cases (n = 20). Compared with patients with ctDNA BRAF V600E WT, patients with ctDNA BRAF V600E mutation had a higher overall recurrence rate, RR within 6 months of surgery and RR within 2 years. Patients with BRAF V600E mutation also showed shorter DFI and OS. In the plasma samples carried out on the second postoperative day, a BRAF ctDNA mutation with a higher risk of recurrence is found again. In all other timepoints, there was no longer a significant difference in RR, DFI or OS between BRAF mutant ctDNA and BRAF WT ctDNA.

- *Conclusion*

Our results point to the fact that by determining ctDNA one hour after surgery, it is possible to identify high-risk patients who would benefit significantly from adjuvant therapy. Although this study still needs to be confirmed in a larger sample of patients, ctDNA testing may be considered as a future parameter for the indication of adjuvant therapy in patients with early-stage malignant melanoma.

3 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 Plzni, 20.06.2023

MUDr. Vlastimil Woznica

4 Obsah

1	Abstrakt.....	2
	• Úvod.....	2
	• Cíle.....	2
	• Metodika.....	2
	• Výsledky.....	2
	• Shrnutí.....	3
2	Abstract.....	4
	• Introduction.....	4
	• Aims.....	4
	• Methods.....	4
	• Results.....	4
	• Conclusion.....	5
3	Prohlášení:.....	6
5	Seznam používaných symbolů a zkratek.....	10
6	Úvod.....	13
7	Cíl práce.....	14
8	Popis současného stavu řešeného tématu včetně literární rešerše.....	15
	a) Etiologie.....	15
	b) Incidence.....	16
	c) Mortalita.....	17
	d) Klinická diagnostika.....	17
	• Asymetrie.....	18
	• Okraje.....	18
	• Barva.....	18
	• Průměr ložiska.....	19
	• Vývoj.....	19
	• ABCD(E).....	19

•	Dermatoskopické vyšetření	20
•	Digitální dermatoskopie	20
e)	Klinické varianty maligního melanomu	21
•	Superficiálně se šířící maligní melanom	21
•	Nodulární maligní melanom.....	21
•	Lentigo maligna melanom.....	22
•	Akrolentiginózní maligní melanom	23
•	Slizniční maligní melanom.....	23
•	Desmoplastický maligní melanom	24
•	Vzácnější varianty maligního melanomu	25
f)	Histopatologická diagnostika	26
•	Histopatologické stanovení diagnózy melanomu	26
•	Imunohistochemické vyšetření.....	26
g)	Chirurgická terapie	28
•	Historický vývoj	28
•	Princip dvojí kožní resekce	28
•	Vyšetření sentinelové uzliny	30
•	Chirurgická terapie regionálních uzlinových metastáz.....	32
h)	Klasifikace a staging.....	35
•	T kategorie.....	35
•	N kategorie	35
•	M kategorie.....	35
•	Staging melanomu na základě výsledků TNM klasifikace	37
i)	Prognóza	39
•	Prognóza na základě klinického vyšetření	39
•	Prognóza na základě histologického vyšetření	41
j)	Adjuvantní léčba.....	45
•	Indikační kritéria adjuvantní terapie	45
•	Cílená terapie.....	47
•	Imunoterapie.....	49
•	Chemoterapie.....	52

• Radioterapie.....	53
k) Metastazující maligní melanom	55
• Chirurgická terapie	56
• Adjuvantní terapie	57
l) Dispenzarizační péče	58
• Stádium 0.....	58
• Stádium IA - IIA.....	58
• Stádium IIB - IV	58
9 Popis řešení a výsledky výzkumu.....	59
• Soubor pacientů a náběrové schéma	59
• Metodika.....	61
• Výsledky.....	63
10 Diskuze	68
11 Shrnutí.....	77
12 Reference	78
13 Přílohy.....	96
14 Poděkování	109

5 Seznam používaných symbolů a zkratk

AJCC	American Joint Committee on Cancer
ALM	Akrolentiginózní maligní melanom
BOLD	Bleomycin, vinkristin, lomustin a dakarbazin
cfDNA	Cell-free DNA
CNS	Centrální nervová soustava
CRS	Cytokine-release syndrome
CT	Computed tomography (výpočetní tomografie)
ctDNA	circulating tumor DNA
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4
CVD	Cisplatina, vinblastin a dakarbazin
ČOS	Česká onkologická společnost
ddPCR	Kapková digitální polymerázová řetězová reakce
DFI	Disease-free interval
DFS	Disease-free survival
DN	Dysplastický névus
DMM	Desmoplastický maligní melanom
DTIC	Dakarbazin
D/T	Kombinace dabrafenibu s trametinibem
EGFR	Epidermal growth factor receptor
E/B	Kombinace encorafenibu a binimetinibu
FISH	Fluorescenční in situ hybridizace
FNA	Fine needle aspiration biopsy
GIT	Gastro-intestinální trakt

HER1	Human epidermal receptor
H/E	Hematoxylin/eozin barvení
IL-2	Interleukin-2
INF- α	Interferon alfa
INF- γ	Interferon gama
IQR	Mezikvartilové rozpětí
LDH	Laktátdehydrogenáza
LM	Lentigo maligna
LMM	Lentigo maligna melanom
LU	Lymfatická uzlina
MRI	Vyšetření magnetickou rezonancí
MAPK	Mitogenem aktivované protein kinázy
n	Rozsah souboru
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NM	Nodulární maligní melanom
N/A	Nepoužitelný (Not applicable)
OR	Odds ratio
ORR	Overall response rate
OS	Overall survival
P	P-value, P-hodnota, signifikance
PD-1	Programmed cell death receptor-1
PD-L1	Programmed cell death receptor ligand-1
PET/CT	Pozitronová emisní tomografie/výpočetní tomografie
PMEL17	Premelanozomový protein 17

PRAME	Preferential expressed antigen in melanoma
RCF	Relative centrifugal force
RFS	Recurrence-free survival
RR	Recurrence rate
RT	Radioterapie
SCP	Skin cancer phototype
SLU	Sentinelová lymfatická uzlina
SOX10	Sry-related HMg-Box gene 10
SSM	Superficiálně se šířící melanom
TILs	Tumor infiltrating lymphocytes
Tis	Tumor in situ
TNF- α	Tumor nekrotizující faktor alfa
TNM	Tumor Node Metastasis systém
TSA _s	Tumor-specifické antigeny
USG	Ultrasonografie
UV	Ultrafialové
V/C	Kombinace vemurafenibu a cobimetinibu
WT	Wild type
⁹⁹ Tc	Izotop technecia 99

6 Úvod

Maligní melanom je nejnebezpečnější kožní tumor vznikající na podkladě maligní transformace melanocytů za standardních podmínek situovaných v úrovni stratum basale kůže (1). Tyto melanocyty produkují tmavý pigment zvaný melanin, který následně distribuují k okolním keratinocytům. S keratinocyty jsou melanocyty spojeny dendritickými výběžky. Obecně na jeden melanocyt připadá přibližně 10 keratinocytů. V konečném důsledku to znamená, že na jednom cm^2 kůže nalezneme u europoidní populace cca 150000 melanocytů.

V případě maligního zvratu melanocytu dochází ve většině případů nejdříve v rámci vrstev kůže k horizontálnímu šíření nádorových buněk. Po určité době dochází k dalším mutacím nádorových buněk a maligní melanom se začíná šířit i vertikálním směrem. Takto nabývá na své invazivitě a výrazně se zvyšuje riziko jeho metastazování. Čím později je maligní melanom diagnostikován a je zahájena jeho léčba, tím horší prognózu má.

Pro příznivou prognózu tohoto onemocnění je zcela nejdůležitější jeho časná odhalení a časná chirurgická terapie, která je stále jedinou skutečně kurativní terapií, i přes to však určité procento pacientů s časným stádiem maligního melanomu do dvou let vyvine lokoregionální či vzdálenou metastatickou recidivu. Přesněji až 13 % pacientů s takzvaným high-risk časným stádiem maligního melanomu vyvine metastázu do dvou let od provedení kurativního chirurgického zákroku (2).

U pacientů po radikálních resekcích III stadia byl prokázán jednoznačný benefit následné adjuvantní terapie oproti prosté resekcí chirurgické terapii (3) (4) přičemž nejlepších výsledků v rámci checkpoint inhibitorů bylo dosaženo užitím PD-1 inhibitorů (5).

Pacienti s časnými stádii onemocnění, u kterých hrozí brzká recidiva ve formě lokoregionálních či vzdálených orgánových metastáz, by tedy významně profitovali z adjuvantní terapie. Je však nutné tyto pacienty určitým způsobem identifikovat. Domníváme se, že využitím metody fluidní biopsie a určením hladin cirkulující tumorové DNA (ctDNA) je možné tyto pacienty určit.

7 Cíl práce

Hlavním cílem projektu je identifikace pacientů s vysokým rizikem recidivy pomocí biomarkerů z fluidní biopsie (volná cirkulující DNA), kteří jsou po operaci s kurativním záměrem, a pro které by byla, finančně nákladná a pro organismus náročná, adjuvantní terapie přínosem.

Dalším cílem je využití uvedených biomarkerů k časnému odhalení vlastní recidivy onemocnění a také ke stanovení minimální reziduální choroby bezprostředně po operačním výkonu.

V případě potvrzení naší hypotézy lze uvažovat o zavedení fluidní biopsie do klinické praxe terapie a dispenzarizace maligního melanomu.

8 Popis současného stavu řešeného tématu včetně literární rešerše

a) Etiologie

Jako u jiných nám známých onkologických onemocnění ani etiologie nádorů melanomového typu není zcela objasněna, je zde mnoho faktorů, u kterých byl jejich vliv více, či méně potvrzen. Bezesporu největší podíl na vzniku maligního melanomu u jedince má působení ultrafialového záření (6). UV záření se dělí dle vlnové délky na neškodné UVC záření s nejkratší vlnovou délkou, které je kompletně zachyceno ozonovou vrstvou atmosféry, tudíž svým působením je pro člověka na Zemi zcela neškodné, dalším typem je UVB záření, které je již jen částečně odstíněno ozonovou vrstvou a vzhledem k tomu, že je snadno zachycováno i tenkou vrstvou tkaniny, definitivně tak činí pouze 5-10 % veškerého UV záření. UVA záření představuje většinu UV záření dopadajícího na člověka, avšak má mnohem nižší energii než UVB a tudíž má v konečném důsledku o něco menší význam než UVB záření (7).

S výše uvedeným přímo souvisí i individuální náchylnost jednotlivců na poškození buněk kůže UV zářením. Záleží tedy především na etnické příslušnosti, kdy zcela nejnáchylnější ke vzniku maligního melanomu je kavkazský typ člověka označovaný též jako europoidní rasa, a naopak zcela nejnižšímu riziku jsou vystaveni jedinci negroidní rasy. Rozdělení do takzvaných fototypů, které se řídí především za základě množstvím pigmentace těla, bledosti pleti a barvou vlasů a očí, kdy nejrizikovější jsou bledí hojně pigmentovaní jedinci se světlými vlasy, nám následně ulehčuje orientaci v této problematice. Míru závislosti rizika na těchto výše zmíněných faktorech dobře shrnuje studie publikována v roce 2018, která byla provedena na více jak třech tisících dánských občanů, kde byli nejdříve vyšetřováni rozdělení na základě schopnosti se opalovat a náchylnosti ke spáleninám do čtyř skupin označovaných jako skin cancer phototype (SCP). V prospektivní studii se prokázala úzká závislost tendence k výskytu nejen maligního melanomu ale i jiných maligních kožních tumorů na SCP (8). Je prokázáno, že UV záření svým působením mimo jiné způsobuje produkci pyrimidinových a pyridinových fotoproduktů, které mají ve svém konečném důsledku za následek oxidativní poškození DNA cílových buněk (9). Tato onkogenní mutace DNA informace způsobí neregulovaný růst a invazi postižených melanocytů do okolí a časem bude zodpovědná i za jejich schopnost metastazovat do regionálních lymfatických uzlin i vzdálených orgánů.

Dalším důležitým faktorem je i doba expozice UV záření. Je známo a mnoha studiemi potvrzeno, že UV záření má kumulativní účinky, a proto

dlouhodobé vystavení UV záření lineárně zvyšuje riziko výskytu maligního melanomu. Tento fakt velmi dobře shrnuje studie na více než dvou tisících pacientů publikována začátkem roku 2022 ve Spojených státech amerických, kde mimo jiných faktorů shrnuje i přímou závislost výskytu maligního melanomu kůže na věku pacientů, kdy u skupiny exponované sluncem ve věku 20-39 let oproti kontrolní skupině stejného fototypu je odds ratio (OR) 1.01 zatímco u skupiny okolo 80 let již dosahuje téměř hodnoty 3 (10). Tato studie také dále potvrzuje široce přijímaný fakt, že u opakovaných slunečních popálenin a světlé barvy očí a vlasů je vyšší riziko maligního melanomu.

Dále na výskyt melanomu mají nemalý vliv také genetické mutace, ať již zvýšenou expresí onkogenů, potlačením onkosupresorických genů či poškozením genů zodpovídajících za reparační mechanismy DNA informace kožních buněk. Jedním z nejdůležitějších genů, které se na této patogenezi podílejí je gen CDKN2A jehož mutace snižuje hladinu proteinu p16, což v konečném důsledku způsobuje vyšší mitotickou aktivitu zasažených buněk a tím významně přispívá k jejich neřízené proliferaci (7), navíc s mutací tohoto onkosupresorického genu má úzký vztah k familiárnímu výskytu melanomu, kdy vykazuje velmi heterogenní autozomálně dominantní typ dědičnosti. Z onkosupresorických genů je také nutné zmínit gen na konečném úseku krátkého raménka prvního chromozomu nebo gen pro protein p53, který se podílí i na rozvoji mnohých jiných malignit. Na sedmém chromozomu se naopak nacházejí mnohé geny pro reparační mechanismy DNA informace buněk kůže. Téměř u 90 % případů melanomů nacházíme onkogenní mutaci N-ras nebo B-raf genů. Již jen mutace jednoho z těchto dvou genů může způsobit maligní transformaci melanocytů. Jen mutace B-raf genu má minimálně 30 různých podtypů, s nejčastěji se vyskytujícím V600E, které ovlivněním signalizačních kaskád RAF,MEK nebo ERK ovlivňují invazivitu a proliferační schopnost maligního melanomu (11).

b) Incidence

Incidence maligního melanomu kontinuálně roste. Jednoznačně nejvyšší incidence je u europoidní rasy v Austrálii. Zatímco místní Aboriginci (původní obyvatelé Austrálie s vysokým kožním fototypem) melanomem téměř netrpí díky jejich fylogenetickému přizpůsobení, u zástupců europoidní rasy, kteří se do Austrálie přistěhovali mezi léty 1851-1854, je incidence maligního melanomu kvůli jejich nízkému kožnímu fototypu a vysoké expozici UV záření nejvyšší na světě (12). Druhá nejvyšší incidence maligního melanomu je na Novém Zélandu. Třetí místo poté zaujímá opět europoidní obyvatelstvo Spojených států amerických. Česká republika je na desátém místě co se týče světové incidence maligního melanomu (13).

Maximum výskytu maligního melanomu je obecně mezi 50. a 75. rokem věku (14).

c) Mortalita

Zcela zásadní pro kurativní léčbu maligního melanomu je jeho včasné odhalení a jeho časná široká totální excize. I přes to, že je kožní maligní melanom díky své lokalizaci na povrchu těla výborně dostupný klinickému vyšetření, mnohdy bývá diagnostikován v pozdních stádiích onemocnění, což má zásadní negativní vliv na přežití pacientů. Hlavním důvodem často bývá obecně nízké povědomí o této problematice na straně pacienta a mnohdy i obtížné stanovení správné diagnózy, kdy senzitivita diagnostiky dle dostupných zdrojů kolísá na základě zkušeností dermatologa s tumory melanomového typu mezi 60-90% s tím, že využití dermatoskopie může senzitivitu zvyšovat přibližně o 5-30% (15) (16) (17). Právě především z důvodu pozdního stanovení diagnózy je mortalita maligního melanomu vysoká. Jak se postupně u maligního melanomu vyvíjí invazivní složka, projevující se především růstem Breslowova indexu (vertikální růst melanomové afekce do hlubších vrstev kůže a podkoží udávaná v milimetrech), snižuje se s lineární závislostí pravděpodobnost desetiletého přežití pacientů až do hodnoty Breslowova indexu 5 mm, kde se již oplošťuje a postupně přibližuje k nulové hodnotě. Je zde však mnoho dalších faktorů, které významně prognosticky ovlivňují další vývoj tohoto onemocnění. Tyto faktory budou dále popsány v kapitole prognóza maligního melanomu.

d) Klinická diagnostika

Zcela nejdůležitější v procesu diagnostiky je inspekce okem zkušeného lékaře a následné doplnění vyšetření dermatoskopem. Maligní melanom na kůži vytváří určité specifické rysy, které musí být objektivně posouzeny a správně vyhodnoceny. Mezi pět nejzákladnějších projevů maligního melanomu patří asymetrický tvar, nepravidelné okraje, barevná heterogenita, průměr kožního ložiska a trvalý vývoj (růst nebo změny) ložiska. Obecně, jsou tato kritéria shrnována jako ABCD(E) pravidlo. Pro lékaře, který neprovádí dermatoskopii by mělo toto pravidlo sloužit k vytrídění rizikových pacientů, kteří by měli být následně odesláni za účelem vyšetření v névové poradně dermatologa, kde bude doplněno dermatoskopické vyšetření s posouzením dalších rizikových faktorů daného kožního ložiska v podobě bodovacích skórovacích hodnocení. V případě, že bude ložisko těmito systémy vyhodnoceno jako rizikové, je nutné provést totální chirurgickou excizi s histologickým vyšetřením. Na základě histologického vyšetření se poté volí další postup. V případě, kdy je ložisko vysoce suspektní, nebo se jedná o typický maligní melanom, je nutné odhadnout na základě vizuálního

posouzení jeho přibližnou hodnotu Breslowova indexu a volit totální širokou chirurgickou excizi s patřičným ochranným lem zdravé tkáně.

- *Asymetrie*

Posuzování asymetrie ložiska má svá úskalí. Jedním z nich je fakt, že dosud nebyla stanovena objektivní metoda, která by jasným a stručným způsobem zcela objektivizovala posuzování asymetrie melanocytárních ložisek. Záleží tak v jisté míře na lékaři, který dané měření provádí. Je zde však možnost, jak alespoň částečně měření objektivizovat, využívá se například k softwarovému vyhodnocování kožních melanocytárních ložisek nebo ve vědeckých studiích. Metoda spočívá v proložení melanocytárního ložiska liniemi asymetrie. Podle toho zda jsme schopni proložit ložiskem jednu nebo dvě a více linií odhadujeme následně jeho rizikovost (18).

- *Okraje*

Další známkou maligního melanomu jsou nejasně ohraničené okraje, jejichž ostrost se může u jednoho ložiska i několikrát měnit. Navíc na okrajích mohou být mnohé zářezy a atypie. Je to většinou dáno povrchním šířením maligních buněk v horizontální rovině kůže. Některé zářezy a výběžky mohou být i výsledkem částečné spontánní regrese ložiska, což je jedno z velmi kontroverzních dermatoskopicky posuzovaných kritérií, které poukazuje na skutečnost, že nejhlubší invazivní komponenta ložiska mohla podlehnout regresi a tudíž Breslowův index může být uměle podhodnocen, nicméně přítomnost tumor infiltrujících lymfocytů (TILs) prokazatelně často spojovanou s výskytem regresních ložisek melanomu poukazuje na schopnost imunitního systému pacienta rozpoznávat buňky s maligním potenciálem a aktivně cíleně je napadat a ničit. Tudíž u těchto pacientů mimo jiné lze předpokládat vyšší účinnost imunomodulační terapie. Bylo zjištěno, že do druhého stádia má histologicky potvrzená regrese ložiska spíše pozitivní prognostický vliv, zatímco u třetího stádia již působí spíše prognosticky negativně (19).

- *Barva*

Barevná různorodost melanocytárního ložiska je vždy významný negativní prognostický faktor. Barvy se mohou pohybovat od sytě tmavých a světlých odstínů hnědé, přes šedavé a namodralé odstíny až po světle růžové a bílé. Šedavé a namodralé odstíny mohou být známkou regresních změn ložisek. Nutné je také podotknout, že maligní melanom může být i amelanotické formy, což se projevuje částečnou a někdy i kompletní absencí hnědého zbarvení. Je to dáno tím, že během získané mutace DNA, kterou je vyvoláno maligní bujení a později i invazivní proliferace tumoru, je poškozena i

schopnost postižených melanocytů tvořit granula melaninu, která jsou zodpovědná za typické tmavé zbarvení těchto tumorů. Tato skutečnost může významně prodlužovat dobu stanovení diagnózy, a tak zásadně zhoršovat prognózu. Diferenciální diagnózou amelanotického melanomu je například basocelulární karcinom, seborrhoeická keratóza, aktinická keratóza, pyogenní granulom či dermatofibrom (20) (21).

- *Průměr ložiska*

Za rizikový průměr melanocytárního névu je považován průměr více jak šest milimetrů. Tato aktuální hodnota rizikového průměru melanocytární afekce přetrvává i navzdory snahám některých studií provedených na území Velké Británie a Austrálie, které poukazují na daty podložená fakta, že přibližně u jedné třetiny reprezentativního vzorku tamějších pacientů byl diagnostikován a histologicky verifikován maligní melanom průměru méně jak 6 milimetrů. U těchto melanomů malého průměru navíc bylo zjištěno, že se jejich průměr, sice velmi pomalu, ale kontinuálně zvětšoval (22) (23).

- *Vývoj*

Vývoj maligního melanomu je stálý a kontinuální. Hlavně ze začátku může být velice nenápadný, avšak právě svou vytrvalostí a kontinuitou je specifický. Můžeme si to představit jako pomalé, avšak vytrvalé zvětšování nějakého pigmentovaného ložiska. Mimo jiné benigní pigmentované léze kůže můžeme u přibližně jedné desetiny pacientů diagnostikovat i takzvaný dysplastický névus (DN). Je to typ benigního névu, který svou stavbou, zbarvením, okraji i průměrem, větším než sedm milimetrů, věrohodně imituje obraz iniciálního maligního melanomu. Jediné, čím se liší od této obávané nosologické jednotky, je to, že se po určité době jeho růst zcela zastavuje. DN se také často objevuje na dvojitě chráněných lokalitách, tudíž ne v typických melanomových slunci exponovaných lokalizacích. Nebo se DN vyskytují v rámci syndromu dysplastických névů, kdy se na pacientovi nachází alespoň 7 DN. U tohoto syndromu nám poté údaje a pečlivá fotodokumentace pomohou odlišit rizikové léze od těch méně rizikových. K tomuto účelu se mohou u pacientů se syndromem DN využívat i celé řady softwarových programů na odlišení maligních ložisek od těch benigních, které v určitých intervalech zaznamenávají nálezy na těle a poté automaticky porovnávají vývoj jednotlivých ložisek a označují ta riziková. Jedním z nejvíce užívaných je mole-map s výbornými výsledky (7) (24).

- *ABCD(E)*

Zvážíme-li všechna kritéria ABCD(E) pravidla, Za každé kritérium, které pacient splňuje, udělíme bod. Ve chvíli, kdy pacient dosáhne 3 bodů, již stanovujeme diagnózu suspektního melanomu. V takovém případě by měl být

pacient odeslán k dalšímu vyšetření do névové poradny, kde bude provedeno dermatoskopické vyšetření.

- *Dermatoskopické vyšetření*

Po odhalení rizikové léze u pacienta je nutné tuto lézi dermatoskopicky vyšetřit. K tomuto vyšetření se užívá dermatoskop, což je lupové zařízení s cirkulárním osvětlením, pomocí kterého zkušený dermatolog může posoudit pigmentové a cévní změny suspektního ložiska. Byla vypracována různá dermatoskopická kritéria pro hodnocení rizikovosti melanocytárních lézí, z nichž nejvyšší senzitivitu (okolo 95 %) má schéma dle Dal Pozza z roku 1999, které hodnotí postupně 7 dermatoskopických rysů. Tyto rysy dělíme na velká kritéria a malá kritéria. Pro potvrzení suspekce na maligní melanom nám stačí získání 2 bodů. Za každé pozitivní velké kritérium jsou 2 body a za každé malé kritérium je bod jeden (7). Mezi velká kritéria tedy patří přítomnost regresních ložisek v podobě šedomodrých ploch, atypická pigmentová síť a změny na cévních strukturách. Mezi malá kritéria poté patří radiálně uspořádané pigmentové proužky či výběžky vycházející z okrajů ložisek, dále přítomnost skvrnitých pigmentací, nestejnorodé globule pigmentů a jizvy připomínající struktury s vymizením pigmentace.

Stačí tedy, aby suspektní ložisko vykazovalo pouze jedno z velkých kritérií nebo dvě malá kritéria, aby byla pacientovi doporučena časná totální excize ložiska s histologickým vyšetřením.

- *Digitální dermatoskopie*

Digitální zaznamenání ložiska má hned několik výhod. Zaprvé, digitální záznam může napomoci stanovení diagnózy maligního melanomu cestou zabudovaného softwaru, schopného stanovit s poměrně vysokou přesností suspektní ložisko. Nicméně nikdy nesmí být vlastní vyšetření dermatologem nahrazeno pouze digitální dermatoskopií. Ta se využívá pouze jako doplňující vyšetření pro zvýšení senzitivity. Senzitivita vyšetření zkušeným dermatologem může dosahovat až 96 % a využití doplňující digitální dermatoskopie může tuto senzitivitu ještě zvýšit (25).

Další nespornou výhodou digitální dermatoskopie je vytěžení digitálních snímků tumorů kůže a možnost využití takzvané teledermatologie. Teledermatologie je termín, který vznikl okolo roku 1995 s příchodem moderních fotografických zařízení a vzniku prvních digitálních záznamů melanocytárních afekcí, které se daly uložit do pracovního programu a externí specialista mohl následně v reálném čase posoudit a vyhodnotit suspektní léze. Dále se objevily i termíny teledermatoskopie a teledermatopatologie.

Dále se mohou tyto snímky uchovávat a případně zpětně posuzovat samostatně nebo v rámci porovnání v časovém horizontu s dalšími aktuálnějšími snímky anebo mohou posloužit při retrospektivních studiích.

e) Klinické varianty maligního melanomu

Maligní melanom může mít hodně podob. Je důležité, aby byl lékař o těchto variantách maligního melanomu informován, jelikož některé varianty svým specifickým chováním mohou působit poměrně značné diagnostické obtíže. Jednotlivé klinické typy maligního melanomu se mohou lišit například v lokální agresivitě ložiska, věkovém zastoupení nemocných, diferenciální diagnostice, mediánu přežití, tendencích ke vzdálenému metastazování, a tudíž i v terapeutickém přístupu k jednotlivým variantám. Jedno mají však všechny varianty maligního melanomu společné, a to že se jedná bezesporu o extrémně agresivní nádor s časným metastazováním lymfatickou a někdy i hematogenní cestou, jehož základní podmínkou dobré prognózy je jeho časná diagnostika a radikální chirurgický zákrok.

- *Superficiálně se šířící maligní melanom*

Tato klinická varianta maligního melanomu označovaná zkratkou SSM je bezpochyby nejčastějším typem maligního melanomu zastoupeným v 60 až 70 %, kdy nejvíce případů se objevuje mezi 30 a 50 lety života. Nejčastěji vzniká de novo u mužů na hrudníku a u žen na bérkách jako plochá pomalu se rozšiřující barevně nehomogenní nepravidelná hnědá makula. Pouze z jedné třetiny vzniká již z předešlé melanocytární léze. SSM je typ maligního melanomu, u kterého v počátečním stádiu zcela převládá radiální růstová fáze, při které se melanom rozšiřuje do svého okolí v horizontální rovině v úrovni epidermis. Tato fáze růstu může trvat i několik let. Následně dochází k rozvoji vertikálního růstu a tím rapidnímu zvyšování Breslowova indexu což je úzce spjata s radikálním zhoršením prognózy pacienta. Takto tedy vzniká sekundární nodulární maligní melanom s origem v SSM, který již vykazuje známky rychlejší progresse a vyššího rizika metastazování (26). 5leté přežití SSM je lehce vyšší než u ostatních typů maligního melanomu, kdy úzce souvisí i se stádiem onemocnění. U prvního stádia onemocnění se pohybuje až okolo 99 % u druhého stádia to je již 71 % (27).

- *Nodulární maligní melanom*

Druhou nejčastější variantou maligního melanomu je primárně nodulární melanom. Je to primárně invazivní typ maligního melanomu s celkovým zastoupením 15 až 30 % z celkového objemu pacientů s maligním melanomem, který zcela vynechává horizontální fázi růstu a roste již od začátku vertikálním směrem. Standardně tvoří už od počátku tmavou barevně homogenní bulku s relativně rychlým růstem, které si pacient většinou časně

všímá a do několika měsíců se dostaví na vyšetření k lékaři. Udává se, že 5 až 30 % nodulárních melanomů bývá částečně či úplně amelanotických. Tyto poté mohou imponovat spíše jako pyogenní granulom, či jiné benigní léze (28) (7). Vyskytuje se převážně u pacientů starších padesáti let. Pro jeho procentuálně nižší zastoupení a jeho ne zcela typické chování je jeho diagnostika obtížnější. Svým vertikálním růstem ohrožuje pacienta rizikem vzdáleného metastazování. Tumory s Breslowovým indexem pod 0,75 mm metastazují zcela raritně, oproti tumorům indexu nad 4 mm, kdy je již riziko vzdálených metastáz vyšší jak 40 % (28).

- *Lentigo maligna melanom*

Lentigo maligna melanom (LMM) vzniká v terénu lentiga maligna (LM), které je považováno za prekancerózu nebo také subtyp melanoma in situ, a které nevykazuje známky invazivního růstu ani tendence k metastazování. Lentigo maligna, označované též jako melanosis praecancerosa a Hutchinsonova skvrna, je hnědá velice pomalu plošně se rozšiřující makula nepravidelného tvaru a mnohdy nehomogenně kolorovaná, která může dosahovat relativně velkých rozměrů v rozsahu až celé tváře. Vyznačuje se atypickou proliferací melanocytů v úrovni basální membrány epidermis a postihuje především pacienty středního věku (29). Pokud to rozsah ložiska dovoluje, terapeutickou metodou volby LM je totální chirurgická excize, eventuálně lze využít lokálního ošetřování či radioterapie ve spojení s dispenzarizací pacienta (30).

Lentigo maligna melanom vzniká při invazi melanocytů za hranici basální membrány do dermis. Vývoj melanomu v terénu lentiga maligna trvá přibližně 5 až 20 let a v drtivé většině se vyskytuje u pacientů starších 65 let. Pravděpodobnost vzniká LMM v terénu LM se udává od 5 do 50 % s tím, že čím je pacient starší a v minulosti více exponovaný UV záření, tím je riziko zvratu vyšší (7). Zastoupení LMM na absolutním počtu maligních melanomů je od 5 do 15 % (29). Svým invazivním růstem do dermis vytváří LMM nodulus v jinak plochém hladkém terénu lentiga melanoma, což musí být pro lékaře alarmující známkou agresivního chování. Takto zjištěné ložisko LMM musí být časně chirurgicky vyňato s patřičným ochranným lemem zdravé tkáně a zajištěno případným dalším managementem vycházejícím z definitivních histologických výsledků. Přes to, že totální chirurgická excize je terapeutickou metodou volby, často nastává případ, kdy nelze primární ložisko LM pro jeho extenzivitu odstranit a po totální excizi ložiska LMM se přistupuje k ošetření zbylého ložiska LM radioterapeutickou metodou, nebo lokálními aplikacemi retinoidů či imiquimodu, což je jednou z možností imunoterapeutických postupů.

Zatímco prognóza časně řešeného LM ještě před rozvojem invazivní složky je výborná, prognóza LMM je již shodná s ostatními invazivními typy maligních melanomů a zcela závisí na hloubce invaze dle Breslowa a na přítomnosti lokoregionálních či vzdálených metastáz (30).

- *Akrolentiginózní maligní melanom*

Akrolentiginózní maligní melanom (ALM) je jedním z agresivnějších typů maligního melanomu, který se vyskytuje především na plantárně na chodidlech, dlaních a subunguálních lokalizacích končetin, kde vzniká predominantně v mechanicky zatížených a opakovaně zraňovaných oblastech (31). Patří již mezi méně časté typy, kdy tvoří přibližně 5 % veškerých maligních melanomů. Je však nejčastějším typem u pacientů negroidní rasy, kdy u afroamerické populace tvoří až 70 % všech maligních melanomů (32). ALM má signifikantně horší prognózu oproti běžnějším typům maligního melanomu jako je SSM a NM (32) a může mít až ve 28 % případů nepigmentovanou formu (33). U subunguálního melanomu platí, že v drtivé většině postihuje první prst ruky nebo nohy, tedy palce horních a dolních končetin. Subunguální maligní melanom velice často imituje benigní ložiska jako je onychomykóza, melanonychie benigního origa, subunguální hematoma nebo inkarnovaný nehet, která se typicky vyskytují na palcích dolních i horních končetin, a tak dlouhé měsíce setrvává neodhalen. Přitom právě nehojící se ložisko, by mělo lékaře upozornit na atypický průběh hojení a vyvolat pochybnosti, které povedou ke správné diagnostice ložiska. Bohužel k prvnímu vyšetření se pacienti obvykle dostaví až ve chvíli, kdy ložisko již činí delší dobu symptomatické obtíže a často bývá lokálně pokročilé nebo již vyvinulo regionální lymfatické metastázy (7) (34).

- *Slizniční maligní melanom*

Je obecně známo, že slizniční epitel je složen také z melanocytů, které do této lokality pronikají již v raných fázích ontogeneze z neurální lišty. Jejich hlavní funkce ve sliznicích není zcela objasněna, nicméně bylo zjištěno, že mají antibakteriální a imunitní funkci a mimo jiné se také podílejí na neutralizaci volných kyslíkových radikálů (35).

Primární slizniční metastázy vznikají vzácně a zastupují méně jak 1 % všech maligních melanomů u europoidní rasy. Nejčastěji se setkáváme se slizničními melanomy jícnu, dále pak močové trubice, laryngu, plic a u mužů relativně často také s maligním melanomem penisu (36). Prvními příznaky bývají až v pokročilých stádiích obstrukce či krvácení do gastro-intestinálního traktu (GIT). V případě postižení uropoetického systému to poté mohou být hematurie nebo dysurie. V některých případech bývají prvními symptomy až metastatická postižení lokoregionálních lymfatických uzlin, kdy až

histologický výsledek metastáz maligního melanomu vnukne podezření na jeho slizniční formu (36). Raritními nebývají ani amelanotické formy.

V diferenciální diagnostice hrají hlavní roli především metastázy z jiné primární melanomové léze, kdy se především nabízí kožní maligní melanom, či maligní melanom oka. Proto musí být nemocný zevrubně dermatologicky a oftalmologicky vyšetřen a nesmí být opomenuta ani zobrazovací vyšetření na přítomnost vzdálených a lokoregionálních metastáz.

Radikální chirurgická excize nebo resekce je metodou volby u tohoto onemocnění. Bohužel velice často se toto onemocnění diagnostikuje v pozdějších fázích, a tudíž je nutné doplnit radikální chirurgickou léčbu o adjuvantní imunoterapii či cílenou léčbu a mnohdy také není radikální výkon možný vůbec. Právě pro pozdní diagnostiku se pětileté přežití pacientů se slizničním maligním melanomem obecně pohybuje okolo 10 až 20 %. Výjimkou je zde conjunktivální maligní melanom, jehož pětileté přežití v některých studiích přesahuje i 85 % (36) (37).

- *Desmoplastický maligní melanom*

Desmoplastický maligní melanom (DMM) je vzácnou nebezpečnou variantou maligního melanomu, u které již jen histologické zařazení mezi melanomy bylo v minulosti poněkud rozpačité. Tato nosologická jednotka původně označovaná jako invazivní vřetenobuněčný nádor byla jako desmoplastický melanom označena až v roce 1979. DMM má zastoupení v méně jak 1 % všech maligních melanomů (38) (7). Svým makroskopickým vzhledem a chováním bývá velice atypický od ostatních maligních melanomů. Jeho diagnostiku a prognózu zhoršuje fakt, že svým vzezřením může připomínat velké množství benigních lézí, jako je například pouhá hypertrofická jizva, dermatofibrom, neurofibrom nebo aktinická keratóza, z maligních lézí může imitovat především bazocelulární karcinom, spinocelulární karcinom, či tumory měkkých tkání (39). Udává se, že pouze jedna třetina DMM je správně diagnostikována na základě klinického vyšetření.

Velkým rozdílem od ostatních maligních melanomů je u DMM jeho nižší tendence k lokoregionálnímu a vzdálenému metastazování do uzlin a lymfatických cest a jeho sklony k častějším lokálním recidivám. Věkový medián je vyšší od běžnějších typů maligních melanomů a to 60 až 70 let (40).

Ačkoli některé studie vyjadřují pochybnosti stran prognostické výtěžnosti hloubky invaze a postižení lymfatických spádových uzlin a jako jediné prognostické faktory udávají provedení totální široké excize a doplnění

adjuvantní radioterapie (41), je obecně doporučováno přistupovat k tomuto typu maligního melanomu standardním přístupem kožního maligního melanomu a případně doplnit radioterapeutické ošetření pro snížení rizika lokální recidivy (42) (7).

- *Vzácnější varianty maligního melanomu*

Uveální maligní melanom je jedním z nejčastějších primárních maligních nitroočních tumorů u dospělých pacientů, který představuje přibližně 3 % všech maligních melanomů. Tato varianta na rozdíl od ostatních metastazuje výhradně hematogenně, a to nejčastěji do jater, ale také do plic, kostí a jiných melanomu typických lokalit. Zde se poté v závislosti na rozsahu postižené tkáně oční chirurg rozhoduje k resekčnímu řešení v podobě iridektomie, iridocyklektomie, iridocyklektogoniekтомie eventuelně enukleaci bulbu. V případech postižení ciliárního tělíska či choroidey se dá využít vedle chirurgické terapie též konzervativní laserové nebo radiační terapie a dispenzarizační péče (43).

Mezi další raritní typy maligního melanomu se zastoupením méně jak 1 % všech melanomových lézí můžeme zařadit névoidní melanom, což je varianta, kterou klinicky ani histologicky nelze od běžného melanocytového névu odlišit, a tudíž se projevuje až lokoregionálními či vzdálenými metastázami. Často napodobuje intradermální névus či seborhoickou veruku a je stanoven až s časovým odstupem retrospektivně. Dalším typem může být maligní modrý névus vznikající z původního modrého névu či jej připomínající. Ten vykazuje vysokou agresivitu a časně metastazuje. Maligní melanom může však připomínat i některé cévní léze svou angiomatoidní formou se známkami výrazné cévní proliferací aktivity. V neposlední řadě je nutné zmínit i světlobuněčný sarkom, což je melanom měkkých tkání lokalizovaný a proliferující podél šlach a aponeuróz prokazován až pozitivitou imunohistochemických vyšetření (7).

Jak můžeme vidět na výčtu výše, maligní melanom může imitovat velké množství benigních lézí, přičemž může být někdy velice obtížné ne-li nemožné diagnostikovat některé varianty v časném stadiu. Proto je nutné mít na paměti i tyto atypické varianty a včas při sebemenších pochybách volit totální neširokou excizi kožní léze doplněnou o patřičné histologické vyšetření.

f) Histopatologická diagnostika

Histologické vyšetření preparátu s maligním melanomem je zcela zásadní pro určení správného postupu léčby na základě přesného zařazení pacienta v rámci American Joint Committee on Cancer (AJCC) klasifikace. V dnešní době již existuje mnoho prognostických faktorů, které se stanovují histopatologicky, a podle kterých se následně řídíme při vybírání optimálního terapeutického postupu.

- *Histopatologické stanovení diagnózy melanomu*

Se stále narůstajícím všeobecným povědomím o maligním melanomu jsou k histologickému vyšetření odesílány stále menší a spornější preparáty. To někdy vyžaduje kromě cytologického a architektonického posouzení preparátů také doplnění imunohistochemického vyšetření, které zásadně napomáhá v určení správné diagnózy.

Z cytologického hlediska nádorové buňky vykazují, jak jaderné, tak cytoplasmatické odchylky od normálních melanocytů. Jádra bývají hrubá a nepravidelná. Cytoplasma často obsahuje partikule melaninu. Melanom je také typický mitotickou aktivitou svých buněk i v hlubších vrstvách, kde se za normálních podmínek u běžných névů vyskytují spíše buňky se známkami vyzrávání (7).

Jednotlivé varianty melanomu se mezi sebou poté ještě liší vzorem radiálního šíření, dominantním typem buněk radiální a vertikální komponenty, přítomností desmoplazie, tedy nadměrného množství vazivové tkáně složené převážně z kolagenu v nádorové hmotě, různou mírou neurotropismu a frekvence regresí.

Poté vedle stanovení diagnózy a určení typu maligního melanomu, je velmi důležité stanovit také histologické prognostické faktory, mezi které patří především Breslowův index, tedy maximální hloubka invaze vertikálního růstu udávaná v milimetrech, což je zcela jednoznačně nejdůležitější prognostický faktor většiny melanomových lézí, dále také přítomnost ulcerací na povrchu ložiska maligního melanomu a množství mitóz, které se udává v jednotkách na mm². Poté je ještě důležitým prognostickým údajem lymfocytární infiltrace v ložisku tumoru, paraneurální proliferace a angioinvaze (44). Tyto a další prognostické faktory budou dále jednotlivě probrány v příslušné kapitole.

- *Imunohistochemické vyšetření*

Jak již bylo nastíněno, v případě nejistoty, zda jde skutečně o maligní melanom, můžeme využít metod imunohistochemie

Mezi široce využívané markery pro melanocytární diferenciaci patří především marker pro kalcium vázající cytosolový S-100 protein, který má velké množství nitrobuněčných funkcí mezi které náleží také regulace apoptózy, diferenciaci, proliferace a migrace buněk (45).

Dalším markerem je HMB-45, což je monoklonální protilátka reagující s premelanozomovým proteinem 17 (PMEL17), tedy transmembránovým glykoproteinem, který je antigenem specificky se vyskytujícím u melanocytárních tumorů (46).

Často, v kombinaci s ostatními markery, je využíván marker pro Sry-related HMg-Box gene 10 (SOX10), což je gen, který je zodpovědný za tvorbu transkripčních faktorů ovlivňující v embryonální fázi diferenciaci buněk neurální lišty v melanocyty (47). Stejně tak produkty tohoto genu často bývají přítomny i u nádorových buněk melanomů. Dále bylo zjištěno, že specificitou i senzitivitou se tento marker může rovnat markeru pro S-100 protein (47) a v poslední době je již marker S-100 v některých případech nahrazován markerem SOX10 (48).

Dalším široce využívaným markerem je Mart-1/Melan-A což jsou markery pro transmembránové proteiny v melanocytech. Tudíž, tento marker má vysokou specificitu a senzitivitu na melanocyty, avšak nerozlišuje, zda jde o buňku s benigním či maligním potenciálem. Hodí se tedy především na odlišení maligního melanomu od jiných nemelanocytárních nádorových lézí (49).

Dalším často vyhodnocovaným a příhodným prognostickým markerem je marker pro tumor supresorový protein p16, který způsobuje deceleraci buněčného cyklu. U melanomových lézí můžeme pozorovat jeho jaderný úbytek a to u 50 až 98 % maligních melanomů (50) (51).

Velmi příhodným je marker pro protein Ki-67, který je tvořen během mitózy melanocytů a jehož funkcí je tvořit perichromozomální obal, který udržuje strukturu jádra a brání agregaci chromozomů (52). U benigních melanocytových névů je tato mitotická aktivita nižší jak 5 % a vyskytuje se převážně na povrchu léze oproti malignímu melanomu, kde často převyšuje výrazně hranici 5 %. S rostoucím Ki-67 skóre narůstá i riziko metastatického postižení a klesá OS (53) (54) (7).

Preferential expressed antigen in melanoma (PRAME) je antigenem s vysokou senzitivitou vyšetřovaným v případě sporných závěrů (55).

Mezi další vyšetřované markery patří například CSPG4, MITF a pHH3.

g) Chirurgická terapie

- *Historický vývoj*

Chirurgické radikální odstranění melanocytárního ložiska v jeho časném stádiu je jedinou kurativní terapií.

Začátkem dvacátého století anglický chirurg William Handley ve svém světově prvním vědeckém pojednání na téma bezpečnostního kožního okraje excize primárního melanomu uvádí jako doporučený okraj pět centimetrů. Ve svém pojednání vycházel ze svých patologických prací, kde nacházel mikrosatelity až do vzdálenosti 5 cm od vlastního maligního ložiska.

Okolo roku 1960 začaly přibývat vědecké práce týkající se maligního melanomu a jeho prognózy v závislosti na čase, kdy na základě těchto prací byl stanoven koncept časného chirurgického zákroku a histologického vyšetření, který zásadně změnil do té doby zcela nepříznivou prognózu. Po opakovaných příliš extenzivních odstranění zdravé tkáně v okolí časnějších ložisek tumorů, byla zvažována redukce 5 cm zdravého lemu.

Začátkem 21. století se hranice ochranného lemu posunula na maximum 3 cm, které bylo doporučováno u melanomů s Breslow index nad 4 mm.

Postupně vývoj chirurgické terapie dosáhl své nynější formy dvojí resekce (56).

- *Princip dvojí kožní resekce*

Primární výkon, nejčastěji takzvaná excizní biopsie nebo také neširoká excize, spočívá v odstranění vlastního ložiska suspektního maligního melanomu i s dostatečnou vrstvou podkoží, což nám umožní kompletní histologické vyšetření ložiska. Nejdůležitější histologické údaje stran stagingu a plánování dalšího postupu je hloubka invazivní komponenty (Breslow index) a přítomnost ulcerace povrchu maligního melanomu. Punkční biopsie ani excize dle Moha není doporučována, jelikož nemusí být zasažena nejhlouběji invadující část tumoru a ztrácíme přehled o přesné hloubce invaze maligního melanomu.

Druhá etapa spočívá, v případě potvrzení melanomového ložiska, v definitivní chirurgické excizi až ke svalové fascii s přesně definovanou šíří okrajů od jizvy po předchozí neširoké excizi a eventuálním vyšetřením sentinelové uzliny, pokud je vyšetření sentinelové uzliny indikováno. Šíří okrajů u definitivní široké excize volíme na základě Breslowova indexu. U melanoma in situ volíme excizi se zdravým okrajem 0,5 cm. U melanomu s Breslowovým indexem pod 1 mm volíme excizi s 1 cm okrají. U melanomu s Breslowovým indexem 1 mm a více volíme excizi s 2 cm lemem. Zdravý lem

nad 2cm již nevykazuje prognosticky signifikantní rozdíly (57). Hloubka zákroku se rovná šíři ochranného lemu excize (58). Když není svalová fascie zasažena jizvou po předchozí excizi a není podezření na infiltraci svalové fascie maligním melanomem (například velmi tenké podkoží a vyšší Breslow index), facii na spodině excize ponecháváme in situ (59). Reexcizi jizvy s ochranným lemem vždy odesíláme na histologické vyšetření.

V případě klinicky jasného maligního melanomu se provádí během dermatoskopie odhad hloubky kožní invaze ložiska a na základě tohoto odhadu poté volíme šíři ochranného lemu. Obecně lze říci, že u superficiálně se šířícího maligního melanomu (SSM) volíme excizi s ochranným lemem zdravé tkáně 1 cm. U nodulárních maligních melanomů a melanomů, které vykazují vertikální růst, již volíme excizi s lemem 2 cm. U melanomů, kde si nejsme jisti, zda nejde pouze o dysplastický névus, můžeme zvolit excizi s 0,5 cm lemem zdravé tkáně.

U maligních melanomů lokalizovaných v oblasti hlavy a krku je obecně doporučováno v nutných případech, jako je blízká lokalizace oka, víček, nosu a úst, snížit ochranný lem na 1 cm. Bohužel zatím nebyla provedena jediná randomizovaná dvojitě zaslepená studie na velkém souboru pacientů, která by tento fakt definitivně potvrdila. Poslední nerandomizovaná studie čítající 79 pacientů však toto doporučení potvrdila (60). Stejně tak tato doporučení potvrzuje nerandomizovaná retrospektivní studie čítající 368 pacientů, která navíc potvrzuje i nezávislost na přítomnosti ulcerace (61).

U ušního boltce se doporučuje klínovitá resekce zvykle dle hloubky invaze i s chrupavčitou komponentou, eventuelně i subtotální amputace boltce (7) (62) (63).

Rozsah chirurgického zákroku na akrech horních končetin se řídí dle lokalizace ložiska. Může být situován pod nehtem statisticky nejčastěji palce, poté může být na dorzech a dlaních horních končetin. Histologicky převažuje především akrolentiginózní typ maligního melanomu (ALM), druhým nejčastějším typem je SSM, který zasahuje hlavně dorza rukou a následně třetím nejčastějším typem maligního melanomu je nodulární maligní melanom (NM) (64). Ve francouzské studii provedené v letech 1996-2004 na 126 pacientech bylo zaznamenáno, že 28 % pacientů mělo nepigmentovanou formu ALM (33). Šíře ochranných okrajů excize je standardní. Z onkologického hlediska není nutné odstraňovat kost pod ložiskem melanomu, nicméně v subunguální lokalizaci to znamená většinou minimálně parciální amputaci distálního falangu eventuelně celého distálního článku v závislosti na hodnotě Breslowova indexu. V případech dorza nebo dlaně ruky můžeme přistoupit k široké excizi, až na kostěné a šlachové struktury se zachováním

nervově-cévních svazků a následné rekonstrukci dle možností lokality místním lalokem nebo kožním transplantátem. Existují studie potvrzující vyšší agresivitu akrálního melanomu oproti melanomům neakrálních stejného stadia, dále také vyšší agresivitu ALM oproti jiným typům akrálního melanomu (65) (66).

U slizničních melanomů je doporučeno oslovení příslušného specialisty dle lokalizace (otorhinolaryngolog, stomatolog, gynekolog, gastroenterologická chirurgie atd.) (7).

- *Vyšetření sentinelové uzliny*

Bylo zjištěno, že hned druhým nejdůležitějším prognostickým faktorem maligního melanomu je stav sentinelové uzliny příslušné spádové lymfatické oblasti. Tato zjištění potvrzuje i fakt, že vedle hodnoty breslowova indexu je využíván v TNM klasifikaci osmého vydání AJCC pro maligní melanom.

Maligní melanom nejčastěji metastazuje do kůže a podkoží (satelitní nebo intranzitní metastázy) a do regionálních lymfatických uzlin (67). Když už se maligní melanom metastaticky šíří, děje se to v drtivé většině případů lymfatickou cestou (68). Metastázy do lymfatických uzlin rozdělujeme na mikroskopické a makroskopické. Mikroskopické metastázy jsou klinicky němé a zjišťujeme je právě exstirpací sentinelové uzliny. Makroskopické metastázy jsou naopak již dobře patrné při palpačním klinickém vyšetření. Jelikož přibližně 20 % pacientů s klinicky negativními uzlinami má metastatické postižení spádového lymfatického regia a zároveň jsou zaznamenávány i případy klinicky manifestujícího se postižení lymfatických uzlin, které při následné biopsii vyjdou negativně, je pouhé klinické vyšetření lymfatických uzlin v určitých případech insuficientní a musí být doplněno biopsií sentinelové uzliny. Sentinelová, neboli obranná lymfatická uzlina (SLU), je první uzlina nebo skupina uzlin na lymfatické drenážní cestě z místa kožního tumoru. Vyznačuje se tím, že v případě metastazování maligního melanomu lymfatickou cestou, se s největší pravděpodobností zachytí první metastázy v této obranné uzlině. Proto její vyšetření následně vypoví o závažnosti a chování maligního melanomu a mnohdy rozhoduje o zahájení adjuvantní terapie. Je důležité zmínit, že se nejedná pouze o pozitivitu nebo negativitu histologického vyšetření sentinelové uzliny, ale že je velmi důležitá také míra postižení SLU metastazujícím melanomem. Infiltrace sentinelové uzliny maligním melanomem může mít podobu pouhých jednotlivých buněk či drobných shluků nádorových deposit, v pokročilejších stádiích již můžeme zaznamenat rozsáhlá subkapsulární metastatická ložiska a v nejzávažnějších případech popisujeme kompletní konsumpci SLU s extrakapsulární propagací (68). Samozřejmě stran

prognózy onemocnění záleží nejen na pozitivitě či negativitě výsledku, ale i na kvalitativním postižení SLU.

Vyšetření sentinelové uzliny je indikováno, v případě že ještě nejsou patrné klinické či radiologické manifestace postižení příslušných spádových uzlinových regií, na základě hloubky invaze maligního melanomu dle Breslowova indexu, a to u hodnoty vyšší jak 0,8 mm v případě melanomu bez ulcerace a u melanomů s ulcerací či známkami výrazné spontánní regrese s Breslowovým indexem nižším jak 0,8 mm.

Vlastní provedení vyšetření SLU je následující. Jeden den před vlastním bioptickým vyšetřením SLU je do oblasti primárního ložiska maligního melanomu aplikován koloidní roztok s obsahem síry nebo albuminu značených radioaktivním izotopem technecia 99 (^{99}Tc). To se aplikuje radiálně kolem celého ložiska cca 5-10 mm od makroskopicky postižené tkáně a jednotlivé sousední vpichy by od sebe neměly být vzdáleny více jak 1 cm (7). Bezpečný objem podané látky je 0,3ml. Následně v den operace s přibližně 24hodinovým časovým odstupem od aplikace radiofarmaka jsou zhotoveny za využití gamakamery předozadní snímky a snímky v bočné projekci, které popíší, která regie jsou trasována a jakého rozsahu a kolik SLU bylo označeno. Poté je ruční gamasondou na kůži nalezen bod s nejvyšší aktivitou a ten je označen fixem. Nebývá výjimkou zasažení více spádových lymfatických oblastí, jako jsou obě axily nebo zcela jiné vzdálenější lokality, a to hlavně v případech maligního melanomu trupu, kdy může být například v případě maligního melanomu zad namísto nejbližší ipsilaterální axilly zasažena kontralaterální tříselná krajina.

Dále je již proveden vlastní chirurgický výkon, kdy se z menšího řezu nad maximální aktivitou SLU provede vlastní exstirpace SLU pod kontrolou sterilní ruční gamasondy. Kožní řez orientujeme tak, aby se dal případně v prodloužení využít k exenteraci příslušné lymfatické spádové krajiny. Po exstirpaci provádíme kontrolu lůžka po SLU, které nemá vykazovat aktivitu vyšší jak 10 % aktivity exstirpované SLU. Sentinelová uzlina je fixována ve formolu a odeslána ke standardnímu histopatologickému vyšetření.

Prvotní histopatologické hodnocení uzliny se provádí s využitím standardního barvení Hematoxylinem a eozinem (H/E). Dále je však nutné využít i další typy imunohistochemického barvení, jelikož při klasickém H/E barvení nemusejí být veškeré drobné shluky melanomu odhaleny pro jejich histologickou podobnost s ostatními strukturami lymfatických uzlin například makrofágy. Z imunohistochemických vyšetření můžeme uvést například barvení proti S100 proteinu a HMB-45 nebo proti glykoproteinu 100. Každá z

těchto metod vykazuje vysokou senzitivitu při detekci buněk maligního melanomu.

Podle velikosti metastáz maligního melanomu do SLU rozdělujeme metastázy do 4 skupin. Nejmenší metastázy tvoří izolované nádorové buňky, tato ložiska bývají menší jak 0,2 mm v největším průměru. Další, větší ložiska do 2 mm včetně, označujeme jako mikrometastázy. Fokální metastázy jsou 2-5 mm v průměru a největší metastázy nad 5 mm v průměru označujeme jako extenzivní.

Dle výsledku histologie se poté volí další postup. V případě pozitivních SLU, vyjma pozitivní SLU hlavy a krku, je již od doplňování okamžité exenterace příslušných oblastí ustupováno na základě několika randomizovaných studií v řádech tisíců pacientů, které neprokázaly pro pacienty podstupující tuto proceduru žádný signifikantní benefit (69) (70). Hlavní význam vyšetření SLU, kromě stanovení přesnější prognózy pacienta, spočívá v určení přesného stádia onemocnění a tím identifikaci pacientů s vysokým rizikem recidivy a špatnou prognózou, u kterých následně indikujeme adjuvantní terapii. U pozitivních SLU hlavy a krku se však stále disekce krčních uzlin a eventuálně dalších hlavových regií doporučuje (71).

- *Chirurgická terapie regionálních uzlinových metastáz*

V případě klinicky manifestních lymfatických uzlin, tedy makroskopických regionálních metastáz ve spádové lymfatické oblasti histologicky ověřeného maligního melanomu, není nutné doplňovat další vyšetření a je indikováno provedení exenterace (7). V případě lymfadenopatie nejasné etiologie volíme nejdříve exstirpaci postižené uzliny a teprve po histologické verifikaci maligního melanomu provádíme exenteraci postižené lymfatické oblasti. 10leté přežití pacientů s klinicky manifestním regionálním uzlinovým postižením a po absolvování kompletní disekce postiženého regia bývá až u 40 % případů. Výkon kompletní lymfadenektomie musí být extenzivní, jelikož je při makroskopickém metastatickém postižení uzliny vysoká pravděpodobnost postižení i uzlin okolních a také riziko extrakapsulární propagace metastázy. Proto v této indikaci bioptická vyšetření jednotlivých uzlin nebo parciální disekce nejsou doporučovány.

Mezi tři základní lymfodrenážní lokality patří uzliny podpažních jam, tříselné uzliny a krční uzliny. Každá z těchto lokalit vyžaduje individuální přístup.

Nejčastěji postiženou základní regionální lymfatickou oblastí je axila. Do axil se může šířit maligní melanom horních končetin a některé melanomy trupu. Postupy provedení exenterace axily se mnohdy liší, ale jeden základní

princip je dodržován a to, že exenterace axily má být radikální zahrnující všechny tři etáže, přičemž platí, že s narůstajícím rozsahem operace stoupá i procento časných a pozdních komplikací. Riziko recidivy po radikální exenteraci je okolo 5 % oproti pouhé exstirpaci postižených uzlin, u kterého je až 55 % (7). Běžnými komplikacemi po exenteraci axil je formování seromu v operační ráně, dále infekční komplikace ran a její dehiscence. Z dlouhodobých komplikací nejčastěji nastávají případy lymfedémů a parestezií (72).

Druhým nejčastěji postiženým místem uzlinovou regionální metastázou je inguinální krajina, kde je možné před výkonem doplnit vyšetření CT třísel a pelvické krajiny. V inguinální krajině mohou být postiženy metastázou tři skupiny uzlin, a to superficiální inguinální skupina, hluboká inguino-femorální skupina a pánevní externí a interní skupina uzlin. Dále je důležitý stav Cloquetovy uzliny, která je nevyšše uloženou uzlinou hlubokého inguino-femorálního lymfatického systému a která vypovídá o stavu pelvického systému. V zásadě existují tři základní chirurgické metody lymfadenektomie, a to v závislosti na extenzi vlastního výkonu. Nejméně rozsáhlým výkonem je povrchová inguinální lymfadenektomie indikována především u solitárních nálezů. Při postižení více uzlin je vyšší pravděpodobnost zasažení i hlubokého inguino-femorálního lymfatického systému, a proto volíme již více extenzivní výkon v podobě hluboké inguino-femorální lymfadenektomie. Nejrozsáhlejší je abdominoinguinální lymfadenektomie, která je prováděna u mladých perspektivních jedinců při prokázaném postižení pánevních uzlin (7). U lymfadenektomií v tříselech vznikají nejčastěji komplikace v podobě infekcí a dehiscencí ran a seromů, které se objevují až ve třetině případů inguinálních exenterací. Mezi dlouhodobé komplikace můžeme zařadit hlavně lymfedém dolní končetiny, který nastává opět až v jedné třetině případů (7) (72).

Třetí základní lokalitou uzlinových metastáz je krční oblast, která se dále dělí na menší skupiny. Odlišujeme uzliny retroaurikulární a preaurikulární, uzliny příušní žlázy, tonsilární (jugulodigastrické), submandibulární, submentální, occipitální, povrchové cervikální, hluboké cervikální, zadní cervikální, supraklavikulární a uzliny podél míšních akcesorních nervů. Melanomy obličeje metastazují převážně do submandibulárních, submentálních a povrchových krčních uzlin, avšak mohou postihnout i příušní nebo supraklavikulární uzliny. Spádová uzlinová regie melanomů kštiny jsou převážně okcipitální a krční uzliny. Melanomy uší metastazují především do aurikulárních a příušních uzlinových skupin. Jelikož velká část cervikálních uzlin je uložena za svaly krku je při podezření na metastatické postižení nutné provést USG vyšetření. Při nejasnostech, nebo k přesnému naplánování rozsahu lymfadenektomie, je mnohdy nezbytné provedení CT vyšetření hlavy a krku s podáním kontrastní látky intravenózně. Základním přístupem při

metastazování do krčních uzlin (včetně pozitivní SLU) je jejich selektivní nebo modifikovaná disekce, eventuálně doplněná o další lymfatickou skupinu hlavy a krku dle polohy primárního ložiska. Modifikovaná disekce je v podstatě radikální disekce krčních uzlin se zachováním jedné nebo více nelymfatických struktur jako musculus sternocleidomastoideus, vnitřní jugulární žíla a spinální akcesorní nerv. Modifikovaná disekce je provedena v rozsahu ipsilaterálních cervikálních lymfatických uzlinových skupin od dolní hranice mandibuly až ke klavikule a laterálně od přední hrany musculus trapezius po laterální hranu musculus sternohyoideus, os hyoideum a přední bříško musculus digastricus (73). V případě, že je nutné u pacienta tento zákrok indikovat, je důležité upozornit na případné komplikace, které mohou s tímto operačním zákrokem souviset. Především to je poranění mandibulárního nervu, které nastává přibližně v 5 % případů a projevuje se ztrátou senzitivity prvních dvou třetin jazyka a poruchou artikulace způsobené postižením inervace svalů dolního rtu (74). Další komplikací může být poranění spinálního akcesorního nervu zásobujícího motorickými vlákny trapézový sval projevující se bolestivostí ramene a jeho slabostí při abdukci (75) (76). Dále může docházet k otokům obličeje, rozvoji seromů a hypertrofických jizev (77). Pacienty je nutné s těmito možnými riziky seznámit a nastítnit také jejich případné možnosti prevence a léčby.

h) Klasifikace a staging

Klasifikace a staging maligního melanomu se řídí dle posledního osmého vydání AJCC klasifikace, která byla publikována v říjnu roku 2016 a čerpáme z ní dodnes (78). Tento široce přijímaný koncept umožňuje velmi přesné stanovení prognózy pacienta a na základě těchto výsledků určení dalšího terapeutického postupu a případné zařazení pacienta do studií.

Klasifikace AJCC vychází z TNM systému maligních tumorů, který poprvé představil francouzský onkolog Pierre Denoix roku 1940. TNM systém spočívá ve stanovení TNM kritérií, která nám určují rozsah primárního tumoru, stav spádové sentinelové uzliny a regionálních uzlin a případné vzdálené metastázy.

- *T kategorie*

T kategorie vychází z histologického rozboru primárního ložiska maligního melanomu. Především zde záleží na hloubce invaze maligního melanomu do kůže a eventuální přítomnosti ulcerace. Hloubku invaze označujeme jako Breslowův index a udáváme jej v milimetrech. Na základě Breslowova indexu a výskytu ulcerace zařazujeme pacienta do příslušné TX až T4 kategorie.

- *N kategorie*

N kategorie vykazuje stav spádových regionálních uzlin, většinou vyšetřovaných na základě pozitivita sentinelové uzliny nebo jasné klinické pozitivita. Záleží především na počtu postižených uzlin a také na eventuálním nálezů intranzitních, satelitních nebo mikrosatelitních metastáz. Na základě těchto údajů poté stanovujeme NX až N3 kategorii.

- *M kategorie*

U zaznamenání vzdálených metastáz záleží především na přesné orgánové lokalizaci vzdálené metastázy a dále také na hladině laktát dehydrogenázy (LDH), tedy enzymu, jehož sérová hladina se zvyšuje při hypoxii tumorózní tkáň vyvolané nárůstem nádorové masy nad hranice její cévní nutrice. Hladina LDH je natolik významným prognostickým faktorem, že byla zařazena i do TNM klasifikace (79). Dále je LDH využívána i ke sledování terapeutických výsledků cílené terapie a imunoterapie (IT) (80).

Detaily je možno pozorovat v následujících tabulkách TNM klasifikace (Tabulka 1, 2, 3).

Tabulka 1 - T kategorie TNM klasifikace (AJCC 8. vydání 2016)

T kategorie	Breslow index	Ulcerace
TX	N/A	N/A
T0	N/A	N/A
Tis	N/A	N/A
T1	≤1.0 mm	Neurčená
T1a	<0.8 mm	Bez ulcerace
T1b	<0.8 mm	S ulcerací
	0.8–1.0 mm	S nebo bez ulcerace
T2	>1.0–2.0 mm	Neurčená
T2a	>1.0–2.0 mm	Bez ulcerace
T2b	>1.0–2.0 mm	S ulcerací
T3	>2.0–4.0 mm	Neurčená
T3a	>2.0–4.0 mm	Bez ulcerace
T3b	>2.0–4.0 mm	S ulcerací
T4	>4.0 mm	Neurčená
T4a	>4.0 mm	Bez ulcerace
T4b	>4.0 mm	S ulcerací

Tabulka 2 - M kategorie TNM klasifikace (AJCC 8. vydání 2016)

M kategorie	Lokalizace	Sérová hladina LDH
M0	Bez prokázání metastáz	Nemá výpovědní hodnotu
M1	Prokázány metastázy	
M1a	Vzdálené metastázy do měkkých tkání, svalů, a/nebo neregionálních uzlin	Neurčena
M1a(0)		Nezvýšena
M1a(1)		Zvýšena
M1b	Vzdálené metastázy do plic s/bez M1a ložisek	Neurčena
M1b(0)		Nezvýšena
M1b(1)		Zvýšena
M1c	Vzdálené metastázy do jiných lokalit s výjimkou CNS s/bez M1a nebo M1b ložisky	Neurčena
M1c(0)		Nezvýšena
M1c(1)		Zvýšena
M1d	Vzdálené metastázy do CNS s/bez M1a, M1b, M1c ložisky	Neurčena
M1d(0)		Nezvýšena
M1d(1)		Zvýšena

Tabulka 3 - N kategorie TNM klasifikace (AJCC 8. vydání 2016)

N kategorie	Počet postižených lymfatických uzlin	Intranzitní, satelitní nebo mikrosatelitní metastázy
NX	Regionální uzliny nevyšetřeny (vyšetření SLU neindikováno / uzliny již odstraněny z jiného důvodu)	Nezaznamenány
N0	Bez regionálních metastáz	Nezaznamenány
N1	1 pozitivní lymfatická uzlina / Intranzitní, satelitní, mikrosatelitní metastáza bez zasažení regionálních uzlin	
N1a	1 klinicky negativní uzlina	Nezaznamenány
N1b	1 klinicky pozitivní uzlina	Nezaznamenány
N1c	Bez regionálních metastáz	Zaznamenány
N2	2 nebo 3 pozitivní lymfatické uzliny / Intranzitní, satelitní, mikrosatelitní metastáza s jednou pozitivní regionální uzlinou	
N2a	2 or 3 klinicky negativní LU	Nezaznamenány
N2b	2 or 3 histologicky pozitivní LU, z nichž alespoň 1 byla klinicky pozitivní	Nezaznamenány
N2c	1 klinicky negativní nebo pozitivní LU	Zaznamenány
N3	4 a více pozitivních lymfatických uzlin / Intranzitní, satelitní, mikrosatelitní metastáza se 2 a více pozitivními regionálními uzlinami	
N3a	≥4 klinicky negativní LU	Nezaznamenány
N3b	≥4 histologicky pozitivní LU, z nichž alespoň 1 byla klinicky pozitivní	Nezaznamenány
N3c	≥2 klinicky negativní nebo pozitivní LU	Zaznamenány

- *Staging melanomu na základě výsledků TNM klasifikace*

Dle výsledků TNM klasifikace je poté možno stanovit stádium maligního melanomu, což nám v první řadě může velice přesně určit prognózu pacienta a v řadě druhé se s využitím nejnovějších National Comprehensive Cancer Network (NCCN) guidelines, či jejich českého ekvivalentu Modré knihy, dá precizně řídit další vyšetření a terapie pacienta.

Běžný sled událostí začíná podezřením na onemocnění maligním melanomem na základě ABCD(E) vyšetření obvodním lékařem či již ošetřujícím dermatologem, který na základě těchto výsledků indikuje dermatoskopické vyšetření. Na základě velkých a malých dermatoskopických

kritérií je indikována totální excize ložiska s histologickým vyšetřením. Dle výsledků histologie je poté stanovena T kategorie a případně je indikováno vyšetření sentinelové uzliny, které určí N kategorii TNM klasifikace. V případě že nejsou žádné známky metastáz a postižení regionálních uzlin je pouze na základě T kategorie stanoveno stádium I nebo II. Na druhé straně v situaci jakéhokoli postižení spádových lymfatických uzlin či známek satelitních či intranzitních metastáz je tumor automaticky klasifikován jako III. stadium, kdy je již vždy dle NCCN guidelines doporučeno doplnit vyšetření na přítomnost vzdálených metastáz, tedy CT vyšetření pánve břicha a hrudníku s podáním kontrastní látky intravenózně, celotělové PET/CT a MRI mozku. V případě jakékoli pozitivivity těchto vyšetření, eventuelně jakýchkoli klinických známek vzdáleného metastazování, je maligní melanom klasifikován do stádia IV (Tabulka 4).

Kompletní staging a jeho další drobné nuance shrnuje následující tabulka.

Tabulka 4 - Staging (AJCC 8. vydání 2016)

Stadium	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0
IB	T1b	N0	M0
	T2a	N0	M0
IIA	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0
IIB	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1a/b-T2a	N1a nebo N2a	M0
IIIB	T0	N1b, N1c	M0
IIIB	T1a/b-T2a	N1b/c nebo N2b	M0
IIIB	T2b/T3a	N1a-N2b	M0
IIC	T0	N2b, N2c, N3b, N3c	M0
IIC	T1a-T3a	N2c nebo N3a/b/c	M0
IIC	T3b/T4a	Jakékoli N \geq N1	M0
IIC	T4b	N1a-N2c	M0
IIID	T4b	N3a/b/c	M0
IV	Jakékoli T	Jakékoli N	M1

i) Prognóza

Lze obecně konstatovat, že dobrou prognózu má pouze melanom časně diagnostikovaný a kompletně široce odstraněný bez známek postižení regionálních lymfatických uzlin. Hrají zde však roli i mnohé další prognostické faktory.

- *Prognóza na základě klinického vyšetření*

K prvnímu posouzení prognózy se lékař přirozeně dostává při prvním kontaktu s pacientem, kdy je často dotazován stran prognózy na základě klinického případně dermatoskopického vyšetření.

Známka vertikálního růstu je prvním negativním klinickým faktorem, kterého si většinou lékař všimá. Je to nápadné vyklenování části nebo celého ložiska nad niveau okolní zdravé kůže. Vlastním vyklenováním ložiska se přirozeně zvyšuje Breslowův index a velice často dosahuje již minimálně hranice 1 mm. Vertikální růst značí invazivní formu maligního melanomu, a tedy jeho reálný potenciál k tvorbě metastatických lézí. Proto je nutno k této zjevně agresivnější formě melanomu přistupovat obezřetně a v případě předpokládané vyšší hodnoty Breslowova indexu volit excizi se širším ochranným lemem zdravé tkáně a vyšetření sentinelové uzliny.

Přítomnost ulcerace na povrchu maligního melanomu je vždy jasným negativním prognostickým faktorem. Spontánní ulcerace značí rychlejší proliferaci melanomového ložiska a vyšší úroveň angiogeneze a lymfangiogeneze, tedy i vyšší potenciál k metastazování. Vlastní ulcerací a úbytkem tkáně na povrchu tumoru dochází také k falešnému snížení Breslowova indexu. Proto u každého maligního melanomu s ulcerací by mělo být zvaženo vyšetření SLU i v situaci, kdy je Breslowův index nižší jak 0,8 mm (81). Přítomností ulcerace je ovlivněna i TNM klasifikace a stádium onemocnění, kdy přítomnost ulcerace vždy o stupeň zvyšuje stádium onemocnění a zhoršuje prognózu. Spontánní ulcerace nejvíce zhoršuje prognózu právě u melanomů prvního stádia (82), a proto právě u těchto povrchových lézí by měl lékař vždy pečlivě vyšetřit a popsat povrch léze.

Vymizení pigmentace ložiska poukazuje na sníženou diferenciaci nádorových buněk, které ztrácejí schopnost tvořit ve své cytoplasmě zralé melaninové granule, jsou světlejší a stanovení diagnózy maligního melanomu bývá o to obtížnější, jelikož je můžeme kromě bazocelulárního a spinocelulárního karcinomu zaměnit také za benigní ložiska jako jsou například jizvy či jiná kožní znaménka. Tato melanomová ložiska označujeme jako hypopigmentovaná či amelanotická ložiska, která tvoří přibližně 2 až 20 % všech melanomů. Tyto buňky také vykazují vyšší agresivitu a rychlejší růst v porovnání s více diferencovanými nádorovými buňkami. Průměrný pětiletý interval přežití u pacientů s tímto typem onemocnění je 88 % (83).

Nález spontánních ložisek regrese v ložisku maligního melanomu je velmi kontroverzní téma. Nastává zhruba v 10 až 35 % případů a způsobuje šedavě-modrá zbarvení v jinak hnědé struktuře melanomového ložiska. Celý tento úkaz je způsoben částečnou imunitní odpovědí organismu, kdy organismu se do určité míry daří rozeznat nádorové buňky od zdravých a tyto nádorové buňky v některých okrcích melanomu eliminuje. Tomu odpovídá i bohatý infiltrát T-lymfocytů a melaninem naplněných makrofágů v těchto okrcích (84). Fakt, že tělo dokáže rozeznat některé nádorové buňky a v rámci možnosti je eliminovat je jednoznačně pozitivní faktor pro průběh vlastního onemocnění, nicméně ožívají se i takové názory, že přítomnost regrese v melanomovém ložisku svým působením může uměle snižovat Breslowův index, a tudíž některé melanomy mohou být takzvaně poddiagnostikovány, kdy je určeno nižší stadium melanomu, než kterého ve skutečnosti dosahoval melanom před rozvojem regrese. Z tohoto pohledu je tedy rozvoj regrese negativním faktorem. Do této problematiky koncem roku 2020 vnáší trochu světla australsko-nizozemská studie provedená na více jak 22 tisících pacientů, která prokázala, že regrese je jasně pozitivní faktor u maligního melanomu stádia I a II jak z hlediska RFS tak OS (85), kdy průměrný follow-up time početnější australské skupiny pacientů byl 11,1 let. Mimochodem velmi podobných výsledků u stádia I a II dosáhla již italská studie v roce 2013 avšak na mnohem menším objemu italských pacientů (86). Italsko-britská studie na již znatelně menším objemu pacientů stádia III prokázala také prognosticky pozitivní účinek přítomnosti regrese, avšak jejich follow-up time byl již pouze 5 let (87). Na druhou stranu, najdou se i takové studie, které prognostickou pozitivitu regrese ložiska vyvracejí, jsou však vždy provedeny na menším počtu pacientů, nebo jsou pouze retrospektivní, anebo již staršího data, v jednom se však většinou shodují a to, že u melanomů s regresí bývá častěji negativní SLU (88) (89). S příchodem efektivní imunoterapie (rok 2012) vyvstává přirozená otázka, jestli přítomnost regresivních změn ložiska melanomu může nějakým způsobem predikovat lepší výsledky imunoterapie. Tato otázka však dosud nebyla zcela zodpovězena.

Anatomická lokalizace maligního melanomu může určitým způsobem také ovlivnit prognózu pacienta. Je známo, že vyjma akrolentiginózního melanomu na prstech, dlaních a ploskách mají melanomy končetin lepší prognózu než melanomy zad a hlavy. Nejhorší prognózu dle některých studií má poté maligní melanom skalpu především z dorsální strany (90) (91).

Vysoký věk je také jedním z rizikových prognostických faktorů a to hlavně proto, že starší pacienti přicházejí k prvnímu vyšetření až ve chvíli, kdy je již tumor lokálně pokročilý (91). Jsou však také práce, které potvrzují horší průběh onemocnění u starších pacientů v porovnání s mladšími pacienty

stejného stadia onemocnění. Dále je také potvrzen horší průběh onemocnění u pacientů mužského pohlaví, u kterých se také maligní melanom vyskytuje statisticky častěji (92).

Přítomnost makroskopických satelitních metastáz je jednou z nejhorších klinických prognostických známek. Jejich přítomnost značí jednoznačně vyšší agresivitu vlastního primárního nádoru a je absolutní indikací k vyšetření SLU, pokud již pacient onemocněním regionálních uzlin netrpí, v tomto případě by byla indikována disekce spádového regionálního lymfatického regia (93).

Nejhorším prognostickým klinickým faktorem je postižení regionálních lymfatických uzlin, zjištěné během klinického vyšetření. Lymfadenopatie samozřejmě může mít řadu dalších příčin, které je nutno od metastatického postižení odlišit. Nejlepší volbou na prokázání metastatického postižení lymfatických uzlin je provedení aspirační biopsie tenkou jehlou (FNA). Možnou alternativou FNA je provedení excizní biopsie hmatné uzliny. Dále je nutné doplnění vyšetření zobrazovacími metodami, a to CT vyšetření pánve, břišní dutiny a hrudníku, celotělové PET/CT a MRI mozku. Přítomnost metastáz regionálních lymfatických uzlin vždy značí reálné riziko vzdálených metastáz (94).

- *Prognóza na základě histologického vyšetření*

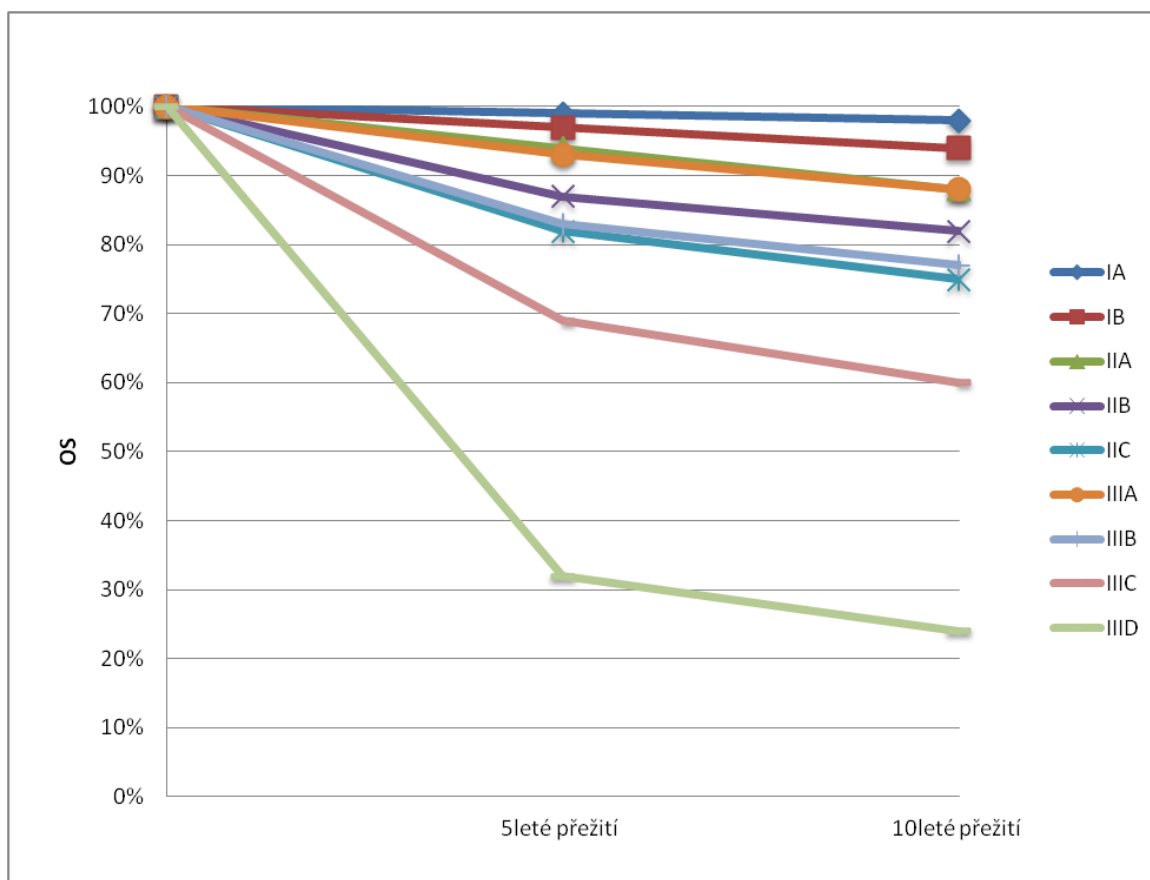
Teprve kompletní histologické vyšetření nám umožňuje stanovit přesnou prognózu onemocnění. Záleží zde na mnohých faktorech. Některé z nich byly probrány již v klinických prognostických známkách, akorát zde jsou stanoveny přesněji na základě histologického vyšetření. Mezi tyto již výše zmíněné faktory patří přítomnost ulcerace, vertikální šíření a hypopigmentace.

Nedůležitějším histologickým prognostickým faktorem je bezpochyby Breslowův index. Jak již bylo zmíněno v předchozích kapitolách, Breslowův index je hloubka invaze maligního melanomu do vrstev kůže a někdy i podkoží udávaná v milimetrech. V závislosti na této hloubce invaze můžeme poměrně přesně stanovit prognózu pacienta. Další údaje jako jsou mikroskopické satelitní, intranzitní, regionální či vzdálené metastázy a další podrobnější údaje prognózu ještě upřesní. Na základě těchto údajů zařadíme melanom do TNM klasifikace a následně stanovíme stadium onemocnění (95). Na základě stadia onemocnění již lze poměrně přesně stanovit prognózu. To je shrnuto v následující tabulce s připojeným grafickým zpracováním (Tabulka 5, Graf 1).

Tabulka 5 - Prognóza dle stádia melanomu (AJCC 8. vydání 2016)

Stádium	5leté přežití	10leté přežití
IA	99%	98%
IB	97%	94%
IIA	94%	88%
IIB	87%	82%
IIC	82%	75%
IIIA	93%	88%
IIIB	83%	77%
IIIC	69%	60%
IIID	32%	24%

Graf 1- Grafické zpracování tabulky č. 5

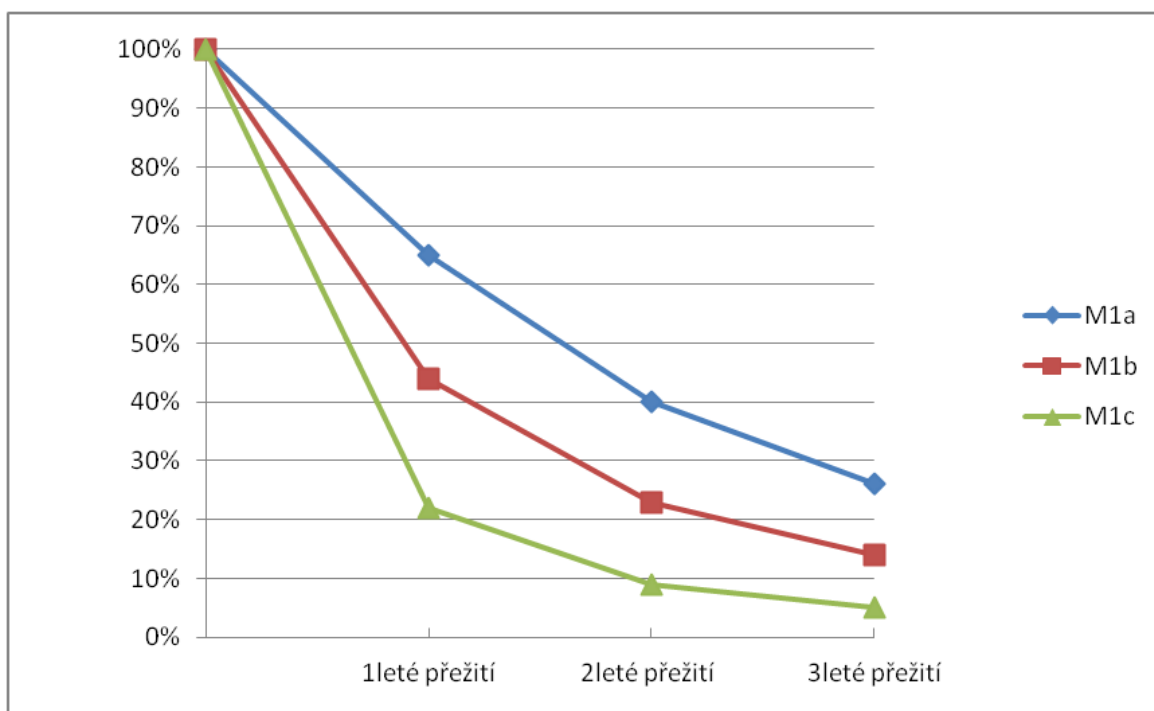


U maligního melanomu IV. stádia, tedy melanomu se vzdálenými metastázami se OS pohybuje spíše v řádech měsíců. V první řadě záleží na počtu a typu metastáz, kdy se ještě doba přežití pacientů může relativně hodně měnit. Prognózu může také významně ovlivnit druh adjuvantní terapie. Celkové přežití pacientů v závislosti na stádiu uvádí následující tabulka s přidaným grafem (96) (Tabulka 6, Graf 2).

Tabulka 6 - Current Medical Research and Opinion CMRO (96)

Stádium	1leté přežití	2leté přežití	3leté přežití	Medián OS
M1a	65%	40%	26%	22,3 měsíců
M1b	44%	23%	14%	11,2 měsíců
M1c	22%	9%	5%	5,1 měsíců

Graf 2 - Grafické zpracování tabulky č. 6



Dalším histologickým prognostickým faktorem je míra lymfocytární infiltrace v ložisku nádoru. Vlastní infiltrace ložiska tumoru značí imunitní pohotovost organismu a schopnost alespoň částečně maligní buňky melanomu rozpoznávat a blokovat proliferaci ložiska. To se většinou projevuje částečnou a v některých případech i kompletní regresí ložiska melanomu. Bylo

dokázáno, že maligní melanomy s přítomností TILs mají obecně lepší prognózu a vyšší OS, stejně jako melanomy s ložisky regresí či projevy depigmentací v okolí tumoru, jako tomu bývá u halo depigmentací nebo vitiligo podobným projevům v okolí primárních ložisek melanomu (97). Zastoupení jednotlivých typů TILs vykazuje vysokou heterogenitu. Ještě vyšší heterogenity však dosahují cílové struktury jejich útoku, které se nacházejí v nádorových buňkách a které nazýváme antigeny. Tyto tumorové antigeny, na které jsou imunitní buněčné reakce cíleny, můžeme rozdělit na dvě skupiny. První skupinou jsou tumor-specifické antigeny (TSAs), které jsou tvořeny pouze tumorózními buňkami a jinde v těle se nevyskytují. Existuje nepřehledné množství mutací, které mohou tvorbu těchto antigenů způsobit. Nespornou výhodou těchto antigenů je to, že se vyskytují výhradně na buňkách tumoru, byly by tedy pro cílenou terapii ideální, avšak každý tumor je z tohoto hlediska individuální a cílená terapie by musela být zcela na míru, navíc se u každého tumoru v průběhu relativně krátkého času tyto antigeny dynamicky mění. Druhým typem antigenů jsou tumor-asociované antigeny (TAAs), které se predominantně vyskytují v buňkách tumoru, avšak je zde i běžný fyziologický výskyt v některých ostatních zdravých melanocytech organismu, a tak tyto antigeny většinou nevyvolávají tak mohutné imunitní reakce. Na TSAs reagují především $CD8^+$ tedy cytotoxické T-lymfocyty, které proliferaci tumoru brzdí buď přímou cytotoxickou destrukcí tumorózních buněk anebo uvolňováním interferonu gama ($INF-\gamma$) nebo tumor nekrotizujícího faktoru alfa ($TNF-\alpha$). Přítomnost těchto $CD8^+$ lymfocytů je spojena s lepší prognózou (98). Nicméně k zařazení TILs mezi rutinní vyšetřovací metody a případné využití ve stagingu tumoru je ještě potřeba dalších studií (99).

j) Adjuvantní léčba

U pacientů se zvýšeným rizikem recidivy nebo již s metastazujícím melanomem je indikována adjuvantní, popřípadě neoadjuvantní, terapie v podobě především cílené terapie a imunoterapie. Tato metoda léčby si klade za cíl kompletní nebo alespoň částečnou eliminaci metastatického postižení a tím prodloužení časového intervalu bez onemocnění (DFI) a také čas celkového přežití pacientů.

- *Indikační kritéria adjuvantní terapie*

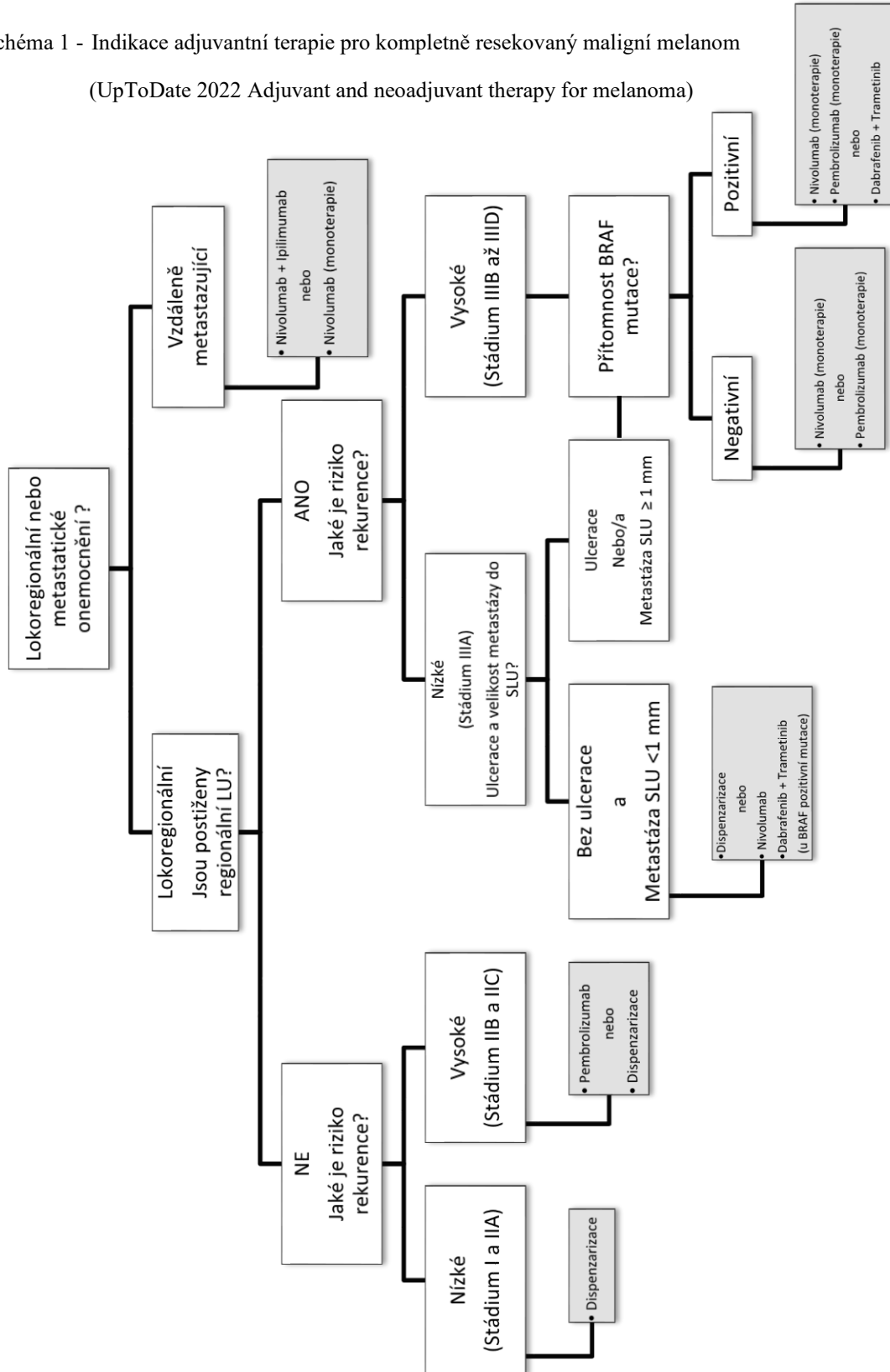
Podání a eventuálně druh adjuvantní léčby indikuje lékař na základě vyhodnocení rizika recidivy onemocnění, stadia onemocnění, přítomnosti BRAF V600 mutace, věku pacienta, komorbiditách a v neposlední řadě také na základě preferencí samotného pacienta.

Dle AJCC a NCCN se při indikaci adjuvantní léčby řídíme dle stadia onemocnění. U stadia I až IIA volíme dispenzarizační režim. U stádií IIB a IIC již můžeme využít imunoterapeutických metod ve formě podávání PD-1 inhibitorů (Nivolumab, Pembrolizumab). Avšak především u stadia IIB je možná u tumorů bez jiných rizikových známek (ulcerace, výrazné regrese atd.) také samotná pravidelná dispenzarizace, kdy pacient není vystaven častým negativním účinkům imunoterapie a tato léčebná metoda je šetřena pro využití při případné recidivě onemocnění. U stadia IIIA se rozhodujeme podle přítomnosti ulcerace a velikosti metastázy v regionální uzlině. Pokud byl primární tumor bez známek ulcerace a zároveň metastáza v SLU je menší než 1 mm největšího svého průměru je stále preferováno pacienta pouze observovat. Alternativou dispenzarizace je, v případě potvrzení BRAF mutace u pacientů požadujících adjuvantní léčbu, využití cílené terapie BRAF inhibitory v kombinaci s MEK inhibitory tedy dabrafenibem s trametinibem. Tito pacienti se však vystavují riziku negativních účinků cílené terapie. V případě přítomnosti ulcerace nebo větší metastázy jak 1 mm v SLU u IIIA stadia je již postupováno totožně jako u IIIB - IIID stadia. V těchto případech již pouhá dispenzarizační péče nestačí a je nutné dle přítomnosti BRAF mutace využít možností adjuvantní terapie. V případě negativity je nasazena monoterapie PD-1 inhibitorem nivolumabem nebo pembrolizumabem. V případě pozitivní BRAF mutace máme možnost využití jak imunoterapie v režimu uvedeném výše, tak i kombinované cílené terapie dabrafenibu s trametinibem, eventuálně je možno využít i kombinace vemurafenibu s cobimetinibem. Pro pacienty s maligním melanomem IV. stadia, tedy metastatickým maligním melanomem, je obecně doporučována adjuvantní terapie zahrnující kombinaci nivolumabu s ipilimumabem. V případě, že pacienti nejsou schopni tolerovat negativní účinky této kombinace, je

přístupováno k monoterapii nivolumabem samotným (100). Indikační kritéria adjuvantní terapie shrnuje následující schéma (Schéma 1).

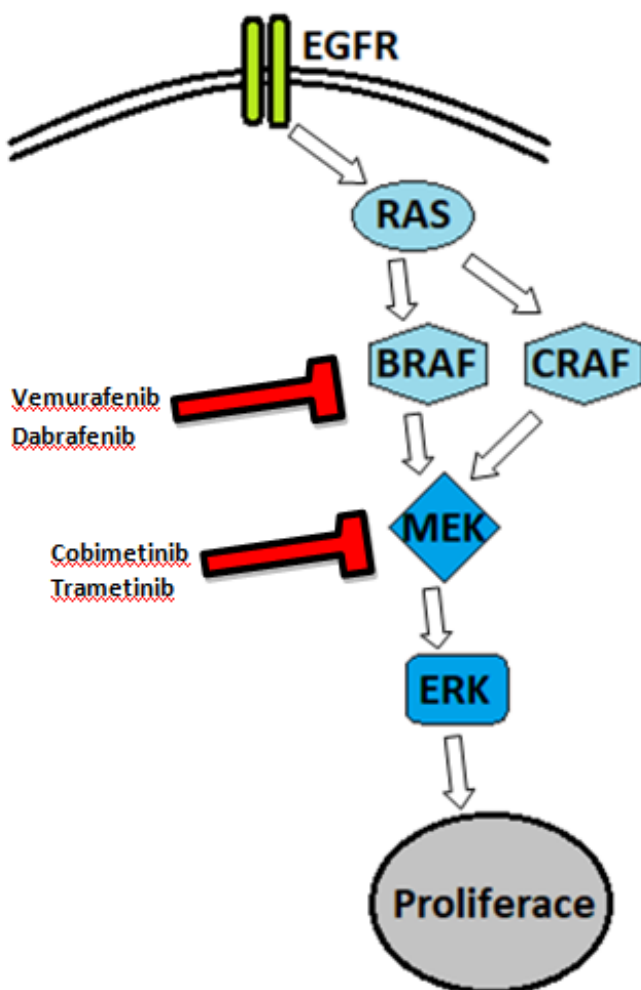
Schéma 1 - Indikace adjuvantní terapie pro kompletně resekovaný maligní melanom

(UpToDate 2022 Adjuvant and neoadjuvant therapy for melanoma)



- *Cílená terapie*

Genetická sekvenace buněk maligního melanomu prokázala velké množství mutací, kdy některé tyto mutace mohou být terčem cílené terapie. Nejčastěji je tato terapie cílena na mutaci v BRAF genu, která se vyskytuje u pacientů s metastatickým melanomem průměrně ve 40 až 60 % (101) (7). Druhou nejčastěji se vyskytující mutací u metastazujícího melanomu je mutace v N-RAS genu. Oba tyto proteiny (BRAF a N-RAS) jsou součástí víceúrovňové mitogenem aktivované protein kinázy (MAPK), která je aktivovaná na povrchu buňky fosforylací dvou jednotek transmembránového epidermálního receptoru pro růstový faktor (EGFR), označovaný též jako lidský epidermální receptor (HER1). Mutace genů pro proteiny této kinázy indukuje transformaci melanocytů v nádorové buňky. Cílená terapie blokuje tuto kinázu na několika úrovních a tím zabraňuje další proliferaci a přežívání maligního melanomu. Signální vnitřní cesta MAPK s úrovní účinností jednotlivých zástupců cílené terapie je vyobrazena v následujícím obrázku (Obr. 1).



Obr. 1 - MAPK a úrovně působení cílené terapie (MUDr. Vlastimil Woznica)

I přes to, že se může zdát cílená terapie metodou volby pro BRAF mutaci pozitivní pacienty s metastatickým melanomem, není tomu tak. Bylo prokázáno, že DFI i OS je u cílené terapie oproti imunoterapii kratší. Dále bylo zjištěno, že stran OS a celkové míry odpovědi (ORR) je výhodnější začít s imunoterapií nejčastěji v kombinaci nivolumab a ipilimumab a následně při progresi onemocnění přejít na cílenou terapii v kombinaci dabrafenib a trametinib, kdy tento postup dosahuje dvouletého OS až 72 % oproti opačnému postupu s prvotním podáním cílené terapie, které dosahuje pouze 52 % (102). Samozřejmě, může nastat situace, kdy nebude možno využít v první řadě imunoterapie, může se jednat například o pacienta, který dlouhodobě užívá imunosupresiva, trpí autoimunitní chorobou, jeho celkový stav či polymorbidita nedovoluje podání imunoterapie, nebo podání imunoterapie sám pacient odmítá. V takovém případě je zcela na místě podání cílené terapie jako první.

Preparáty cílené terapie se v drtivé většině podávají v kombinaci, a to vždy jako BRAF inhibitor kombinovaný s MEK inhibitorem, jelikož bylo zjištěno, že monoterapie pouze BRAF inhibitorem výrazně zvyšuje riziko výskytu dalších kožních tumorů, od benigních verukózních papilomů a keratoakantomů, až po kožní a mukózní spinocelulární karcinomy, nová ložiska maligních melanomů a BRAF inhibitory vyvolané leukemie. Tento fenomén byl vysvětlen BRAF inhibitory podmíněnou mutací genu pro RAS protein a BRAF/CRAF heterodimerizací (103). Tento velmi nepříznivý negativní účinek lze výrazně omezit právě využitím kombinace BRAF a MEK inhibitoru, který však zcela neeliminuje tuto hrozbu. Tyto kombinace dále snižují výskyt toxických účinků a signifikantně zvyšují DFI a OS pacientů oproti monoterapii (104) (105).

Jednotlivé kombinace, ačkoli ještě nebyly vzájemně porovnány randomizovanými studiemi, dosahují všechny podobných účinností s ORR vždy nad 70 %. Je však doporučeno, dle lokalizací metastatického postižení, jednotlivé kombinace upřednostňovat.

U metastatického melanomu CNS se osvědčila kombinace dabrafenibu s trametinibem (D/T) (106). Nevýhodou D/T je nutnost užívat tyto léky mimo jídlo a nutnost skladování trametinibu v chladničce.

Kombinace encorafenibu a binimetinibu (E/B) má tu výhodu, že se může užívat i během jídla a může se skladovat při pokojové teplotě, což je pohodlné především pro pacienta.

Vemurafenib a cobimetinib (V/C) je nejméně užívanou kombinací pro jejich nejčastěji se vyskytující nežádoucí účinky léčby.

Mezi nežádoucí účinky cílené léčby patří velké množství dermatologických projevů toxicity. Zvýšený výskyt spinocelulárního karcinomu a keratoakantomů byl již popsán při podávání monoterapie výše. Při monoterapii cílenou léčbou se tyto tumory vyskytují až v 26 % případů s projevem do několika týdnů od zahájení terapie (107). Využitím kombinace BRAF a MEK inhibitorů lze tyto komplikace výrazně snížit. Další dermatologickou komplikací je rash, který je zároveň nejčastější dermatologickou komplikací, dále pak zvýšená fotosenzitivita, palmoplantární keratoderma a prodloužené kožní hojení.

Dále mohou vznikat při užívání zejména trametinibu a V/C kardiomyopatie se sníženou ejekční frakcí levé komory, a proto by tyto pacienti měli být před zahájením, a poté během podávání této léčby, pravidelně sledováni kardiologem. Dále může podání encorafenibu a vemurafenibu vyvolat prodloužení QT intervalu.

Dalšími častými negativními účinky jsou horečky, slabosti, vyčerpání, průjemy a bolesti kloubů. Horečky se nejčastěji vyskytují u D/T.

Cílená terapie může působit také hepatotoxicky a nefrotoxicky. Neurotoxická vyvolává bolesti hlavy a někdy také parézy nervus facialis.

Poškození oka se projevuje záněty spojivek, uveitis a vysycháním očí.

- *Imunoterapie*

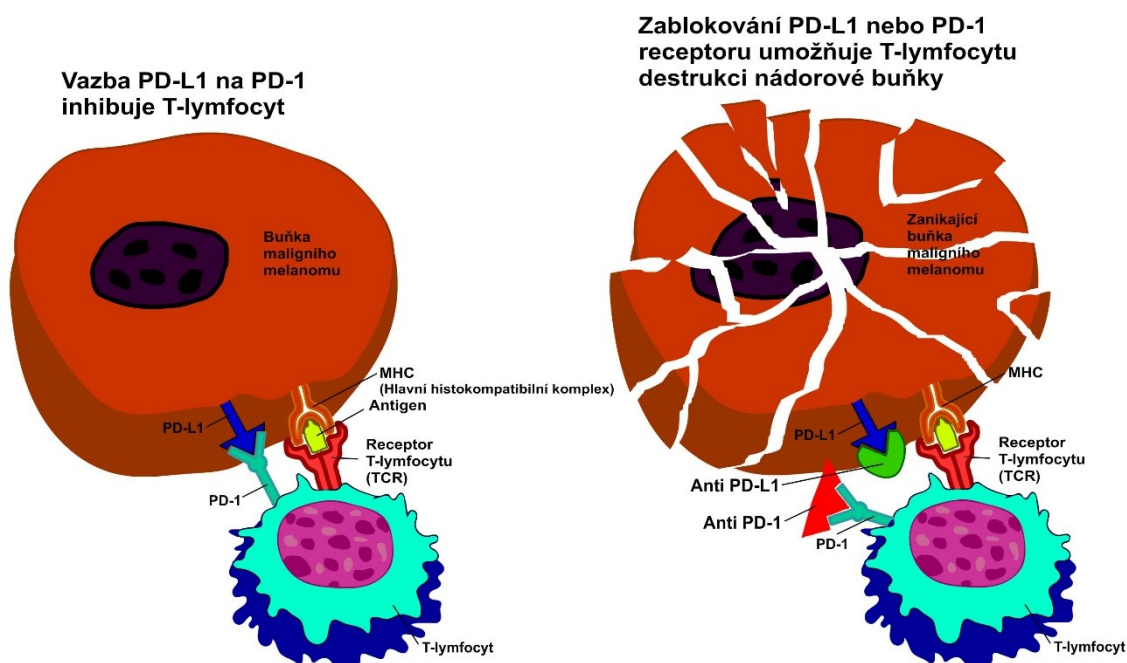
V případě negativity mutací, které by se daly využít pro cílenou adjuvantní terapii, se nejčastěji přistupuje k metodám adjuvantní imunoterapie. Cílem imunoterapie je podpoření a povzbuzení imunitního systému samotného pacienta, jehož výsledkem je následné posílení imunitní reakce proti nádorovým buňkám. V této skupině léčiv máme hned několik zástupců. Nejčastěji využívanou skupinou terapeutik imunomodulační léčby jsou checkpoint inhibitory, mezi které patří programmed cell death receptor-1 inhibitory (PD-1 inhibitory), programmed cell death receptor ligand-1 inhibitory (PD-L1 inhibitory) a cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4 inhibitory (CTLA-4 inhibitory). Dalším, již obecněji působícím zástupcem imunomodulačních terapeutik je interleukin-2 (IL-2). Mezi imunoterapeutika pro lokální aplikaci poté můžeme zařadit například imiquimod.

PD-1 receptor je receptor, který se nejčastěji vyskytuje na povrchu T-lymfocytů. Jeho funkcí je řízení takzvané periferní tolerance (108), což v konečném důsledku znamená to, že imunitní systém toleruje tělu vlastní buňky. Tohoto faktu často zneužívají nádorové buňky, které zvýšenou

tvorbou ligandu pro PD-1 potlačují imunitní odpověď T-lymfocytů na nádorové bujení a tím se zvyšuje jejich odolnost a invazivita.

Mezi nejběžněji využívané zástupce PD-1 inhibitorů patří především nivolumab a pembrolizumab (109). Svou vazbou na PD-1 receptor inhibují potencionální působení nádorových buněk na aktivované T-lymfocyty svými PD-L1, a tím zásadně zvyšují jejich náchylnost na imunitní odpověď organismu (Obr. 2).

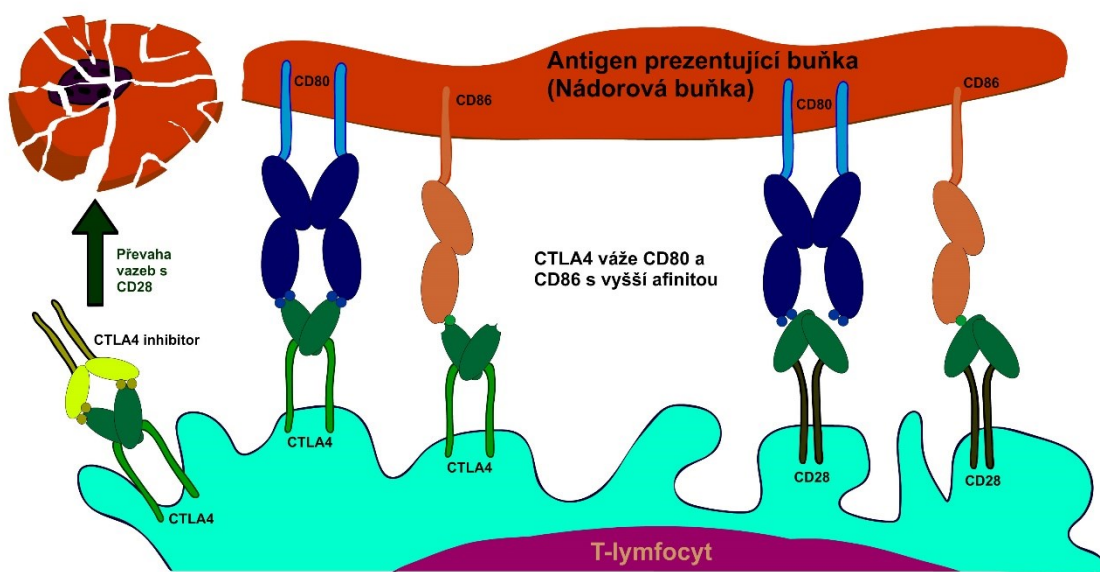
Obdobným způsobem fungují PD-L1 inhibitory, které se vážou na PD-L1 exprimované nádorovými buňkami. Mezi tyto preparáty můžeme zařadit například atezolizumab, který lze používat v kombinaci s cílenou biologickou terapií BRAF inhibitory. Atezolizumab však v České republice není k léčbě pokročilého maligního melanomu doporučen (109) (Obr. 2).



Obr. 2 - Schématické působení PD-1 a PD-L1 inhibitorů (Překresleno MUDr. Vlastimil Woznica z: (110))

CTLA-4 receptor je exprimován na povrchu T-lymfocytů. Jeho vazba na ligandy CD80 a CD86, které exprimují nádorové buňky, opět vede k inaktivaci T lymfocytů, a tedy vyšší odolnosti nádorových buněk k imunitnímu systému. Je to kompetitivní receptor k receptoru CD28, přičemž právě převaha vazeb CTLA-4 vyvolává inaktivaci T lymfocytů. Inhibicí

CTLA-4 receptoru můžeme vyvolat převahu vazeb ligandů na povrchu tumorové buňky s CD28, a tím vyvolat zánik nádorové buňky (111) (Obr. 3). V našich podmínkách nejčastěji využívaným CTLA-4 inhibítorem je ipilimumab, který se hojně využívá jak v monoterapii, tak i v kombinaci s nivolumabem.



Obr. 3 - Schématické působení CTLA-4 inhibitorů (Překresleno MUDr. Vlastimil Woznica z: (112))

S terapií checkpoint inhibitory je spojeno mnoho negativních účinků. Od celkové únavy pacienta, která nastává přibližně ve 20 % případů a v drtivé většině nebývá vážná (113), přes různé dermatologické komplikace jako imunobulózní kožní projevy, rash, vaskulitidy a dermatózy, dále pak průjmy a kolitidy, hepatotoxické projevy, až po pneumonie nastávající sice jen asi v 5 % případů, avšak jejich průběh často bývá těžký až fatální (114). Také se můžeme setkat s různými případy endokrinopatie, jako například autoimunitní thyroditis. Dalším negativním účinkem léčby PD-1 inhibitory může být syndrom uvolnění cytokinů (CRS), který se projevuje horečkami a často i projevy multiorgánové dysfunkce, přičemž se však zároveň považuje za indikátor dobré účinnosti léčby (115).

Hlavně v zahraničí se můžeme setkat při terapii metastazujícího maligního melanomu s využitím interleukinu-2 (IL-2), což je přirozeně se vyskytující protein (cytokin), který je vytvářen buňkami imunitního systému, a to především T lymfocyty. Využívá se až ve chvíli intolerance systémové terapie

první volby (PD-1 inhibitory, BRAF a MEK inhibitory) či progresse onemocnění při terapii první volby. IL-2 zvyšuje aktivitu T a B lymfocytů v okolí a zvyšuje tím pohotovost imunitního systému k rozeznání a následné eliminaci nádorových buněk. Obecně se při terapii IL-2 snažíme o podání maximálního počtu dávek za současné monitorace nežádoucích účinků tak, abychom pacienta nevystavili nepřiměřenému riziku vážných až ireverzibilních následků toxicity této terapie (116). Z prvních vedlejších účinků terapie IL-2, které pacienti zaznamenají, jsou horečky a zimnice, které nastupují v intervalu od 30 do 60 minut po podání dávky imunoterapeutika a mohou být tlumena podáváním nesteroidních antiflogistik a antipyretik. Dále mohou nastat epizody hypotenzí v důsledku kapilárního leaku a snížené periferní vaskulární rezistence. Dalšími negativními účinky mohou být srdeční arytmie, oligurie, zvracení, průjemy a hematologické a jaterní laboratorní změny jako výsledky toxicity této terapie (116).

Přestože se pro zavedení check-point inhibitorů od využívání interferonu alfa (IFN- α) k léčbě maligního melanomu již téměř ustoupilo, v některých zemích se stále ještě s využíváním IFN- α můžeme setkat. IFN- α má však oproti check-point inhibitorům nižší efektivitu při vyšším výskytu negativních účinků léčby (117) (118). Mezi nejčastější negativní projevy léčby interferonem alfa patří flu-like syndrom, hematologická toxicita projevující se sníženým počtem bílých krvinek a krevních destiček, hepatotoxicita, porucha funkce štítné žlázy, únavový syndrom a v neposlední řadě i kožní projevy, které se mohou projevovat lokálním zarudnutím, exacerbacemi lupénky až generalizovanými toxoalergickými reakcemi, pro které je mnohdy nutné vlastní léčbu interferonem přerušit.

- *Chemoterapie*

Vzhledem k tomu, že v současné době máme především možnost využití účinnější imunoterapie a cílené léčby, není chemoterapie při léčbě maligního melanomu léčbou první volby a často se k ní přistupuje až ve chvíli selhání ostatních metod. Navíc maligní melanom vykazuje v mnohých případech významnou chemoterapeutickou rezistenci, která stále ještě zůstává z velké části nepochopena (119).

Jak v modré knize, tak i v guidelines dle NCCN je chemoterapie volena pouze jako paliativní adjuvantní terapie.

Nejčastěji využívaným zástupcem z řad chemoterapeutik je jednoznačně dakarbazin (DTIC). V paliativním schématu je užíván jak v monoléčbě, tak i v kombinaci s ostatními chemoterapeutiky, například ve schématu cisplatina, vinblastin a dakarbazin (CVD), nebo bleomycin, vinkristin, lomustin a dakarbazin protokolu (BOLD) (109).

Byť bylo dokázáno, že kombinací chemoterapeutik, mezi sebou či s BRAF, MEK, CTLA-4 i PD-1 inhibitory, můžeme docílit mírného nárůstu jejich účinnosti, zvýšení výskytu nežádoucích účinků při těchto kombinacích je však nepoměrně vyšší, a proto ani kombinace chemoterapeutik nejsou příliš využívanou terapeutickou metodou (120).

Mezi nejčastější negativní účinky chemoterapie maligního melanomu můžeme zařadit zvracení, únavu, zácpu, anémii, neutropenii, sucho v ústech a vypadávání vlasů.

- *Radioterapie*

S vývojem metod adjuvantní imunoterapie a cílené léčby je nyní radioterapie (RT) především metodou paliativní péče, využívanou především u bolestivých kostních metastáz, v případech útlaku míchy expanzí tumorózní masy, mozkových metastáz, nebo metastáz měkkých tkání komplikujících se krvácením, bolestivostí, či svou expanzí působí obstrukci dutin a dutých orgánů.

Otázka RT maligního melanomu byla v minulosti velmi kontroverzním tématem, jak stran radiosenzitivity maligního melanomu, tak stran účinnosti jednotlivých schémat lišících se především frakcionací, a tudíž velikostí jednotlivých dávek během terapie.

Pro nedostatek validních dat stran účinnosti hypofrakcionačního a konvenčního schématu RT, byla provedena prospektivní randomizovaná multicentrická studie, která prokázala, že obě schémata mají téměř totožné výsledky (121). Tento fakt potvrzuje i studie uveřejněná o několik let později čítající 56 pacientů ošetřených mezi léty 1980 až 2004 (122).

Přestože je nyní RT považována především za metodu paliativní péče, využívá se jí v určitých specifických případech i jako adjuvantní metody léčby.

V případech rozsáhlých ložisek lentigo maligna a lentigo maligna melanoma, která nejsou řešitelná chirurgickou metodou, především v oblasti hlavy a krku, můžeme volit RT jako alternativu chirurgického odstranění ložiska. Na toto téma byla provedena rozsáhlá studie zahrnující 593 pacientů s LM i LMM, v níž byla porovnána metoda zahrnující samotnou RT, parciální excizi s adjuvantní RT a širokou excizi doplněnou adjuvantní RT (123). Sledování u většiny pacientů probíhalo 2 roky u 241 pacientů až 5 let. Kompletní remise bylo u první skupiny dosaženo v 83 %, u druhé skupiny v 90 %, a u skupiny se širokou excizí následovanou adjuvantní RT až v 97 % případů.

Dále může adjuvantní RT zlepšit prognózu pacientů po neradikální excizi primárního invazivního maligního melanomu, kde již není možné reziduum tumoru radikálně reexcidovat a také u reexcize lokální recidivy původně radikálně odstraněného maligního melanomu. Často se také doporučuje u melanomů s perineurálním šířením a to především u desmoplastického maligního melanomu, u kterého je při široké excizi stále riziko rekurence až 48 % (124) (119), avšak vzhledem k tomu, že i desmoplastický maligní melanom dobře odpovídá na léčbu PD-1 inhibitory, ponechává se RT až na léčbu reziduální choroby (126).

k) Metastazující maligní melanom

Jak již bylo zmíněno výše, výskyt lokoregionálních a orgánových metastáz významně zhoršuje prognózu daného pacienta. Maligní melanom při svém vertikálním růstu a rostoucím Breslowově indexu nabývá vysoké schopnosti metastazovat. A to především lymfatickou ale také hematogenní cestou. V drtivé většině se setkáváme nejdříve s lokoregionálním metastazováním a posléze až se vzdálenými orgánovými metastázami.

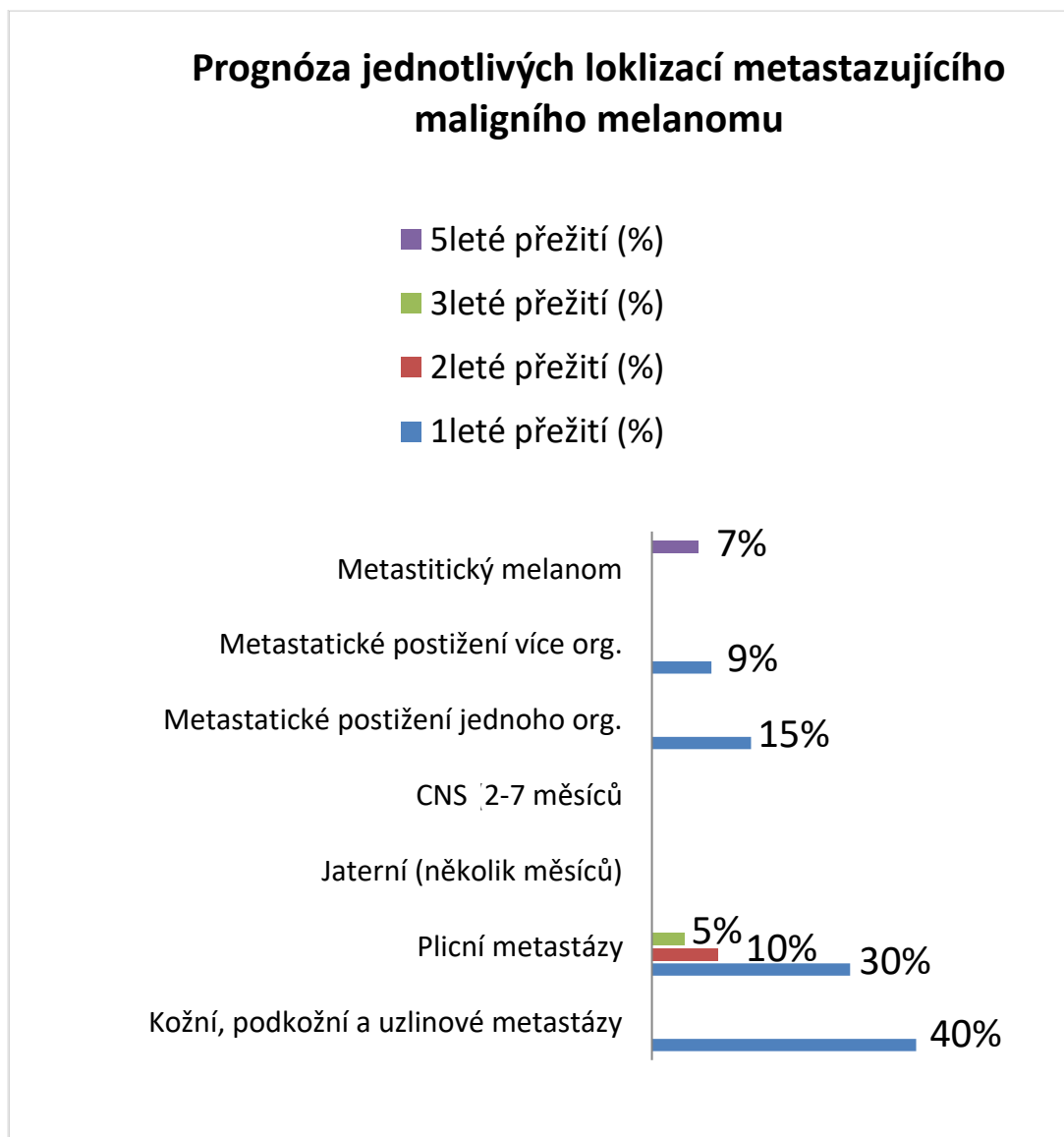
Zatímco u časného stádia melanomu je prognóza pro pacienty vesměs dobrá, jelikož široká excize je pro většinu těchto pacientů kurabilní terapií a desetileté přežití se u těchto pacientů pohybuje okolo 90 %, u metastazujícího melanomu je prognóza většinou velmi špatná, a to hlavně proto, že doposud nemáme pro takto pokročilá stádia maligního melanomu dostatečně účinnou metodu terapie. Doba přežití se může ještě relativně hodně měnit v závislosti na typu a počtu metastáz.

Maligní melanom může metastazovat téměř do jakékoli tkáně v těle. Nicméně zcela nejčastěji nacházíme metastázy do kůže, podkoží a lymfatických uzlin, a to až v 55 % případů metastazování. Četnost jednotlivých metastáz a jejich prognózu shrnuje následující tabulka a graf (7) (Tabulka 7, Graf 3).

Tabulka 7 - Nejčastější lokality metastazování maligního melanomu

Kůže a podkoží	45-55 %
Lymfatické uzliny	40-50 %
Plíce	35-47 %
Centrální nervový systém	25-35 %
Játra	25-35 %
Kosti	15-20 %
Gastrointestinální trakt	10-15 %
Jiné lokalizace	5-10 %

Graf 3 - Grafické zpracování OS pacientů s metastazujícím maligním melanomem



- *Chirurgická terapie*

Možnosti chirurgické terapie metastazujícího maligního melanomu jsou velmi omezené. Většinou se využívá pouze u pacientů se solitární metastázou nebo nízkým počtem resektabilních metastáz. Zejména se této metody, vedle stereotaktické radiochirurgie a konvenční radioterapie, využívá u mozkových metastáz, kde díky kombinaci této metody s následným využitím dostupné adjuvantní terapie dosahujeme ve srovnání s minulostí výrazně lepších výsledků (127).

- *Adjuvantní terapie*

Metody adjuvantní terapie užíváme u pacientů se zvýšeným rizikem recidivy nebo již s metastazujícím melanomem. Indikační kritéria i jednotlivé metody již byly podrobně probrány v kapitole adjuvantní léčba výše.

Vesměs platí, že standardem léčby kompletně resekovaného metastazujícího maligního melanomu je v případě positivity BRAF mutace využití kombinace BRAF a MEK inhibitorů (dabrafenib + trametinib) či PD-1 inhibitoru (nivolumab nebo pembrolizumab). V případě negativity BRAF mutace přistupujeme většinou k imunoterapii založené na checkpoint inhibitech (opět nivolumab či pembrolizumab) (109).

V případě inoperabilního metastazujícího maligního melanomu dodržujeme v počátku léčby podobné schéma, avšak v případě podávání PD-1 inhibitorů, můžeme kromě monoléčby PD-1 inhibitorem využít i kombinaci PD-1 inhibitoru s CTLA-4 inhibitorem. Dále pak ve 2. a 3. linii zvažujeme na základě individuální odpovědi pacienta změnu, rechallenge či eskalaci dané léčby (109).

l) Dispenzarizační péče

Dispenzarizační péči provádí dermatolog nebo onkolog vedoucí adjuvantní terapii. Dispenzarizační protokol doporučený Českou onkologickou společností (ČOS) je strukturován především na základě stadia maligního melanomu u daného pacienta, i přes to však není aktuálně zcela jasně definován a zobrazovací a laboratorní vyšetření jsou v určitých případech indikovány lékaři individuálně.

- *Stádium 0*

U pacienta se stádiem 0, tedy s melanomem in situ, stačí dle ČOS kontrola jednou za rok. U těchto asymptomatických pacientů není obecně doporučováno žádné pravidelné zobrazovací vyšetření. Stejně tak tomu je ohledně laboratorního vyšetření. Nicméně záleží na úsudku každého dispenzarizujícího lékaře a ani pravidelné USG kontroly regionálních uzlin a laboratorní náběry nejsou v žádném případě chybou (109).

- *Stádium IA - IIA*

V tomto případě jsou doporučeny klinické kontroly po 6-12 měsících po dobu pěti let a následně jednou ročně do 10. roku. Další dispenzarizace je pak na individuálním úsudku lékaře. I v tomto případě se standardně zobrazovací ani laboratorní kontroly u asymptomatických pacientů nedoporučují (109).

- *Stádium IIB - IV*

Zde se v prvních 2-3 letech doporučují klinické kontroly po 3-6 měsících. Dále do pátého roku po 3-12 měsících a následně do desátého roku jednou ročně. Zobrazovací kontroly se prvních pět let doporučují po 3-12 měsících dále pak u symptomatických pacientů či individuálně u pacientů s vysokým rizikem recidivy onemocnění. Laboratorní vyšetření je u asymptomatických pacientů těchto stádií diskutabilní. Naopak u symptomatických pacientů může zvýšená hladina sérového proteinu S100b nebo laktátdehydrogenázy (LDH) poukazovat na relaps onemocnění.

I když jsou pravidelná klinická a eventuální zobrazovací a laboratorní vyšetření u pacientů s maligním melanomem nepodkročitelnou součástí správně vedené léčby, je také velmi důležité dbát na edukaci pacientů stran samovyšetřování. Bylo zjištěno, že efektivita samovyšetřování u pacientů je poměrně vysoká (128) a zejména po zevrubné edukaci dokáže většina pacientů odhalit časnou recidivu sama. Spojení samovyšetřování a pravidelných kontrol tak může maximalizovat šanci odhalení časných recidiv ale i odhalení časných stádií onemocnění samotného (129).

9 Popis řešení a výsledky výzkumu

- *Soubor pacientů a náběrové schéma*

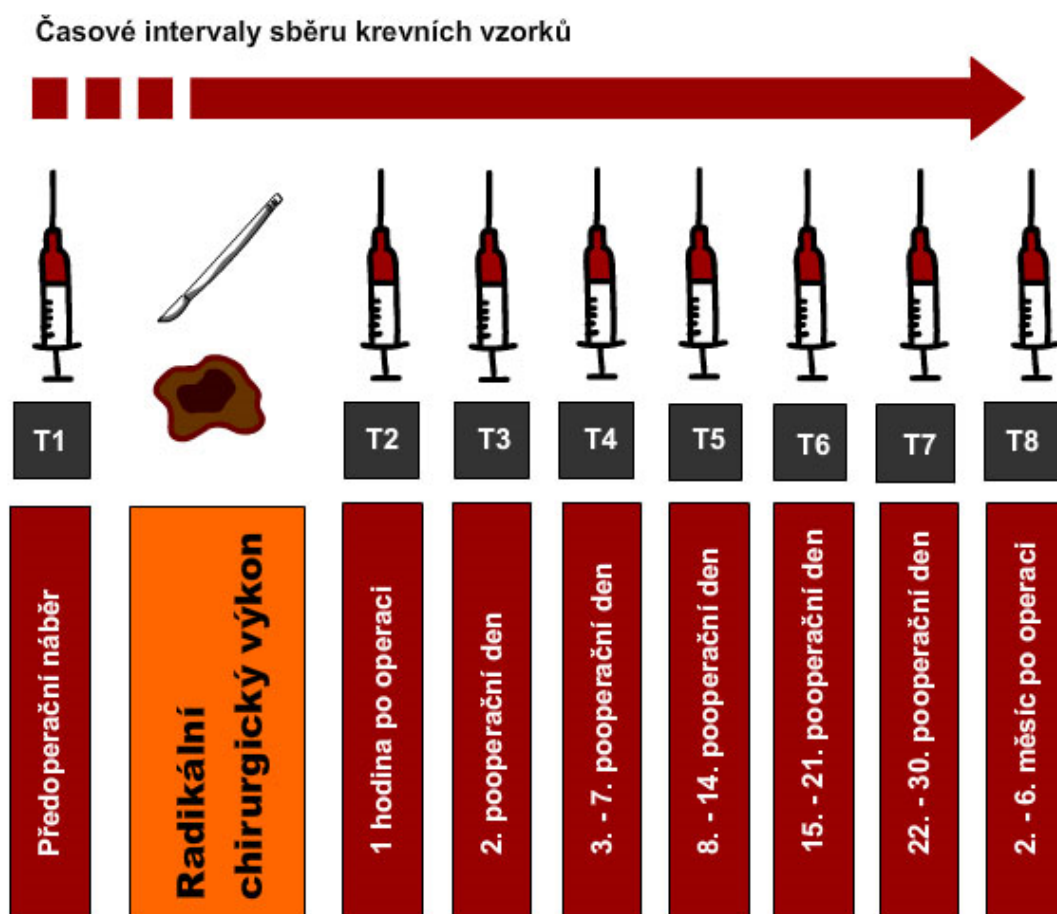
Do naší studie bylo vybráno 80 pacientů Fakultní nemocnice v Plzni s diagnostikovaným časným stadiem onemocnění maligním melanomem mezi lednem 2014 až červencem 2020. Věkový medián byl 60 let. Většina pacientů byli muži s maligním melanomem II stádia bez ulcerace a bez postižení lokoregionálních uzlin. Medián Breslowova indexu byl 2,2 mm. Tito pacienti podstoupili na Oddělení plastické chirurgie radikální odstranění ložiska maligního melanomu a ve většině případů i vyšetření sentinelových uzlin. Jen 17 těchto pacientů podstoupilo adjuvantní léčbu (Tabulka 8).

Tabulka 8 – Souhrnný přehled pacientů

Soubor pacientů		
Věk [věkový medián (IQR)]		60 (21)
Pohlaví [n (%)]	Muži	43 (53.8)
	Ženy	37 (46.3)
Stádium [n (%)]	0	4 (5)
	IA	12 (15)
	IB	12 (15)
	IIA	11 (13.8)
	IIB	10 (12.5)
	IIC	9 (11.3)
	IIIA	1 (1.3)
	IIIB	4 (5)
	IIIC	14 (17.5)
	IIID	1 (1.3)
	Neznámé	2 (2.5)
Postižení uzlin [n (%)]		19 (23.8)
		49 (61.3)
		12 (15)
Ulcerace [n (%)]		34 (42.5)
		46 (57.5)
Breslow index [n (%)]		2.2 (3)
Histologie [n (%)]		11 (13.8)
		4 (5)
		3 (3.8)
		6 (7.5)
		23 (28.7)
		23 (28.7)
		9 (11.3)
		1 (1.3)
Tkáňová BRAF mutace [n (%)]		23 (28.7)
		29 (36.3)
		28 (35)
Recidiva onemocnění [n (%)]		19 (23.8)
		61 (76.3)
Stav pacientů [n (%)]	Přeživší	72 (90)
	Zemřelí	8 (10)

U těchto pacientů byly vyšetřeny histologické preparáty na přítomnost nejčastější mutace spojené s maligním melanomem a sice BRAF V600E mutace, která bývá pozitivní až u poloviny všech pacientů s maligním melanomem (130). V některých případech se však můžeme setkat i s jinými typy mutací způsobující onemocnění maligním melanomem, mezi tyto méně časté mutace patří například N-ras mutace, BRAF mutace třídy II a III, MEK1 mutace, KIT mutace a další.

Dále byly u pacientů odebírány vzorky plné krve v přesně stanovených časových rozmezích. První náběr se uskutečnil v předoperačním období přibližně 1 hodinu před operací. Druhý náběr byl proveden vždy s odstupem jedné hodiny po operačním výkonu. Další s odstupem dvou dní. Poté pacienti absolvují tři standardní pooperační ambulantní kontroly á 1 týden, kdy se vždy provede náběr plné krve. Dále byl proveden ještě kontrolní náběr s odstupem přibližně 6 měsíců od operace. Vše shrnuje následující schematické zpracování (Obr. 4).



Obr. 4 – Časové rozvržení jednotlivých náběrů krevních vzorků pacientů (Překresleno MUDr. Vlastimil Woznica z: (131))

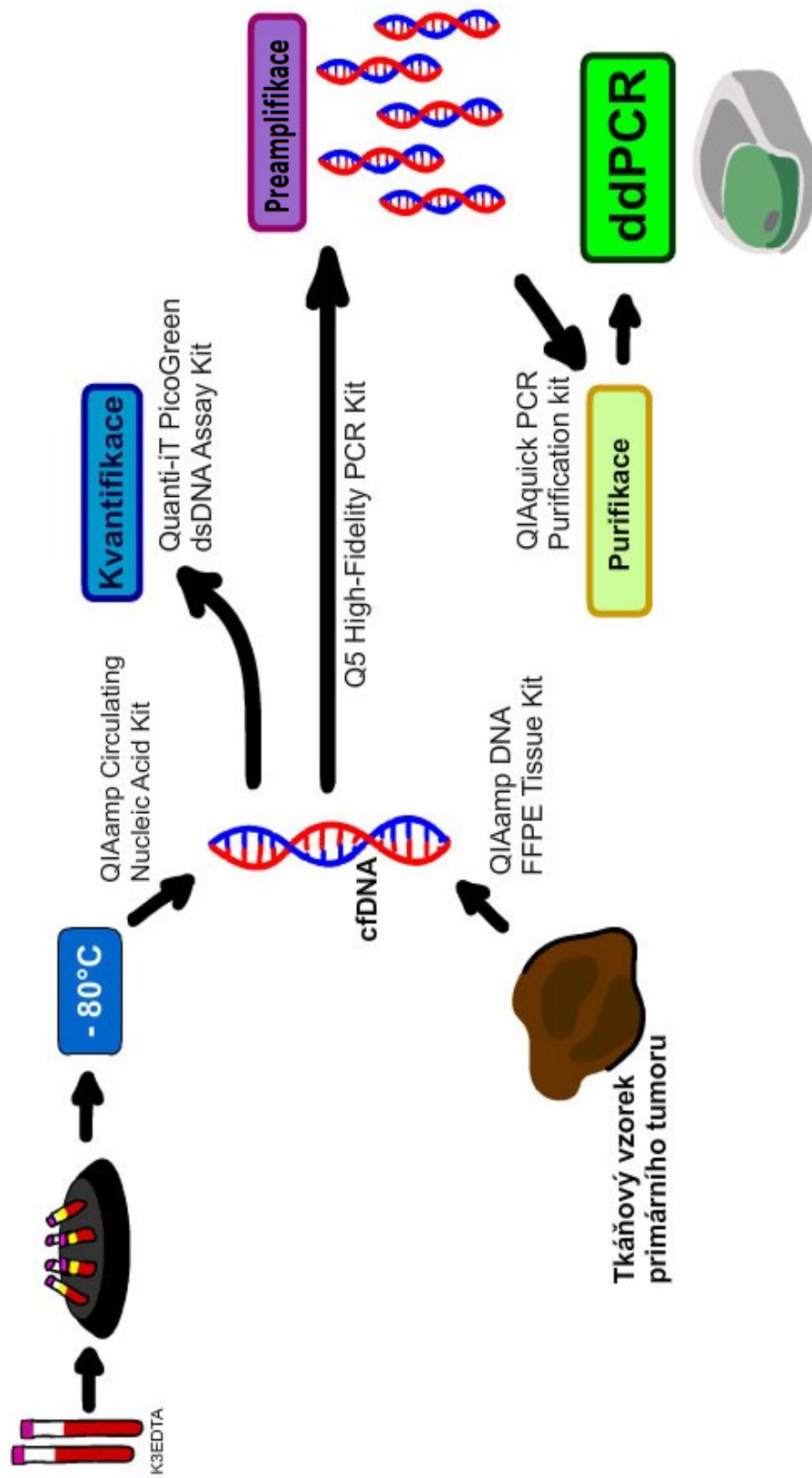
Náběr plné krve, odebraný vždy do dvou 6ml K3EDTA vakuových zkumavek, byl zaslán do Biomedicínského centra Lékařské fakulty UK v Plzni k dalšímu zpracování. Následně byly vzorky odeslány do spolupracujícího onkologického centra MD Anderson Cancer Center v Houstonu v USA, kde se jako v jednom z mála center na světě specializují na vyhodnocení ctDNA u maligního melanomu s využitím metody preamplifikace.

- *Metodika*

Z nabrané plné krve byla nejdříve dvoufázovou centrifugací separována plazma. V první fázi 950 relative centrifugal force (RCF) po dobu 10 minut při teplotě 4 °C a poté při stejné teplotě opět 10 minut 11000 RCF. Poté byla plazma uskladněna při -80 °C k dalšímu použití.

Cell-free DNA (cfDNA) byla izolována v MD Anderson Cancer Center v Houstonu v USA s využitím QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (QIAGEN) a u formalinem fixovaných bloků resekované nádorové tkáně byla DNA z buněk izolována využitím QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN). Dále byla cfDNA kvantifikována využitím Quanti-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Invitrogen) pro zpřesnění výsledků v několika dlučnicích sériích. Následně byla provedena neproporcionální preamplifikace veškeré cfDNA ve vzorku s využitím Q5 High-Fidelity PCR Kit (New England BioLabs Inc.). Takto preamplifikovaný vzorek byl následně purifikován QIAquick PCR Purification kity (QIAGEN) a poté byla provedena kapková digitální polymerázová řetězová reakce (ddPCR) pro stanovení přítomnosti BRAF V600E mutace. Celý postup shrnuje následující schéma (Schéma 2).

Schéma 2 – Postup zpracování cfDNA (MUDr. Vlastimil Woznica)



Pacienti následně podstoupili pravidelné kontroly v ambulanci Oddělení plastické chirurgie a Dermatovenerologické kliniky ve Fakultní nemocnici v Plzni.

Procentuální zastoupení pacientů, u kterých se během dispenzarizace v průběhu studie zjistila recidiva onemocnění, jsme označili jako recurrence rate (RR). DFI je období od data absolvování kurativní chirurgické terapie po datum kdy byla zjištěna recidiva nebo po datum poslední kontroly. OS bylo vypočteno od data stanovení diagnózy po datum poslední kontroly či úmrtí.

K analýze dat byl využit software IBM SPSS Statistics (v.26.0, IBM Corp.). Mezikvartilové rozpětí (IQR), tedy rozdíl mezi třetím a prvním kvantilem, bylo využito k popsání míry variability následujících hodnot. Testování nezávislosti a statistické významnosti bylo provedeno Pearsonovým chí-kvadrátovým testem, Fisherovým exaktním testem a také Mann-Whitney testem. Analýza přežití byla vyhotovena užitím Kaplan-Meierovy analýzy a log-rank testu. Za statisticky významné jsme brali hodnoty $P < 0.05$.

- *Výsledky*

Z osmdesáti výše zmíněných pacientů, zařazených do naší studie, pouze v 52 případech byly k dispozici vzorky primárního tumoru pro stanovení BRAF V600E mutace. Pouze 23 těchto vzorků bylo na BRAF mutaci pozitivní. Co se týče RR, DFI a OS, nebyl prokázán vliv BRAF V600E mutace ve vzorku tumoru ve srovnání s BRAF V600E wild type (WT) vzorky (Tabulka 9).

Tabulka 9 – Souhrn výsledků vyšetření BRAF mutace u tkáňových vzorků (131)

	Recurrence at 6 m		Recurrence at 24 m		Overall Progression Probability		Death Probability		DFS		OS	
	n (%)	p	n (%)	p	n (%)	p	n (%)	p	Median (m)	p	Median (m)	p
MT (n=23)	1 (4.3%)	1	3 (13%)	0.308	5 (21.7%)	0.314	4 (17.4%)	0.686	NR	0.158	NR	0.713
WT (n=29)	2 (6.9%)		8 (27.6%)		10 (34.5%)		3 (10.3%)		NR		NR	

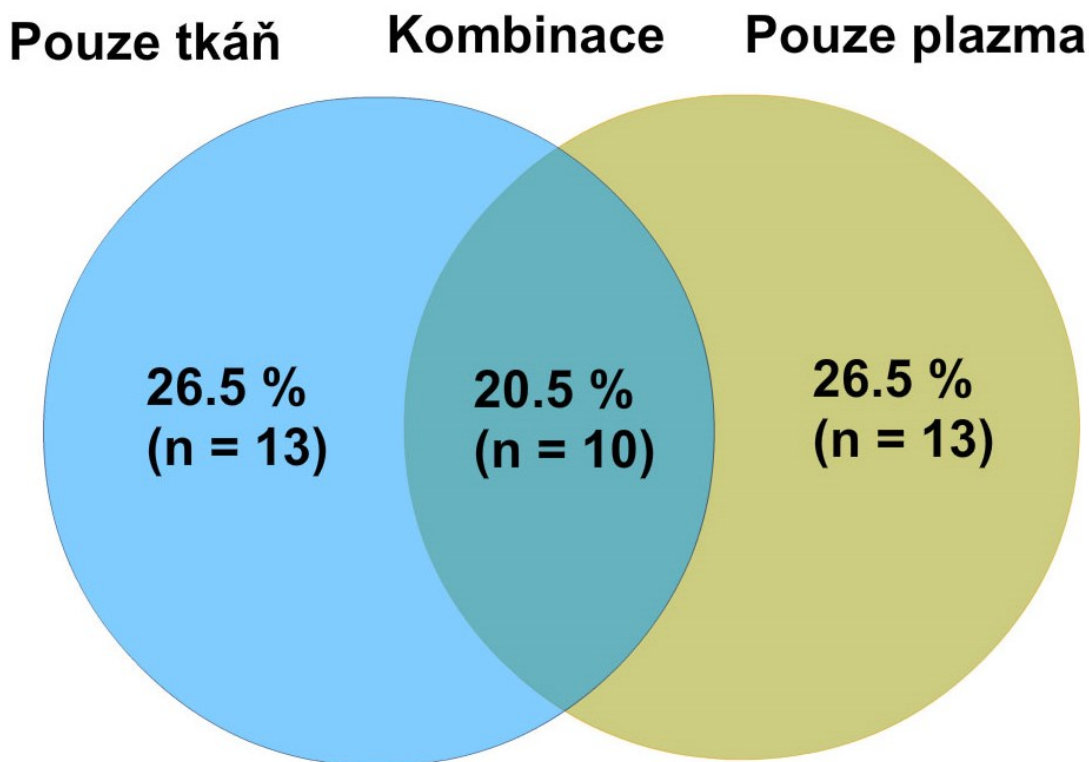
U 76 z osmdesáti zařazených probandů byly k dispozici první tři plazmatické vzorky, tedy vzorky odebrané předoperačně, za hodinu po operaci a s odstupem dvou dnů po operaci. U všech byla stanovena přítomnost a hladina ctDNA s BRAF mutací. U 28 pacientů z výše zmíněných 76 pacientů byla v plazmatických vzorcích odebraných před operací prokázána BRAF V600E mutace (Tabulka 10).

Tabulka 10 – Četnost BRAF V600E mutace ve vzorcích plazmy v jednotlivých časových intervalech (131)

	T1 n = 76	T2 n = 76	T3 n = 76	T4 n = 69	T5 n = 56	T6 n = 42	T7 n = 31	T8 n = 37
MT	28 (36.8%)	20 (26.3%)	24 (31.6%)	25 (36.2%)	17 (30.4%)	19 (45.2%)	12 (40%)	9 (24.3%)
WT	48 (63.2%)	56 (73.7%)	52 (68.4%)	44 (63.8%)	39 (69.6%)	23 (54.8%)	19 (60%)	28 (75.7%)

49 pacientů mělo k dispozici jak vzorky primárního tumoru, tak i plazmatické předoperační vzorky a ve 23 případech těchto pacientů jsme prokázali shodu v pozitivitě či negativitě mutace BRAF V600E v obou dostupných vzorcích, respektive 10 pacientů mělo BRAF V600E mutaci pozitivní v obou vzorcích a 13 těchto pacientů mělo oba vzorky BRAF negativní. To znamená, že zbylých 26 pacientů mělo v jednom ze vzorků pozitivní mutaci BRAF V600E, zatímco druhý vzorek těchto pacientů byl WT. Tento odstavec graficky shrnuje následující diagram (Graf 4).

Graf 4 – Pacienti s BRAF V600E mutací



V souboru předoperačních náběrů se zjistilo, že přítomnost BRAF mutace v předoperačním náběru je spojena s vysokým rizikem recidivy [BRAV 39.3 % (n = 11) versus BRAV WT 16.7 % (n = 8), P = 0.028] i úmrtí [BRAV 21.4 % (n = 6) versus BRAV WT 4.2 % (n = 2), P = 0.046] oproti WT BRAV V600E. Nicméně, medián DFI a OS ve většině případů, pro nedostatečný výskyt recidiv a úmrtí v našem souboru pacientů, nebylo možno určit.

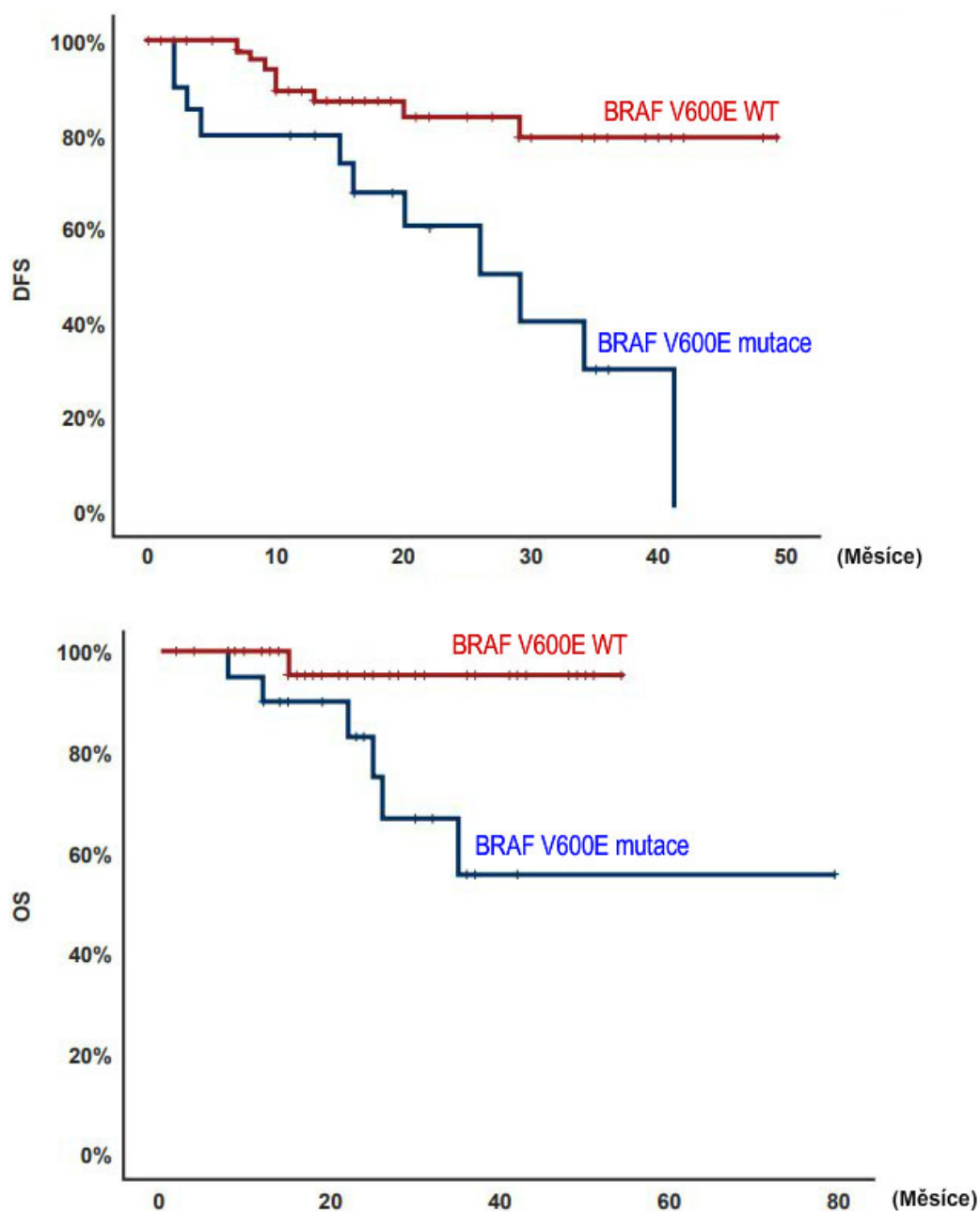
V náběrech, které byly provedeny jednu hodinu po chirurgickém výkonu u 76 pacientů, byla nalezena mutace BRAV V600E ve 26.3 % případů (n = 20). Zajímavé je, že bezprostředně po chirurgickém výkonu nastala změna z BRAV mutované ctDNA na BRAV WT ctDNA až ve 20 % případů (n = 15). Pacienti s BRAV V600E mutací v ctDNA mají oproti pacientům s WT BRAV V600E ctDNA vyšší RR. Celkový výskyt recidivy [BRAV 55 % (n = 11) versus BRAV WT 14.3 % (n = 8), P < 0.001]. RR do 6 měsíců od výkonu [BRAV 20 % (n = 4) versus BRAV WT 0 % (n = 0), P = 0.004]. RR do 2 let [BRAV 35 % (n = 7) versus BRAV WT 12.5 % (n = 7), P = 0.042]. Ačkoli medián DFI a OS ve většině případů opět nebylo možno definovat, BRAV V600E mutace vykazovala kratší DFI (P = 0.001) i OS (P = 0.003). Výše zmíněné údaje shrnuje následující tabulka a graf (Tabulka 11, graf 5).

Tabulka 11 – Vliv BRAF V600E mutace ctDNA v plazmě v definovaných časových intervalech na vývoj onemocnění pacienta

Vztah klinického vývoje pacienta a BRAF V600E mutací ctDNA v plazmatických vzorcích v určených časových intervalech													
	RR v 6 měsících		RR ve 24 měsících		Celková pravděpodobnost recidivy		Pravděpodobnost úmrtí		DFI		OS		
	n (%)	P	n (%)	P	n (%)	P	n (%)	P	Median (Měsíce)	P	Median (Měsíce)	P	
T1 (n = 76)	MT (n = 28) WT (n = 48)	2 (7.1) 2 (4.2)	0.623	7 (25) 7 (14.6)	0.258	11 (39.3) 8 (16.7)	0.028	6 (21.4) 2 (4.2)	0.046	41 NR	0.214	NR NR	0.077
T2 (n = 76)	MT (n = 20) WT (n = 56)	4 (20) 0 (0)	0.004	7 (35) 7 (12.5)	0.042	11 (55) 8 (14.3)	<0.001	6 (30) 2 (3.6)	0.003	29 NR	0.001	NR NR	0.003
T3 (n = 76)	MT (n = 24) WT (n = 52)	3 (12.5) 1 (1.9)	0.09	7 (29.2) 7 (13.5)	0.120	10 (41.7) 9 (17.3)	0.023	3 (12.5) 5 (9.6)	0.702	41 NR	0.129	NR NR	0.943
T4 (n = 69)	MT (n = 25) WT (n = 44)	2 (8) 2 (4.5)	0.617	4 (16) 9 (20.5)	0.756	7 (28.0) 11 (25)	0.785	3 (12) 5 (11.4)	1	41 NR	0.600	NR NR	0.570
T5 (n = 56)	MT (n = 17) WT (n = 39)	3 (17.6) 1 (2.6)	0.079	5 (29.4) 9 (23.1)	0.739	7 (41.2) 11 (28.2)	0.339	4 (23.5) 4 (10.3)	0.228	41 NR	0.746	NR NR	0.437
T6 (n = 42)	MT (n = 19) WT (n = 23)	1 (5.3) 0 (0)	0.452	2 (10.5) 5 (21.7)	0.428	4 (21.1) 6 (26.1)	1	3 (15.8) 2 (8.7)	0.644	NR NR	0.307	NR NR	0.790
T7 (n = 31)	MT (n = 12) WT (n = 19)	2 (16.7) 1 (5.6)	0.548	3 (25) 6 (33.3)	0.704	5 (41.7) 6 (33.3)	0.712	3 (25) 2 (11.1)	0.364	41 NR	0.935	NR NR	0.612
T8 (n = 37)	MT (n = 9) WT (n = 28)	1 (11.1) 1 (3.6)	0.432	2 (22.2) 5 (17.9)	1	2 (22.2) 8 (28.6)	1	1 (11.1) 4 (14.3)	1	NR 34	0.680	NR NR	0.469

Zvýrazněné hodnoty vykazují statistickou významnost (P < 0.05), NR značí neurčenou hodnotu - hodnotu nebylo možné vypočítat.

Graf 5 – DFS a OS u pacientů s BRAF V600E mutovanou ctDNA a BRAF V600E WT ctDNA (Krevní náběry jednu hodinu po operaci)



V náběrech provedených druhý pooperační den vychází opět BRAF mutace ctDNA s vyšším rizikem recidivy [BRAF 41.7 % (n = 10) versus BRAF WT 17.3 % (n = 9), P = 0.023].

Ve všech dalších kontrolních náběrech již mezi BRAF mutantní ctDNA a BRAF WT ctDNA nebyl signifikantní rozdíl v RR, DFI ani OS.

10 Diskuze

Maligní melanom je častým a velmi nebezpečným kožním tumorem vznikající na podkladě maligní transformace melanocytů. Pro příznivou prognózu tohoto onemocnění je zcela zásadní jeho časné odhalení a časné chirurgické odstranění, které je stále jedinou skutečně kurativní terapií, i přes to však určití pacienti s high-risk časným stádiem maligního melanomu vyvinou recidivu v podobě metastatické komplikace do dvou let od provedení kurativního chirurgického zákroku (2).

Využití biomarkerů, které by identifikovaly high-risk pacienty s časným stádiem maligního melanomu, kteří by významně profitovali z nákladné a náročné adjuvantní terapie, by významně ovlivnilo prognózu těchto pacientů. V naší studii jsme se zaměřili na využití ultrasenzitivní detekce BRAF V600E mutace v ctDNA u pacientů s časnými stádii maligního melanomu. Cirkulující tumorová DNA se stala slibným objektem zájmu v oblasti onkologického výzkumu a klinické praxe již roku 1994, kdy byla publikována doktorem B. Vogelemsteinem první studie se zaměřením na detekci mutací v genovém supresoru p53 v plazmě pacientů s rakovinou prsu. Dále studie zaměřená na detekci mutací K-Ras DNA u kolorektálního karcinomu publikována M. S. Koperski a kol. v roce 1997 je považována za jednu z vůbec prvních studií, která zkoumala přítomnost ctDNA v krevním oběhu pacientů s nádorovým onemocněním (132). Od té doby se ctDNA stala předmětem rozsáhlého výzkumu a byla zjištěna její přítomnost u různých typů rakoviny, včetně maligního melanomu (133).

Cirkulující tumorová DNA je uvolňována z nádorových buněk maligního melanomu do krevního oběhu prostřednictvím různých mechanismů například buněčné lýzy, která může být způsobena destrukcí nádorových buněk během nádorového růstu a expanze, či destrukčními imunitními mechanismy organismu pacienta. Dalším způsobem je aktivní uvolňování ctDNA samotnými nádorovými buňkami prostřednictvím exozomů nebo mikrovesikulárních struktur. Kombinací těchto mechanismů se ctDNA dostává do cirkulace a je detekovatelná v krvi pacienta.

CtDNA vykazuje hned několik důležitých vlastností, které ho činí tak atraktivním pro diagnostické a prognostické účely. Mezi tyto klíčové vlastnosti můžeme zahrnout fakt, že analýza ctDNA u každého nádoru poskytne přehled specifických genetických mutací nádoru, a tak jsme nejen schopni určit přítomnost či recidivu tumoru, ale zároveň lze z daných genetických charakteristik určit i bližší prognózu onemocnění a případně se u některých nádorů orientovat i stran jejich rezistence k daným typům terapie

(134). Další důležitou vlastností ctDNA je její dynamická povaha, tedy fakt, že koncentrace ctDNA se může lišit v časovém horizontu onemocnění v závislosti na jeho agresivitě a rezpozivitě k terapeutickým opatřením. Může tedy poskytovat informace o efektivitě probíhající léčby nebo potencionální progresi či relapsu onemocnění (135).

U pacientů s časnými stádii maligního melanomu jsme v naší studii odhalili BRAF V600E mutaci ve vlastní tkáni resekovaného primárního nádoru u 47.2 % pacientů a v předoperačních krevních vzorcích u 37.7 % pacientů. Tato čísla se nijak nevymykají údajům prezentovaných již v předchozích publikacích, například metaanalýze studií mezi léty 1989 až 2010 provedené J. -H. Lee a kol., která čítala bezmála 5500 pacientů a zabývala se výskytem BRAF a NRAS mutace. Zde byla BRAF mutace pozitivní u 41 % pacientů a NRAS mutace u 18 % pacientů (136). Podobných výsledků dosahuje i studie autora E. Hodis a kol., kde sekvenací celých exomů normální a tumorové genomové DNA u 135 pacientů autor a kolektiv potvrzují mimo jiné i podobný poměr výše zmíněných mutací (130). Studie autora L. Tan a kol. uvádí dokonce 54 % zastoupení BRAF mutace a 31 % zastoupení NRAS mutace v jejich souboru 99 pacientů (137). Tumory v časnějších stádiích jeví tendenci vylučovat méně ctDNA než tumory III. stadia, což by mohlo vysvětlovat rozdíl četností BRAF mutace v tkáňovém vzorku a BRAF mutace v ctDNA.

Zajímavé byly především výsledky plazmatických hladin ctDNA jednu hodinu po operaci. Zde byl nález BRAF V600E mutace spojen s vyšší pravděpodobností šestiměsíční, dvouleté i celkové recidivy onemocnění, kratším DFI a OS. To by odpovídalo právě možnosti stanovení pomocí detekce ctDNA takzvané minimální reziduální choroby. Minimální reziduální choroba je termín využívaný k popisu přítomnosti malého množství zbytkových nádorových buněk po provedeném terapeutickém zákroku. Detekce ctDNA se ukazuje jako citlivá metoda pro určení minimální reziduální choroby, která umožňuje identifikovat přítomnost reziduálních nádorových buněk a sledovat potenciální relaps. Velmi podobných výsledků dosáhla i studie T. Reinert a kol. zabývající se analýzou plasmatické ctDNA ultradeep sekvenováním u pacientů s kolorektálním karcinomem, kdy pacienti s přítomnou ctDNA třicátý pooperační den měli sedmkrát vyšší riziko relapsu oproti ctDNA negativním pacientům (138). Schopnost předpovídat časnou recidivu nádorového onemocnění následně umožňuje přijmout proaktivní opatření a přizpůsobit tak léčbu a dispenzarizaci pacientovi na míru, a tím maximalizovat terapeutické výsledky. V našem případě by to znamenalo, že i vysoce rizikovní pacienti s nižšími stádii onemocnění maligním melanomem by mohli profitovat z náročné a nákladné adjuvantní terapie, která by za normálních okolností u těchto pacientů indikována nebyla. Na podobném

principu byla postavena studie J. Tie a kol., která se týkala ctDNA analýzy a predikování rekurence u pacientů s nízkým stádiem kolorektálního karcinomu (139).

Další zajímavou skutečností byla dvacetiprocentní konverze z BRAF mutace pozitivní ctDNA před operací na BRAF WT ctDNA jednu hodinu po operaci. To by mohlo poukazovat na radikální resekci tumoru bez reziduální choroby, vzhledem ke krátkému poločasu ctDNA v plazmě (8 až 147 minut) což popisuje K. Chen a kol. ve své práci týkající se 205 prospektivně testovaných pacientů se suspektním karcinomem plic, kde navíc popisují závislost množství ctDNA v plazmě na velikosti primárního tumoru (140).

Tématem konverze mutací v ctDNA se také zabývala například studie zabývající se časným určováním terapeutické responsivity u pacientů léčených s metastatickým kolorektálním karcinomem. Autor J. Tie a kol. zde popisují průběh onemocnění u 53 pacientů s metastatickým kolorektálním karcinomem, kteří dostávali standardní chemoterapeutickou léčbu první linie. Hladiny CEA a ctDNA byly hodnoceny před léčbou, tři dny po léčbě a před druhým cyklem chemoterapie. Zároveň u každého pacienta bylo provedeno CT vyšetření před léčbou a s odstupem 8 týdnů. U každého pacienta byla stanovena úroveň ctDNA v plazmě pomocí digitální genomické analýzy nazvané Safe-SeqS. Mutace vhodné k analýze byly identifikovány u 52 pacientů, tyto specifické mutace u každého pacienta byly detekovatelné i v ctDNA u 48 z těchto pacientů (mutace metastázy a mutace v ctDNA tedy souhlasila v 92,3 % případů). Významné snížení hladiny ctDNA (medián 5,7krát) bylo pozorováno před druhým cyklem chemoterapie což korelovalo i s CT nálezy. U pacientů, u kterých došlo k významnému snížení ctDNA (≥ 10 krát) bylo pozorováno významné prodloužení doby do progresu onemocnění (141).

Většina studií týkajících se ctDNA maligního melanomu jsou zaměřena na IV. stadium onemocnění a ctDNA je zde využívána především na určení vhodnosti cílené terapie, jejích účinků a stanovování prognózy onemocnění, jako je tomu například v práci publikované Forthun R.B. a kol. publikované v roce 2019, která se zabývala využitím ctDNA k predikci a monitorování odpovědi na léčbu u pacientů s metastatickým maligním melanomem léčených bavacizumabem. Výzkum zahrnoval analýzu mutací souvisejících s rakovinou a angiogenezou ve vzorcích maligního melanomu a ctDNA u 26 pacientů. Bylo zjištěno, že pacienti s ctDNA BRAF/NRAS vyšší než 1 % na začátku léčby měli významně sníženou dobu do progresu nemoci a celkového přežití. Pacienti s ctDNA BRAF/NRAS vyšší než 1 % během léčby také dosáhli podobných výsledků. Naopak nižší hladiny ctDNA BRAF/NRAS a normální hladiny laktát dehydrogenázy indikují zvýšenou odpověď na léčbu.

Také bylo zjištěno, že ctDNA BRAF/NRAS je lepším prediktorem odpovědi na léčbu, přežití bez progresu onemocnění i celkového přežití než hladina LDH na začátku léčby. Studie navíc prokázala že mutace v genech BRAF a NRAS jsou lepšími biomarkery pro predikci odpovědi než mutace v TERT promoteru (142).

V posledních letech však přibývá i studií, které se zabývají ctDNA analýzou u časných stádií maligního melanomu, z nichž můžeme jmenovat například studii L. Tan a kol. zaměřenou na predikci a monitorování relapsu u maligního melanomu III. stádia s využitím ctDNA, která se však zabývá pouze určením pacientů se zvýšeným rizikem recidivy u III. stádia maligního melanomu, kde se pětileté přežití pohybuje mezi 93 % (stadium IIIA) až po 32 % (stadium IIID). Hlavním pilířem léčby u 133 pacientů v této studii byla resekce primárního melanomu s vyšetřením sentinelové uzliny, či kompletní lymfadenektomií spádového regiona. U 99 pacientů (79 %) byla zjištěna alespoň jedna somatická mutace. Nejčastěji byla zjištěna mutace BRAF (54 %) a NRAS (31 %), dále byly identifikovány alternativní mutace v genech TERT promoteru, TP53 a KIT (15 %). U 37 pacientů byla detekována ctDNA přičemž hladina ctDNA se zvyšovala s narůstajícím stadiem onemocnění. Přítomnost ctDNA při vstupu do studie byla signifikantně spojena s hodnotou Breslow indexu a stadiem onemocnění. Přítomnost ctDNA po operaci naopak významně korelovala s přítomností ulcerace primárního ložiska tumoru. U pacientů s detekovatelnou ctDNA při vstupu do studie i v pooperačním náběru bylo pozorováno větší množství relapsů a vzdálených metastáz než u pacientů bez detekovatelné ctDNA, přičemž pooperační analýza ctDNA se jevil jako prediktor s významnější vahou než předoperační (137).

Co se týče naší studie, vyjma prvního pooperačního náběru ctDNA, veškeré ostatní pooperační náběry vyšly jako statisticky nevýznamné. Z jakého důvodu se tak stalo, zatím není zcela objasněno. Jednou z pravděpodobných příčin je stále ještě krátký časový úsek sledování pacientů. Je možné, že s narůstajícím intervalem dispenzarizace, budou signifikantně vycházet i další následné náběry.

Nynější terapeutický přístup lokálního a lokoregionálního onemocnění maligním melanomem je založen především na chirurgické léčbě s následným možným podrobením rizikových pacientů adjuvantní terapii. Naše výsledky poukazují na skutečnost, že stanovením ctDNA jednu hodinu po chirurgickém výkonu je možné identifikovat vysoce rizikové nemocné, kteří by z adjuvantní terapie výrazně profitovali. Ačkoli je tuto studii ještě nutné potvrdit na širším vzorku nemocných, testování ctDNA je možné zvažovat jako budoucí parametr indikace adjuvantní terapie u pacientů s časným stadiem maligního melanomu.

Dále jsme zaznamenali, že téměř polovina pacientů s BRAF WT tkáňovým vzorkem primárního tumoru alespoň v jednom z náběrů měla ctDNA BRAF V600E mutaci. Tento jev byl již popsán například u pokročilého cholangiokarcinomu. P. Kasi a kol. prezentují v roce 2021 výsledky vyšetření 137 subjektů s pokročilým cholangiokarcinomem, kde byl třikrát častější nález mutace BRAF V600E ve fluidní biopsii oproti tkáňovému bioptickému vzorku (143). Toto se dá vysvětlit heterogenitou nádoru. Heterogenita nádoru je pojem, který popisuje variabilitu a různorodost buněk v rámci nádorové tkáně. Nádor se skládá z populací buněk, které mohou mít různé genetické a epigenetické vlastnosti, fyziologické stavy a funkční charakteristiky. Tato variabilita se může týkat různých aspektů, včetně morfologie buněk, genetických mutací, exprese genů, buněčného cyklu, schopnosti metastazovat a reagovat na léčbu. Heterogenita nádoru může být závažným faktorem ovlivňujícím prognózu, léčebnou odpověď a vývoj rezistence v rámci nádorové terapie. Rozmanitost buněk v nádoru může způsobit, že některé buňky jsou náchylnější k léčbě, zatímco jiné mohou vykazovat rezistenci vůči terapii. Tím se zvyšuje pravděpodobnost, že i při úspěšném potlačení jedné populace buněk nádoru se mohou jiné populace vyvinout a vést k recidivě. Nádor se tedy může skládat z více různých typů nádorových buněk. Některé tyto buňky se nemusí odhalit během genetického vyšetření tkáňového vzorku, ale mohou být odhaleny až s odstupem v ctDNA.

Abychom vyloučili vliv BRAF V600E mutace tkáňového vzorku na náběry po jedné hodině oproti BRAF V600E WT tkáňovým vzorkům, provedli jsme dodatečnou analýzu podskupiny s BRAF V600E mutovaným tkáňovým vzorkem a podskupiny s BRAF V600E WT tkáňovým vzorkem.

V první skupině byli pacienti s BRAF V600E mutací ve tkáňovém vzorku primárního nádoru ($n = 23$), zde byla srovnána skupina s přítomnou BRAF ctDNA v plazmě jednu hodinu po operaci se skupinou BRAF WT ctDNA v plazmě jednu hodinu po operaci. Zde BRAF mutace pozitivní skupina vykazovala vyšší tendence k recidivě [BRAF 57.1 % ($n = 4$) versus BRAF WT 6.7 % ($n = 1$), $P = 0.021$] vyšší riziko úmrtí [BRAF 57.1 % ($n = 4$) versus BRAF WT 0 % ($n = 0$), $P = 0.005$] a kratší medián DFI ($P = 0.002$) a kratší medián OS ($P < 0.001$) (Tabulka 12).

Tabulka 12 – Vliv BRAF V600E mutace ctDNA v plazmě v definovaných časových intervalech na vývoj onemocnění pacienta. (Jedná se pouze o pacienty s BRAF V600E mutací ve tkáňovém vzorku).

		Recurrence at 6 m		Recurrence at 24 m		Overall Progression Probability		Death Probability		DFS		OS	
		n (%)	p	n (%)	p	n (%)	p	n (%)	p	Median (m)	p	Median (m)	p
T1 (n=23)	MT (n=10)	1 (10%)	0.435	2 (20%)	0.560	3 (30%)	0.618	2 (20%)	1	NR	0.541	NR	0.934
	WT (n=13)	0 (0%)		1 (7.7%)		2 (15.4%)		2 (15.4%)		NR		NR	
T2 (n=22)	MT (n=7)	1 (14.3%)	0.318	2 (28.6%)	0.227	4 (57.1%)	0.021	4 (57.1%)	0.005	26	0.002	NR	<0.001
	WT (n=15)	0 (0%)		1 (6.7%)		1 (6.7%)		0 (0%)		NR		NR	
T3 (n=22)	MT (n=8)	1 (12.5%)	0.364	2 (25%)	0.527	2 (25%)	1	1 (12.5%)	1	NR	0.700	NR	0.748
	WT (n=14)	0 (0%)		1 (7.1%)		3 (21.4%)		3 (21.4%)		NR		NR	
T4 (n=21)	MT (n=6)	0 (0%)	1	1 (16.7%)	1	2 (33.3%)	0.598	1 (16.7%)	1	NR	0.729	NR	0.738
	WT (n=15)	1 (6.7%)		2 (13.3%)		3 (20%)		3 (20%)		NR		NR	
T5 (n=21)	MT (n=9)	1 (11.1%)	0.429	1 (11.1%)	1	2 (22.2%)	1	2 (22.2%)	1	NR	0.929	NR	0.728
	WT (n=12)	0 (0%)		2 (16.7%)		3 (25%)		2 (16.7%)		NR		NR	
T6 (n=19)	MT (n=11)	0 (0%)	NA	0 (0%)	0.421	1 (9.1%)	0.546	1 (9.1%)	1	NR	0.297	NR	0.695
	WT (n=8)	0 (0%)		1 (12.5%)		2 (25%)		1 (12.5%)		NR		NR	
T7 (n=10)	MT (n=5)	0 (0%)	1	0 (0%)	0.444	1 (20%)	1	1 (20%)	1	NR	0.282	NR	0.808
	WT (n=5)	1 (20%)		2 (40%)		2 (40%)		1 (20%)		NR		NR	
T8 (n=11)	MT (n=3)	1 (33.3%)	0.273	1 (33.3%)	0.491	1 (33.3%)	1	1 (33.3%)	1	NR	0.781	NR	0.959
	WT (n=8)	0 (0%)		1 (12.5%)		3 (37.5%)		2 (25%)		34		NR	

Zvýrazněné hodnoty vykazují statistickou významnost ($P < 0.05$), NR značí neurčenou hodnotu – hodnotu nebylo možné vypočítat.

Ve druhé skupině byli pacienti s BRAF V600E WT tkáňovým vzorkem primárního nádoru ($n = 29$). I zde pacienti s BRAF V600E mutací ctDNA, po jedné hodině od proběhlé operace, vykazovali vyšší riziko recidivy v porovnání s BRAF WT ctDNA pacienty [BRAF 66.7 % ($n = 6$) versus BRAF WT 23.5 % ($n = 4$), $P = 0.046$]. Nicméně, nebyl zde signifikantní rozdíl v riziku úmrtí pacientů ($P = 0.268$) ani v mediánu OS (0.286). A pouze náznak sklonu skupiny BRAF ctDNA ke kratšímu DFI ($P = 0.06$) (Tabulka 13).

Tabulka 13 – Vliv BRAF V600E mutace ctDNA v plazmě v definovaných časových intervalech na vývoj onemocnění pacienta. (Jedná se pouze o pacienty s tkáňovým vzorkem BRAF V600E WT).

		Recurrence at 6 m		Recurrence at 24 m		Overall Progression Probability		Death Probability		DFS		OS	
		n (%)	p	n (%)	p	n (%)	p	n (%)	p	Median (m)	p	Median (m)	p
T1 (n=26)	MT (n=13)	1 (7.7%)	1	4 (30.8%)	1	6 (46.2%)	0.420	3 (23.1%)	0.220	41	0.481	NR	0.096
	WT (n=13)	1 (7.7%)		4 (30.8%)		4 (30.8%)		0 (0%)		NR		NR	
T2 (n=26)	MT (n=9)	2 (22.2%)	0.111	4 (44.4%)	0.382	6 (66.7%)	0.046	2 (22.2%)	0.268	29	0.06	NR	0.286
	WT (n=17)	0 (0%)		4 (23.5%)		4 (23.5%)		1 (5.9%)		NR		NR	
T3 (n=26)	MT (n=11)	1 (9.1%)	1	4 (36.4%)	0.683	6 (54.5%)	0.228	2 (18.2%)	0.556	41	0.264	NR	0.455
	WT (n=15)	1 (6.7%)		4 (26.7%)		4 (26.7%)		1 (6.7%)		NR		NR	
T4 (n=24)	MT (n=11)	1 (9.1%)	1	2 (18.2%)	0.386	3 (27.3%)	0.423	2 (18.2%)	0.576	NR	0.194	NR	0.492
	WT (n=13)	1 (7.7%)		5 (38.5%)		6 (46.2%)		1 (7.7%)		29		NR	
T5 (n=19)	MT (n=6)	1 (16.7%)	1	3 (50%)	1	4 (66.7%)	0.350	2 (33.3%)	0.222	13	0.352	NR	0.181
	WT (n=13)	1 (7.7%)		5 (38.5%)		5 (38.5%)		1 (7.7%)		NR		NR	
T6 (n=12)	MT (n=6)	1 (16.7%)	1	2 (33.3%)	0.567	3 (50%)	1	2 (33.3%)	1	41	0.615	NR	0.474
	WT (n=6)	0 (0%)		4 (66.7%)		4 (66.7%)		1 (16.7%)		10		NR	
T7 (n=13)	MT (n=5)	1 (20%)	0.385	1 (20%)	0.565	2 (40%)	1	1 (20%)	1	41	0.373	NR	0.755
	WT (n=8)	0 (0%)		4 (50%)		4 (50%)		1 (12.5%)		13		NR	
T8 (n=14)	MT (n=4)	0 (0%)	NA	1 (25%)	1	1 (25%)	1	0 (0%)	1	NR	0.832	NR	0.170
	WT (n=10)	0 (0%)		2 (20%)		3 (30%)		2 (20%)		41		NR	

Zvýrazněné hodnoty vykazují statistickou významnost ($P < 0.05$), NR značí neurčenou hodnotu – hodnotu nebylo možné vypočítat.

Ačkoli pacienti s tkáňovou mutací BRAF V600E vykazovali vyšší shodu s výsledky, u obou podskupin v případě prokázání BRAF V600E mutace v ctDNA jednu hodinu po operaci byla RR vyšší.

Naše studie je zcela unikátní využitím metody selektivní preamplifikace tumorové DNA a kvantifikační metody ddPCR u maligního melanomu. Podstata selektivní preamplifikace spočívá v tom, že se specificky zvyšuje počet kopií nádorové DNA oproti normálnímu genomu, což umožňuje snadnější a přesnější detekci mutací i u velmi omezeného množství vzorku či velmi nízké koncentrace cílové DNA sekvence. Toho je možno dosáhnout využitím správné koncentrace speciálně připravených primerů nebo sond, které jsou specificky navrženy pro vázání mutované oblasti v nádorové DNA, nebo využitím padělaného DNA přídatného molekulárního markeru, který následně umožňuje selektivní amplifikaci označeného úseku. Některé výše uvedené studie byly postaveny na základě hlubokého sekvenování, což je alternativní kvantifikační metoda k naší využití ddPCR. Tato metoda je navržena jako ekonomická metoda obecného profilování ctDNA a identifikaci širokého spektra mutací v různých typech nádoru. Obecně je však pro absolutní kvantifikaci jedné cílové mutace ddPCR preferovanou metodou.

Přesto naše studie měla několik nedostatků. Prvním nedostatkem je relativně malý objem probandů navíc s rozdílnými stádii onemocnění. Dále přibližně 35 % pacientů nemělo k dispozici vzorek tkáně tumoru pro určení BRAF V600E mutace v nádorové tkáni. Dále také ne všichni pacienti měli veškeré plánované náběry krve.

Navzdory veškerým výše uvedeným nedostatkům se nám podařilo prokázat, že koncept detekce BRAF V600E mutace ctDNA v plazmě odebrané po operaci může být využit k identifikaci pacientů s vysokým rizikem recidivy a úmrtí. Tito pacienti následně budou významně profitovat z intenzivnější dispenzarizace, a především z náročné a nákladné adjuvantní terapie.

Ačkoli je pozitivní přínos ctDNA analýzy jednoznačný, je zde stále několik omezení, která brání plnému využití této metody. I přes pokroky v technologii analýzy ctDNA stále existují výzvy spojené s citlivostí a specificitou této metody. Nízké hladiny ctDNA ve vzorcích a četné polymorfismy jednotlivých mutací mohou stále značně ovlivnit výsledky vyšetření. Dále pro přesné a interpretovatelné výsledky je nutné zmapovat celou nádorovou DNA, což mnohdy komplikuje již výše zmíněná heterogenita nádorů.

V budoucnu by mohla být metoda ctDNA analýzy využívána především ve smyslu personalizované medicíny. Bude umožněna identifikace specifických mutací a sledování jejich přítomnosti v organismu pacienta, což umožní přesné přizpůsobení terapie jednotlivým pacientům a léčit je tak zcela individuálně. Dále by mohla sloužit k monitorování odpovědi jednotlivých pacientů na zavedenou terapii a případně umožnit rychlou a cílenou reakci na

změny mutací a vývoj nádorového onemocnění včasnou úpravou terapie. V případě remise onemocnění se stanovení ctDNA dá využít k časnému stanovení recidivy, a to ve chvíli, kdy jiné dispenzarizační metody budou vycházet negativně. To by umožnilo časnou terapeutickou intervenci a významné zlepšení prognózy nemocných s recidivou.

Další slibnou metodu představuje kombinace ctDNA analýzy s dalšími diagnostickými nástroji jako jsou zobrazovací metody, tkáňové biopsie, analýza RNA či kombinace s jinými nádorovými markery.

Pro další extenzivní rozvoj ctDNA analýzy však bude potřeba standardizace a validace metod stanovení. Jednotné a standardizované postupy a kritéria umožní komparabilitu výsledků mezi různými studii a zajistí přesnost a spolehlivost jednotlivých analýz. Dále bude nezbytně nutné rozšířit spektrum stanovovaných nádorů. V dnešní době se zabýváme v rámci stanovování ctDNA pouze omezeným množstvím nádorů, a to především jejich pozdními stádii. Budoucnost spočívá v rozšíření ctDNA metod i na časnější stádia nádorů a na nádorová onemocnění s nižší prevalencí.

Z technologického hlediska bude nejspíše pro další vývoj této metody důležitý také rozvoj nových levnějších technologických platforem a amplifikačních metod, zlepšení detekčních limitů a možná i využití umělé inteligence, či strojového učení zvýší v budoucnu efektivitu této velmi perspektivní a inovativní metody (144).

11 Shrnutí

Pro příznivou prognózu onemocnění maligním melanomem je zcela zásadní jeho časné chirurgické odstranění, které je stále jedinou skutečně kurativní terapií. Určití pacienti s high-risk časným stádiem maligního melanomu vyvinou recidivu v podobě metastatické komplikace do dvou let od provedení kurativního chirurgického zákroku.

V posledních letech byl prokázán přínos cílené léčby a imunoterapie (adjuvantní léčba) u pacientů s lokálně pokročilým stádiem maligního melanomu po resekci primárního nádoru a uzlinových metastáz.

U pacientů s nálezem BRAF V600E mutace byla prokázána signifikantně vyšší pravděpodobnost šestiměsíční, dvouleté i celkové recidivy onemocnění a také kratší DFI a OS.

Výsledky naší studie poukazují na skutečnost, že stanovením ctDNA jednu hodinu po chirurgickém výkonu je možné identifikovat vysoce rizikové nemocné, kteří by z adjuvantní terapie výrazně profitovali.

Dvacetiprocentní konverze z BRAF mutace pozitivní ctDNA před operací na BRAF WT ctDNA jednu hodinu po operaci může být indikátorem radikální resekce tumoru bez reziduální choroby.

Ačkoli je tuto studii ještě nutné potvrdit na širším vzorku nemocných, podařilo se prokázat, že koncept detekce BRAF V600E mutace ctDNA v plazmě odebrané po operaci může být využit k identifikaci pacientů s vysokým rizikem recidivy a úmrtí. Tito pacienti následně budou významně profitovat z intenzivnější dispenzarizace, a především z náročné a nákladné adjuvantní terapie.

12 Reference

1. Heistein JB, Acharya U. Malignant Melanoma. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 [citován 22. prosinec 2021]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470409/>
2. von Schuckmann LA, Hughes MCB, Ghiasvand R, Malt M, van der Pols JC, Beesley VL, et al. Risk of Melanoma Recurrence After Diagnosis of a High-Risk Primary Tumor. *JAMA Dermatology* [Internet]. 1. červen 2019 [citován 27. únor 2023];155(6):688–93. Dostupné z: <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2019.0440>
3. Adjuvant Pembrolizumab versus Placebo in Resected Stage III Melanoma | *NEJM* [Internet]. [citován 27. únor 2023]. Dostupné z: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1802357>
4. Hodi FS, O’Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 19. srpen 2010 [citován 5. březem 2023];363(8):711–23. Dostupné z: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1003466>
5. Adjuvant Nivolumab versus Ipilimumab in Resected Stage III or IV Melanoma | *NEJM* [Internet]. [citován 27. únor 2023]. Dostupné z: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1709030>
6. Garibyan L, Fisher DE. How Sunlight Causes Melanoma. *Curr Oncol Rep* [Internet]. 1. září 2010 [citován 11. duben 2022];12(5):319–26. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11912-010-0119-y>
7. Krajsová I. Melanom [Internet]. Praha: Maxdorf; 2006. 334 s. Dostupné z: https://www.megaknihy.cz/medicina/201578-melanom.html?utm_ce=ns
8. Holm-Schou ASS, Philipsen PA, Wulf HC. Skin cancer phototype: A new classification directly related to skin cancer and based on responses from 2869 individuals. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine* [Internet]. 2019 [citován 12. duben 2022];35(2):116–23. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/phpp.12432>
9. Sun X, Zhang N, Yin C, Zhu B, Li X. Ultraviolet Radiation and Melanomagenesis: From Mechanism to Immunotherapy. *Frontiers in Oncology* [Internet]. 2020 [citován 11. duben 2022];10. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2020.00951>

10. Dennis LK. Cumulative Sun Exposure and Melanoma in a Population-Based Case–Control Study: Does Sun Sensitivity Matter? *Cancers* [Internet]. leden 2022 [citován 12. duben 2022];14(4):1008. Dostupné z: <https://www.mdpi.com/2072-6694/14/4/1008>
11. Thomas NE. BRAF somatic mutations in malignant melanoma and melanocytic naevi. *Melanoma Research* [Internet]. duben 2006 [citován 18. duben 2022];16(2):97–103. Dostupné z: https://journals.lww.com/melanomaresearch/Abstract/2006/04000/BRAF_somatic_mutations_in_malignant_melanoma_and.1.aspx
12. Osídlení Austrálie | Austrálie | Pedagogická fakulta Masarykovy univerzity [Internet]. [citován 19. duben 2022]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/pedf/js13/australie/web/pages/03-osidleni.html>
13. Erdmann F, Lortet-Tieulent J, Schüz J, Zeeb H, Greinert R, Breitbart EW, et al. International trends in the incidence of malignant melanoma 1953–2008—are recent generations at higher or lower risk? *International Journal of Cancer* [Internet]. 2013 [citován 19. duben 2022];132(2):385–400. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ijc.27616>
14. Melanoma skin cancer incidence statistics [Internet]. Cancer Research UK. 2015 [citován 19. duben 2022]. Dostupné z: <https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/melanoma-skin-cancer/incidence>
15. Grin CM, Kopf AW, Welkovich B, Bart RS, Levenstein MJ. Accuracy in the Clinical Diagnosis of Malignant Melanoma. *Archives of Dermatology* [Internet]. 1. červen 1990 [citován 19. duben 2022];126(6):763–6. Dostupné z: <https://doi.org/10.1001/archderm.1990.01670300063008>
16. Morton CA, Mackie RM. Clinical accuracy of the diagnosis of cutaneous malignant melanoma. *Br J Dermatol* [Internet]. 1. únor 1998 [citován 19. duben 2022];138(2):283–7. Dostupné z: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.1998.02075.x>
17. Mayer J. Systematic review of the diagnostic accuracy of dermatoscopy in detecting malignant melanoma. *Med J Aust* [Internet]. 1. srpen 1997 [citován 19. duben 2022];167(4):206–10. Dostupné z: <https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.1997.tb138847.x>
18. Lorentzen HF, Weismann K, Larsen FG. Structural asymmetry as a dermatoscopic indicator of malignant melanoma – a latent class analysis

- of sensitivity and classification errors. *Melanoma Research* [Internet]. říjen 2001 [citován 20. duben 2022];11(5):495–501. Dostupné z: https://journals.lww.com/melanomaresearch/Abstract/2001/10000/Structural_asymmetry_as_a_dermatoscopic_indicator.9.aspx
19. Aivazian K, Ahmed T, El Sharouni MA, Stretch JR, Saw RPM, Spillane AJ, et al. Histological regression in melanoma: impact on sentinel lymph node status and survival. *Mod Pathol* [Internet]. listopad 2021 [citován 20. duben 2022];34(11):1999–2008. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/s41379-021-00870-2>
20. McClain SE, Mayo KB, Shada AL, Smolkin ME, Patterson JW, Slingluff CL. Amelanotic melanomas presenting as red skin lesions: a diagnostic challenge with potentially lethal consequences: Amelanotic melanomas presenting as red skin lesions. *International Journal of Dermatology* [Internet]. duben 2012 [citován 20. duben 2022];51(4):420–6. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-4632.2011.05066.x>
21. Pizzichetta MA, Talamini R, Stanganelli I, Puddu P, Bono R, Argenziano G, et al. Amelanotic/hypomelanotic melanoma: clinical and dermoscopic features. *Br J Dermatol* [Internet]. červen 2004 [citován 20. duben 2022];150(6):1117–24. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2133.2004.05928.x>
22. Friedman RJ, Rigel DS, Kopf AW. Early detection of malignant melanoma: the role of physician examination and self-examination of the skin. *CA Cancer J Clin.* červen 1985;35(3):130–51.
23. Abbasi NR, Yancovitz M, Gutkowitz-Krusin D, Panageas KS, Mihm MC, Googe P, et al. Utility of Lesion Diameter in the Clinical Diagnosis of Cutaneous Melanoma. *Archives of Dermatology* [Internet]. 1. duben 2008 [citován 20. duben 2022];144(4):469–74. Dostupné z: <https://doi.org/10.1001/archderm.144.4.469>
24. Higgins II HW, Lee KC, Leffell DJ. Point of care cutaneous imaging technology in melanoma screening and mole mapping. *F1000Prime Rep* [Internet]. 6. květen 2014 [citován 21. duben 2022];6:34. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4017910/>
25. MacLellan AN, Price EL, Publicover-Brouwer P, Matheson K, Ly TY, Pasternak S, et al. The use of noninvasive imaging techniques in the diagnosis of melanoma: a prospective diagnostic accuracy study. *Journal of the American Academy of Dermatology* [Internet]. 1. srpen 2021

- [citován 21. duben 2022];85(2):353–9. Dostupné z: [https://www.jaad.org/article/S0190-9622\(20\)30559-4/fulltext](https://www.jaad.org/article/S0190-9622(20)30559-4/fulltext)
26. Types of melanoma | Cancer Research UK [Internet]. [citován 4. květen 2022]. Dostupné z: <https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/melanoma/stages-types/types>
27. Superficial spreading melanoma [Internet]. Cancer Treatment Centers of America. 2021 [citován 4. květen 2022]. Dostupné z: <https://www.cancercenter.com/cancer-types/melanoma/types/superficial-spreading-melanoma>
28. Nodular melanoma | DermNet NZ [Internet]. [citován 5. květen 2022]. Dostupné z: <https://dermnetnz.org/topics/nodular-melanoma>
29. Lentigo Maligna Melanoma: Overview, Etiology and Pathophysiology, Epidemiology. 15. červenec 2021 [citován 5. květen 2022]; Dostupné z: <https://emedicine.medscape.com/article/279839-overview>
30. Xiong M, Charifa A, Chen CSJ. Lentigo Maligna Melanoma [Internet]. StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; 2021 [citován 5. květen 2022]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482163/>
31. Arango Abisaad J, Arciniegas Grisales V, Londoño García Á, Vasquez Trespalacios EM, Jiménez Calfat G, Cuello López JM. [Translated article] Characteristics of Acral Lentiginous Melanoma According to Location in Stress- or Non–Stress-Bearing Areas: A Retrospective Study of 95 Patients. *Actas Dermosifiliogr* [Internet]. 1. únor 2022 [citován 6. květen 2022];113(2):T134–40. Dostupné z: <http://www.actasdermo.org/es-translated-article-characteristics-acral-lentiginous-articulo-S0001731022000527>
32. Bradford PT, Goldstein AM, McMaster ML, Tucker MA. Acral Lentiginous Melanoma: Incidence and Survival Patterns in the United States, 1986-2005. *Archives of Dermatology* [Internet]. 1. duben 2009 [citován 6. květen 2022];145(4):427–34. Dostupné z: <https://doi.org/10.1001/archdermatol.2008.609>
33. Phan A, Touzet S, Dalle S, Ronger-Savlé S, Balme B, Thomas L. Acral lentiginous melanoma: a clinicoprognostic study of 126 cases. *Br J Dermatol*. září 2006;155(3):561–9.

34. Mole RJ, MacKenzie DN. Subungual Melanoma. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [citován 6. květen 2022]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482480/>
35. Feller L, Masilana A, Khammissa RA, Altini M, Jadwat Y, Lemmer J. Melanin: the biophysiology of oral melanocytes and physiological oral pigmentation. *Head Face Med* [Internet]. 24. březen 2014 [citován 6. květen 2022];10:8. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3994327/>
36. Mikkelsen LH, Larsen AC, von Buchwald C, Drzewiecki KT, Prause JU, Heegaard S. Mucosal malignant melanoma – a clinical, oncological, pathological and genetic survey. *APMIS* [Internet]. 2016 [citován 6. květen 2022];124(6):475–86. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/apm.12529>
37. Conjunctival Melanoma: Overview, Etiology, Epidemiology. 9. březen 2022 [citován 7. květen 2022]; Dostupné z: <https://emedicine.medscape.com/article/1191840-overview#a4>
38. Feng Z, Wu X, Chen V, Velie E, Zhang Z. Incidence and survival of desmoplastic melanoma in the United States, 1992–2007. *Journal of Cutaneous Pathology* [Internet]. 2011 [citován 7. květen 2022];38(8):616–24. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1600-0560.2011.01704.x>
39. Desmoplastic melanoma [Internet]. [citován 7. květen 2022]. Dostupné z: <https://www.pathologyoutlines.com/topic/skintumormelanocyticdesmoplasticmelanoma.html>
40. Nicolson NG, Han D. Desmoplastic melanoma. *Journal of Surgical Oncology* [Internet]. 2019 [citován 7. květen 2022];119(2):208–15. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jso.25317>
41. Wasif N, Gray RJ, Pockaj BA. Desmoplastic melanoma - the step-child in the melanoma family? *J Surg Oncol.* únor 2011;103(2):158–62.
42. Guadagnolo BA, Prieto V, Weber R, Ross MI, Zagars GK. The role of adjuvant radiotherapy in the local management of desmoplastic melanoma. *Cancer.* 1. květen 2014;120(9):1361–8.
43. Glezgová J. Oční klinika VFN a 1. LF UK, Praha. :4.
44. Homsí J, Kashani-Sabet M, Messina JL, Daud A. Cutaneous Melanoma: Prognostic Factors. *Cancer Control* [Internet]. 1. říjen 2005 [citován 9.

- květen 2022];12(4):223–9. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/107327480501200403>
45. Xia C, Braunstein Z, Toomey AC, Zhong J, Rao X. S100 Proteins As an Important Regulator of Macrophage Inflammation. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2018 [citován 10. květen 2022];8. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.01908>
46. PMEL premelanosome protein [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [citován 10. květen 2022]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6490>
47. SOX10 gene: MedlinePlus Genetics [Internet]. [citován 10. květen 2022]. Dostupné z: <https://medlineplus.gov/genetics/gene/sox10/>
48. Szumera-Ciećkiewicz A, Bosisio F, Teterycz P, Antoranz A, Delogu F, Koljenović S, et al. SOX10 is as specific as S100 protein in detecting metastases of melanoma in lymph nodes and is recommended for sentinel lymph node assessment. *European Journal of Cancer* [Internet]. 1. září 2020 [citován 10. květen 2022];137:175–82. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959804920303713>
49. Orosz Z. Melan-A/Mart-1 expression in various melanocytic lesions and in non-melanocytic soft tissue tumours. *Histopathology*. červen 1999;34(6):517–25.
50. Uguen A, Talagas M, Costa S, Duigou S, Bouvier S, De Braekeleer M, et al. A p16-Ki-67-HMB45 immunohistochemistry scoring system as an ancillary diagnostic tool in the diagnosis of melanoma. *Diagnostic Pathology* [Internet]. 26. říjen 2015 [citován 10. květen 2022];10(1):195. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s13000-015-0431-9>
51. P16 - an overview | ScienceDirect Topics [Internet]. [citován 10. květen 2022]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/p16>
52. Sun X, Kaufman PD. Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma*. červen 2018;127(2):175–86.
53. Ma X, Wu Y, Zhang T, Song H, Jv H, Guo W, et al. Ki67 Proliferation Index as a Histopathological Predictive and Prognostic Parameter of Oral Mucosal Melanoma in Patients without Distant Metastases. *J Cancer* [Internet]. 2017 [citován 10. květen 2022];8(18):3828–37. Dostupné z: <http://www.jcancer.org/v08p3828.htm>

54. Gimotty PA, Van Belle P, Elder DE, Murry T, Montone KT, Xu X, et al. Biologic and prognostic significance of dermal Ki67 expression, mitoses, and tumorigenicity in thin invasive cutaneous melanoma. *J Clin Oncol*. 1. listopad 2005;23(31):8048–56.
55. Lezcano C, Jungbluth AA, Busam KJ. Comparison of Immunohistochemistry for PRAME With Cytogenetic Test Results in the Evaluation of Challenging Melanocytic Tumors. *The American Journal of Surgical Pathology* [Internet]. červenec 2020 [citován 10. květen 2022];44(7):893–900. Dostupné z: https://journals.lww.com/ajsp/Abstract/2020/07000/Comparison_of_Immunohistochemistry_for_PRAME_With.10.aspx
56. Testori AAE, Blankenstein SA, van Akkooi ACJ. Primary Melanoma: from History to Actual Debates. *Curr Oncol Rep* [Internet]. 19. prosinec 2019 [citován 22. duben 2022];21(12):112. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11912-019-0843-x>
57. Heaton KM, Sussman JJ, Gershenwald JE, Lee JE, Reintgen DS, Mansfield PF, et al. Surgical margins and prognostic factors in patients with thick (>4mm) primary melanoma. *Ann Surg Oncol*. červen 1998;5(4):322–8.
58. Garbe C, Peris K, Hauschild A, Saiag P, Middleton M, Bastholt L, et al. Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline – Update 2016. *European Journal of Cancer* [Internet]. 1. srpen 2016 [citován 22. duben 2022];63:201–17. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959804916321360>
59. Grotz TE, Markovic SN, Erickson LA, Harmsen WS, Huebner M, Farley DR, et al. Mayo Clinic Consensus Recommendations for the Depth of Excision in Primary Cutaneous Melanoma. *Mayo Clin Proc* [Internet]. červen 2011 [citován 22. duben 2022];86(6):522–8. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3104911/>
60. Rawlani R, Rawlani V, Qureshi HA, Kim JY, Wayne JD. Reducing margins of wide local excision in head and neck melanoma for function and cosmesis: 5-year local recurrence-free survival. *J Surg Oncol*. červen 2015;111(7):795–9.
61. Möhrle M, Schippert W, Garbe C, Rassner G, Röcken M, Breuninger H. [Prognostic parameters and surgical strategies for facial melanomas]. *J Dtsch Dermatol Ges*. červen 2003;1(6):457–63.

62. Pockaj BA, Jaroszewski DE, DiCaudo DJ, Hentz JG, Buchel EW, Gray RJ, et al. Changing surgical therapy for melanoma of the external ear. *Ann Surg Oncol.* červenec 2003;10(6):689–96.
63. Jahn V, Breuninger H, Garbe C, Moehrle M. Melanoma of the ear: prognostic factors and surgical strategies. *Br J Dermatol.* únor 2006;154(2):310–8.
64. Kuchelmeister C, Schaumburg-Lever G, Garbe C. Acral cutaneous melanoma in caucasians: clinical features, histopathology and prognosis in 112 patients. *Br J Dermatol.* srpen 2000;143(2):275–80.
65. Bello DM, Chou JF, Panageas KS, Brady MS, Coit DG, Carvajal RD, et al. Prognosis of acral melanoma: a series of 281 patients. *Ann Surg Oncol.* říjen 2013;20(11):3618–25.
66. Bradford PT, Goldstein AM, McMaster ML, Tucker MA. Acral lentiginous melanoma: incidence and survival patterns in the United States, 1986-2005. *Arch Dermatol.* duben 2009;145(4):427–34.
67. Meier F, Will S, Ellwanger U, Schlagenhauff B, Schittek B, Rassner G, et al. Metastatic pathways and time courses in the orderly progression of cutaneous melanoma. *Br J Dermatol.* červenec 2002;147(1):62–70.
68. Thomas JM. Sentinel lymph node biopsy in malignant melanoma. *BMJ* [Internet]. 26. duben 2008 [citován 23. duben 2022];336(7650):902–3. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2335274/>
69. Leiter U, Stadler R, Mauch C, Hohenberger W, Brockmeyer NH, Berking C, et al. Final Analysis of DeCOG-SLT Trial: No Survival Benefit for Complete Lymph Node Dissection in Patients With Melanoma With Positive Sentinel Node. *J Clin Oncol.* 10. listopad 2019;37(32):3000–8.
70. Completion Dissection or Observation for Sentinel-Node Metastasis in Melanoma - PubMed [Internet]. [citován 23. duben 2022]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28591523/>
71. Zito PM, Scharf R. Melanoma Of The Head And Neck. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [citován 24. duben 2022]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513248/>
72. Shaw JH, Rumball EM. Complications and local recurrence following lymphadenectomy. *Br J Surg.* červenec 1990;77(7):760–4.

73. Modified Radical Neck Dissection: Overview, Morbidity Associated With Radical Neck Dissection, Events Leading to Modified Neck Dissection. 23. prosinec 2021 [citován 24. duben 2022]; Dostupné z: <https://emedicine.medscape.com/article/854296-overview?reg=1#a2>
74. Piagkou M, Demesticha T, Skandalakis P, Johnson EO. Functional anatomy of the mandibular nerve: consequences of nerve injury and entrapment. *Clin Anat.* březen 2011;24(2):143–50.
75. Accessory Nerve Injury: Practice Essentials, History of the Procedure, Problem. 24. leden 2022 [citován 24. duben 2022]; Dostupné z: <https://emedicine.medscape.com/article/1298684-overview#a1>
76. Dedivitis RA, Guimarães AV, Pfuetzenreiter EG, de Castro MAF. Neck dissection complications. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology* [Internet]. 1. leden 2011 [citován 24. duben 2022];77(1):65–9. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1808869415309435>
77. Masud MK, Ahmad SM, Karim MA, Ferdouse F, Fakir AY, Hanif MA, et al. Complications of neck dissection at a tertiary level hospital: study of 30 cases. *Mymensingh Med J.* říjen 2014;23(4):658–66.
78. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* [Internet]. 2017 [citován 11. květen 2022];67(2):93–9. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.3322/caac.21388>
79. Palmer SR, Erickson LA, Ichetovkin I, Knauer DJ, Markovic SN. Circulating Serologic and Molecular Biomarkers in Malignant Melanoma. *Mayo Clin Proc* [Internet]. říjen 2011 [citován 12. květen 2022];86(10):981–90. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3184027/>
80. Petrelli F, Ardito R, Merelli B, Lonati V, Cabiddu M, Seghezzi S, et al. Prognostic and predictive role of elevated lactate dehydrogenase in patients with melanoma treated with immunotherapy and BRAF inhibitors: a systematic review and meta-analysis. *Melanoma Res.* únor 2019;29(1):1–12.
81. Sánchez JL, Medina MS, Duque OG, Pérez MF, Hernández GC, Palácios JF. Sentinel lymph node biopsy for cutaneous melanoma: A 6 years study.

- Indian J Plast Surg [Internet]. 2013 [citován 14. květen 2022];46(1):92–7. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3745129/>
82. The prognostic significance of ulceration of cutaneous melanoma - Balch - 1980 - Cancer - Wiley Online Library [Internet]. [citován 14. květen 2022]. Dostupné z: [https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0142\(19800615\)45:12%3C3012::AID-CNCR2820451223%3E3.0.CO;2-O](https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0142(19800615)45:12%3C3012::AID-CNCR2820451223%3E3.0.CO;2-O)
83. Amelanotic Melanoma: Symptoms, Stages & Growth Rate [Internet]. Cancer Treatment Centers of America. 2021 [citován 15. květen 2022]. Dostupné z: <https://www.cancercenter.com/cancer-types/melanoma/types/amelanotic-melanoma>
84. Ribero S, Moscarella E, Ferrara G, Piana S, Argenziano G, Longo C. Regression in cutaneous melanoma: a comprehensive review from diagnosis to prognosis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* [Internet]. 2016 [citován 15. květen 2022];30(12):2030–7. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jdv.13815>
85. El Sharouni MA, Aivazian K, Witkamp AJ, Sigurdsson V, van Gils CH, Scolyer RA, et al. Association of Histologic Regression With a Favorable Outcome in Patients With Stage 1 and Stage 2 Cutaneous Melanoma. *JAMA Dermatology* [Internet]. 1. únor 2021 [citován 15. květen 2022];157(2):166–73. Dostupné z: <https://doi.org/10.1001/jamadermatol.2020.5032>
86. Ribero S, Osella-Abate S, Sanlorenzo M, Savoia P, Atrua C, Cavaliere G, et al. Favourable prognostic role of regression of primary melanoma in AJCC stage I-II patients. *Br J Dermatol*. prosinec 2013;169(6):1240–5.
87. Zugna D, Senetta R, Osella-Abate S, Fierro MT, Pisacane A, Zaccagna A, et al. Favourable prognostic role of histological regression in stage III positive sentinel lymph node melanoma patients. *Br J Cancer*. 6. únor 2018;118(3):398–404.
88. Ribero S, Galli F, Osella-Abate S, Bertero L, Cattaneo L, Merelli B, et al. Prognostic impact of regression in patients with primary cutaneous melanoma >1 mm in thickness. *Journal of the American Academy of Dermatology* [Internet]. 1. leden 2019 [citován 15. květen 2022];80(1):99–105.e5. Dostupné z: [https://www.jaad.org/article/S0190-9622\(18\)32212-6/fulltext#relatedArticles](https://www.jaad.org/article/S0190-9622(18)32212-6/fulltext#relatedArticles)

89. Testori A, De Salvo GL, Montesco MC, Trifirò G, Mocellin S, Landi G, et al. Clinical Considerations on Sentinel Node Biopsy in Melanoma from an Italian Multicentric Study on 1,313 Patients (SOLISM–IMI). *Ann Surg Oncol* [Internet]. 1. červenec 2009 [citován 15. květen 2022];16(7):2018–27. Dostupné z: <https://doi.org/10.1245/s10434-008-0273-8>
90. Howard MD, Wee E, Wolfe R, McLean CA, Kelly JW, Pan Y. Anatomic location of primary melanoma: Survival differences and sun exposure. *Journal of the American Academy of Dermatology* [Internet]. 1. srpen 2019 [citován 15. květen 2022];81(2):500–9. Dostupné z: [https://www.jaad.org/article/S0190-9622\(19\)30626-7/fulltext](https://www.jaad.org/article/S0190-9622(19)30626-7/fulltext)
91. Lideikaitė A, Mozūraitienė J, Letautienė S. Analysis of prognostic factors for melanoma patients. *Acta Med Litu* [Internet]. 2017 [citován 15. květen 2022];24(1):25–34. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5467960/>
92. Enninga EAL, Moser JC, Weaver AL, Markovic SN, Brewer JD, Leontovich AA, et al. Survival of cutaneous melanoma based on sex, age, and stage in the United States, 1992–2011. *Cancer Med* [Internet]. 6. září 2017 [citován 15. květen 2022];6(10):2203–12. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5633552/>
93. Bann DV, Chaikhoutdinov I, Zhu J, Andrews G. Satellite and In-Transit Metastatic Disease in Melanoma Skin Cancer: A Retrospective Review of Disease Presentation, Treatment, and Outcomes. *Dermatologic Surgery* [Internet]. březen 2019 [citován 15. květen 2022];45(3):371–80. Dostupné z: https://journals.lww.com/dermatologicsurgery/Abstract/2019/03000/Satellite_and_In_Transit_Metastatic_Disease_in.6.aspx
94. *cutaneous_melanoma.pdf* [Internet]. [citován 15. květen 2022]. Dostupné z: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/cutaneous_melanoma.pdf
95. Melanoma staging: Evidence-based changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual - Gershenwald - 2017 - CA: A Cancer Journal for Clinicians - Wiley Online Library [Internet]. [citován 15. květen 2022]. Dostupné z: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21409>
96. Song X, Zhao Z, Barber B, Farr AM, Ivanov B, Novich M. Overall survival in patients with metastatic melanoma. *Current Medical Research*

- and Opinion [Internet]. 4. květen 2015 [citován 16. květen 2022];31(5):987–91. Dostupné z: <https://doi.org/10.1185/03007995.2015.1021904>
97. Antohe M, Nedelcu RI, Nichita L, Popp CG, Cioplea M, Brinzea A, et al. Tumor infiltrating lymphocytes: The regulator of melanoma evolution. *Oncol Lett* [Internet]. květen 2019 [citován 17. květen 2022];17(5):4155–61. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6444298/>
98. Antohe M, Nedelcu RI, Nichita L, Popp CG, Cioplea M, Brinzea A, et al. Tumor infiltrating lymphocytes: The regulator of melanoma evolution. *Oncol Lett* [Internet]. květen 2019 [citován 18. květen 2022];17(5):4155–61. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6444298/>
99. Sun Q, Sun H, Wu N, Cong L, Cong X. Prognostic Significance of Tumor-Infiltrating Lymphocyte Grade in Melanoma: A Meta-Analysis. *DRM* [Internet]. 2020 [citován 17. květen 2022];236(6):481–92. Dostupné z: <https://www.karger.com/Article/FullText/505152>
100. Sullivan RJ, Atkins MB, Kirkwood JM, Agarwala SS, Clark JI, Ernstoff MS, et al. An update on the Society for Immunotherapy of Cancer consensus statement on tumor immunotherapy for the treatment of cutaneous melanoma: version 2.0. *J Immunother Cancer* [Internet]. 30. květen 2018 [citován 21. květen 2022];6:44. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5977556/>
101. Prognostic and Clinicopathologic Associations of Oncogenic BRAF in Metastatic Melanoma | *Journal of Clinical Oncology* [Internet]. [citován 21. květen 2022]. Dostupné z: <https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2010.32.4327>
102. Atkins MB, Lee SJ, Chmielowski B, Ribas A, Tarhini AA, Truong TG, et al. DREAMseq (Doublet, Randomized Evaluation in Advanced Melanoma Sequencing): A phase III trial—ECOG-ACRIN EA6134. *JCO* [Internet]. 20. prosinec 2021 [citován 21. květen 2022];39(36_suppl):356154–356154. Dostupné z: https://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JCO.2021.39.36_suppl.356154
103. Secondary Tumors Arising in Patients Undergoing BRAF Inhibitor Therapy Exhibit Increased BRAF–CRAF Heterodimerization | *Cancer Research* | American Association for Cancer Research [Internet]. [citován 21. květen 2022]. Dostupné z: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/76/6/1476/616243/Secondary-Tumors-Arising-in-Patients-Undergoing>

104. 5-Year Outcomes with Cobimetinib plus Vemurafenib in BRAFV600 Mutation–Positive Advanced Melanoma: Extended Follow-up of the coBRIM Study | Clinical Cancer Research | American Association for Cancer Research [Internet]. [citován 22. květen 2022]. Dostupné z: <https://aacrjournals.org/clincancerres/article/27/19/5225/671702/5-Year-Outcomes-with-Cobimetinib-plus-Vemurafenib>
105. Long GV, Stroyakovsky DL, Gogas H, Levchenko E, de Braud F, Larkin JMG, et al. COMBI-d: A randomized, double-blinded, Phase III study comparing the combination of dabrafenib and trametinib to dabrafenib and trametinib placebo as first-line therapy in patients (pts) with unresectable or metastatic BRAFV600E/K mutation-positive cutaneous melanoma. *JCO* [Internet]. 20. květen 2014 [citován 22. květen 2022];32(15_suppl):9011–9011. Dostupné z: https://ascopubs.org/doi/10.1200/jco.2014.32.15_suppl.9011
106. Davies MA, Saiag P, Robert C, Grob JJ, Flaherty KT, Arance A, et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with BRAFV600-mutant melanoma brain metastases (COMBI-MB): a multicentre, multicohort, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* červenec 2017;18(7):863–73.
107. Lacouture ME, Duvic M, Hauschild A, Prieto VG, Robert C, Schadendorf D, et al. Analysis of dermatologic events in vemurafenib-treated patients with melanoma. *Oncologist.* 2013;18(3):314–22.
108. Fife BT, Pauken KE. The role of the PD-1 pathway in autoimmunity and peripheral tolerance. *Annals of the New York Academy of Sciences* [Internet]. 2011 [citován 13. únor 2023];1217(1):45–59. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1749-6632.2010.05919.x>
109. doc. MUDr. Igor Kiss, Ph.D. Modrá kniha České onkologické společnosti. 2022. vyd. Brno: Masarykův onkologický ústav; 2022.
110. Immune Checkpoint Inhibitors - NCI [Internet]. 2019 [citován 24. únor 2023]. Dostupné z: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/immunotherapy/checkpoint-inhibitors>
111. Rowshanravan B, Halliday N, Sansom DM. CTLA-4: a moving target in immunotherapy. *Blood* [Internet]. 4. leden 2018 [citován 13. únor 2023];131(1):58–67. Dostupné z: <https://doi.org/10.1182/blood-2017-06-741033>

112. Immune Checkpoint Proteins - Creative BioMart [Internet]. [citován 24. únor 2023]. Dostupné z: <https://www.creativebiomart.net/Immune-Checkpoint-Proteins.htm>
113. Zhou X, Yao Z, Bai H, Duan J, Wang Z, Wang X, et al. Treatment-related adverse events of PD-1 and PD-L1 inhibitor-based combination therapies in clinical trials: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Oncology* [Internet]. 1. září 2021 [citován 13. únor 2023];22(9):1265–74. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1470204521003338>
114. Pneumonitis in Patients Treated With Anti-Programmed Death-1/Programmed Death Ligand 1 Therapy | *Journal of Clinical Oncology* [Internet]. [citován 13. únor 2023]. Dostupné z: <https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2016.68.2005>
115. Zhao L, Yang Y, Li W, Li T, Gao Q. Nivolumab-induced cytokine-release syndrome in relapsed/refractory Hodgkin's lymphoma: a case report and literature review. *Immunotherapy* [Internet]. srpen 2018 [citován 13. únor 2023];10(11):913–7. Dostupné z: <https://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/imt-2018-0025>
116. Dutcher JP, Schwartzentruber DJ, Kaufman HL, Agarwala SS, Tarhini AA, Lowder JN, et al. High dose interleukin-2 (Aldesleukin) - expert consensus on best management practices-2014. *J Immunother Cancer* [Internet]. 1. prosinec 2014 [citován 16. únor 2023];2(1):26. Dostupné z: <https://jitc.bmj.com/content/2/1/26>
117. Unger JM, Darke A, Othus M, Truong TG, Khushalani N, Kendra K, et al. Effectiveness of Adjuvant Pembrolizumab vs High-Dose Interferon or Ipilimumab for Quality-of-Life Outcomes in Patients With Resected Melanoma: A Secondary Analysis of the SWOG S1404 Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncology* [Internet]. 1. únor 2023 [citován 22. únor 2023];9(2):251–60. Dostupné z: <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2022.5486>
118. Grossmann KF, Othus M, Patel SP, Tarhini AA, Sondak VK, Knopp MV, et al. Adjuvant Pembrolizumab versus IFN α 2b or Ipilimumab in Resected High-Risk Melanoma. *Cancer Discov.* 1. březen 2022;12(3):644–53.
119. Kalal BS, Upadhy D, Pai VR. Chemotherapy Resistance Mechanisms in Advanced Skin Cancer. *Oncol Rev* [Internet]. 24. březen 2017 [citován

16. únor 2023];11(1):326. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5379221/>
120. Jiang G, Li RH, Sun C, Liu YQ, Zheng JN. Dacarbazine Combined Targeted Therapy versus Dacarbazine Alone in Patients with Malignant Melanoma: A Meta-Analysis. PLoS One [Internet]. 11. prosinec 2014 [citován 16. únor 2023];9(12):e111920. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4263472/>
121. Sause WT, Cooper JS, Rush S, Ago CT, Cosmatos D, Coughlin CT, et al. Fraction size in external beam radiation therapy in the treatment of melanoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* březn 1991;20(3):429–32.
122. Chang DT, Amdur RJ, Morris CG, Mendenhall WM. Adjuvant radiotherapy for cutaneous melanoma: comparing hypofractionation to conventional fractionation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 15. listopad 2006;66(4):1051–5.
123. Grenz ray treatment of lentigo maligna and early lentigo maligna melanoma - Journal of the American Academy of Dermatology [Internet]. [citován 21. únor 2023]. Dostupné z: [https://www.jaad.org/article/S0190-9622\(11\)00837-1/fulltext](https://www.jaad.org/article/S0190-9622(11)00837-1/fulltext)
124. Radiotherapy influences local control in patients with desmoplastic melanoma - Strom - 2014 - Cancer - Wiley Online Library [Internet]. [citován 22. únor 2023]. Dostupné z: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cncr.28412>
125. Radiotherapy for Cutaneous Malignant Melanoma: Rationale and Indications [Internet]. [citován 22. únor 2023]. Dostupné z: <https://www.cancernetwork.com/view/radiotherapy-cutaneous-malignant-melanoma-rationale-and-indications>
126. Eroglu Z, Zaretsky JM, Hu-Lieskovan S, Kim DW, Algazi A, Johnson DB, et al. High response rate to PD-1 blockade in desmoplastic melanomas. *Nature.* 18. leden 2018;553(7688):347–50.
127. Gaudy-Marqueste C, Dussouil AS, Carron R, Troin L, Malissen N, Loundou A, et al. Survival of melanoma patients treated with targeted therapy and immunotherapy after systematic upfront control of brain metastases by radiosurgery. *European Journal of Cancer* [Internet]. 1. říjen 2017 [citován 24. únor 2023];84:44–54. Dostupné z: [https://www.ejccancer.com/article/S0959-8049\(17\)31127-9/fulltext](https://www.ejccancer.com/article/S0959-8049(17)31127-9/fulltext)

128. Hamidi R, Peng D, Cockburn M. Efficacy of skin self-examination for the early detection of melanoma. *International Journal of Dermatology* [Internet]. 2010 [citován 25. únor 2023];49(2):126–34. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-4632.2009.04268.x>
129. Friedman RJ, Rigel DS, Silverman MK, Kopf AW, Vossaert KA. Malignant melanoma in the 1990s: The continued importance of early detection and the role of physician examination and self-examination of the skin. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* [Internet]. 1991 [citován 26. únor 2023];41(4):201–26. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.3322/canjclin.41.4.201>
130. Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, Arold ST, Imielinski M, Theurillat JP, et al. A Landscape of Driver Mutations in Melanoma. *Cell* [Internet]. 20. červenec 2012 [citován 3. březen 2023];150(2):251–63. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867412007787>
131. Gouda MA, Polivka J, Huang HJ, Treskova I, Pivovarcikova K, Fikrle T, et al. Ultrasensitive detection of BRAF mutations in circulating tumor DNA of non-metastatic melanoma. *ESMO Open* [Internet]. 1. únor 2022 [citován 7. březen 2023];7(1). Dostupné z: [https://www.esmoopen.com/article/S2059-7029\(21\)00319-7/fulltext](https://www.esmoopen.com/article/S2059-7029(21)00319-7/fulltext)
132. Kopreski MS, Benko FA, Kwee C, Leitzel KE, Eskander E, Lipton A, et al. Detection of mutant K-ras DNA in plasma or serum of patients with colorectal cancer. *Br J Cancer*. 1997;76(10):1293–9.
133. Noninvasive Identification and Monitoring of Cancer Mutations by Targeted Deep Sequencing of Plasma DNA | *Science Translational Medicine* [Internet]. [citován 10. červen 2023]. Dostupné z: <https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.3003726>
134. Newman AM, Bratman SV, To J, Wynne JF, Eclow NCW, Modlin LA, et al. An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med* [Internet]. květen 2014 [citován 10. červen 2023];20(5):548–54. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/nm.3519>
135. Dawson SJ, Tsui DWY, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin SF, et al. Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 28. březen 2013;368(13):1199–209.
136. Frequencies of BRAF and NRAS mutations are different in histological types and sites of origin of cutaneous melanoma: a meta-analysis | *British*

- Journal of Dermatology | Oxford Academic [Internet]. [citován 5. březem 2023]. Dostupné z: <https://academic.oup.com/bjd/article/164/4/776/6642825>
137. Tan L, Sandhu S, Lee RJ, Li J, Callahan J, Ftouni S, et al. Prediction and monitoring of relapse in stage III melanoma using circulating tumor DNA. *Annals of Oncology* [Internet]. 1. květen 2019 [citován 5. březem 2023];30(5):804–14. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092375341931155X>
138. Reinert T, Henriksen TV, Christensen E, Sharma S, Salari R, Sethi H, et al. Analysis of Plasma Cell-Free DNA by Ultradeep Sequencing in Patients With Stages I to III Colorectal Cancer. *JAMA Oncology* [Internet]. 1. srpen 2019 [citován 10. červen 2023];5(8):1124–31. Dostupné z: <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2019.0528>
139. Tie J, Wang Y, Tomasetti C, Li L, Springer S, Kinde I, et al. Circulating tumor DNA analysis detects minimal residual disease and predicts recurrence in patients with stage II colon cancer. *Science Translational Medicine* [Internet]. 6. červenec 2016 [citován 10. červen 2023];8(346):1–10. Dostupné z: <https://research.monash.edu/en/publications/circulating-tumor-dna-analysis-detects-minimal-residual-disease-a>
140. Chen K, Zhao H, Shi Y, Yang F, Wang LT, Kang G, et al. Perioperative Dynamic Changes in Circulating Tumor DNA in Patients with Lung Cancer (DYNAMIC). *Clinical Cancer Research* [Internet]. 2. prosinec 2019 [citován 5. březem 2023];25(23):7058–67. Dostupné z: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-19-1213>
141. Tie J, Kinde I, Wang Y, Wong HL, Roebert J, Christie M, et al. Circulating tumor DNA as an early marker of therapeutic response in patients with metastatic colorectal cancer. *Annals of Oncology* [Internet]. 1. srpen 2015 [citován 10. červen 2023];26(8):1715–22. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923753419318393>
142. Forthun RB, Hovland R, Schuster C, Puntervoll H, Brodal HP, Namløs HM, et al. ctDNA detected by ddPCR reveals changes in tumour load in metastatic malignant melanoma treated with bevacizumab. *Sci Rep* [Internet]. 25. listopad 2019 [citován 5. březem 2023];9(1):17471. Dostupné z: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-53917-5>
143. Kasi PM, Le AD, Barrett A. Comparative landscape of actionable somatic alterations in advanced cholangiocarcinoma from circulating

tumor and tissue-based DNA profiling. JCO [Internet]. 20. leden 2021 [citován 5. březem 2023];39(3_suppl):342–342. Dostupné z: https://ascopubs.org/doi/abs/10.1200/JCO.2021.39.3_suppl.342

144. Soda N, Clack K, Shiddiky MJA. Recent advances in liquid biopsy technologies for cancer biomarker detection. Sens Diagn [Internet]. 19. květen 2022 [citován 10. červen 2023];1(3):343–75. Dostupné z: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2022/sd/d2sd00010e>

13 Přílohy

Pacient 1 – T3a N0 M0 (IIA) Breslow = 2.8



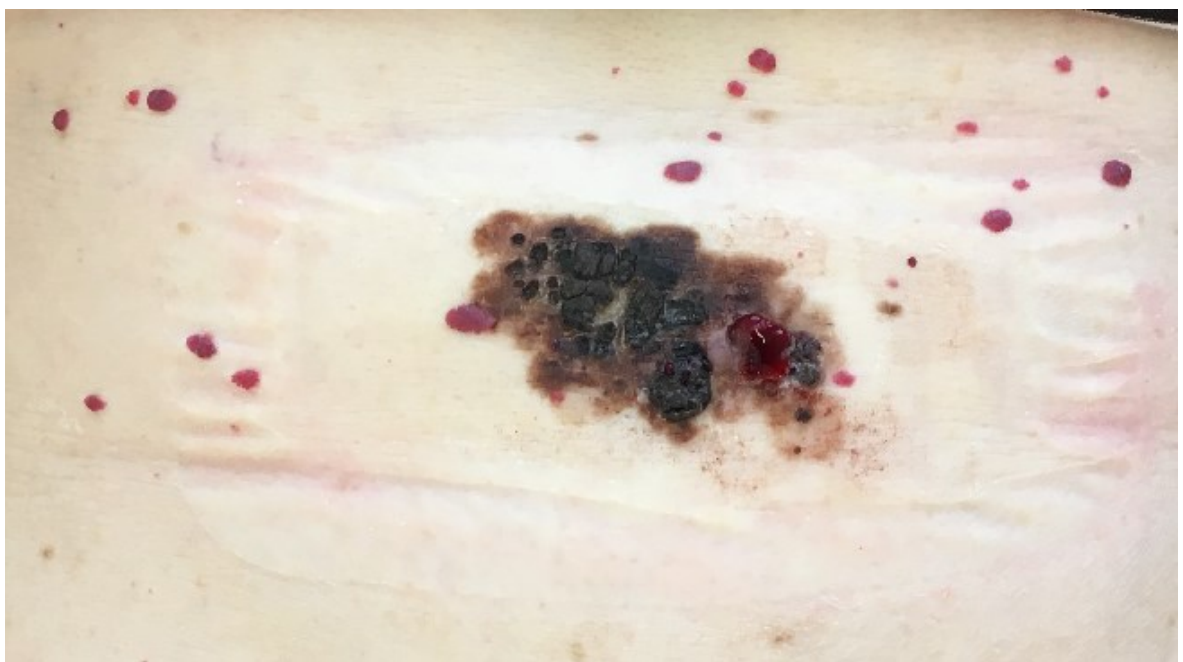
Pacient 2 – T3b N0 M0 (IIB) Breslow = 2.3



Patient 3 – T4b N0 M0 (IIC) Breslow = 5



Patient 4 – T4b N0 M0 (IIC) Breslow =>4



Patient 5 – T1a N0 M0 (IA) Breslow = 0.5



Patient 6 – T2a N0 M0 (IB) Breslow = 1.3



Patient 7 – T4b N0 M0 (IIC) Breslow = 15



Patient 8 – T4a N0 M0 (IIB) Breslow = 3.5



Patient 9 – T4b N0 M0 (IIC) Breslow = 4.1



Patient 10 – T3a N0 M0 (IIA) Breslow = 2.2



Patient 11 – T2b N0 M0 (IIA) Breslow = 1.7



Patient 12 – Tis N0 M0 (CIS) Breslow = 0



Patient 13 – Tis N0 M0 (CIS) Breslow = 0



Patient 14 – T2b N0 M0 (IIA) Breslow = 1.6



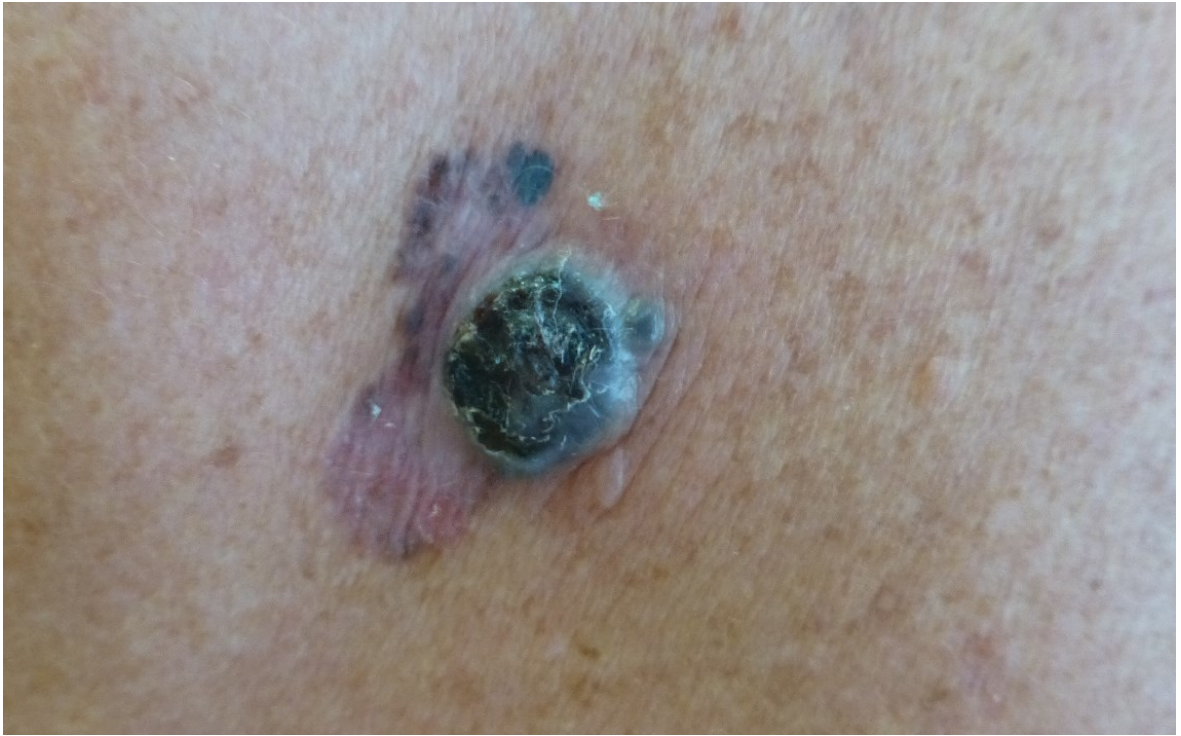
Pacient 15 – T4b N0 M0 (IIC) Breslow = 4.9 (Akrolentiginózní melanoma)



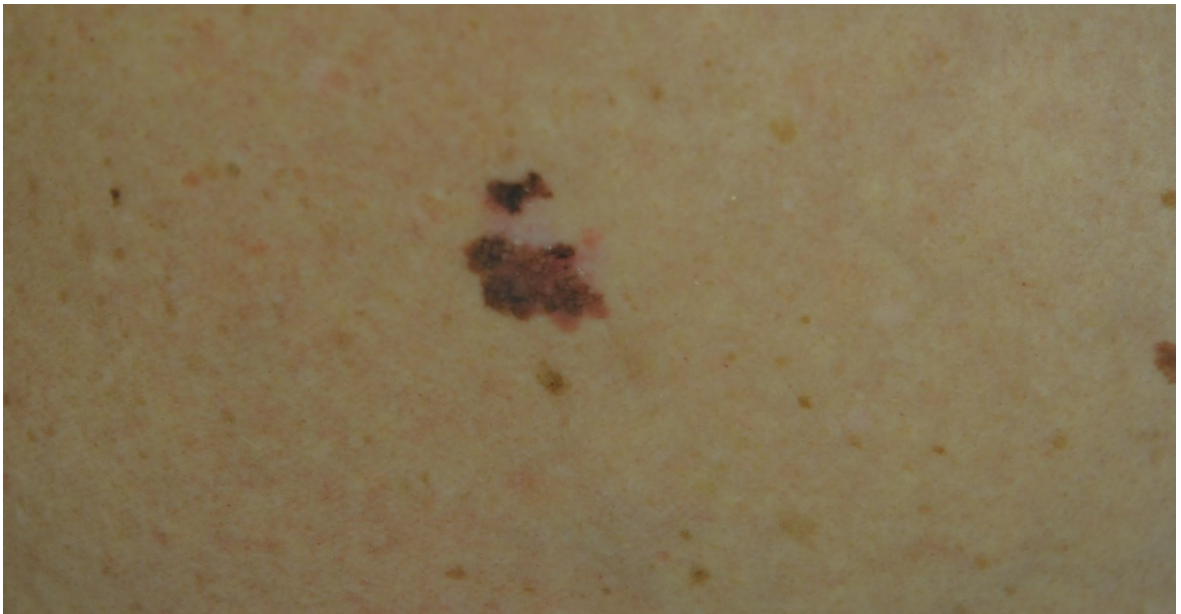
Pacient 16 T2b N1a M0 (IIIB) Breslow = 1.4 (Akrolentiginózní melanoma)



Pacient 17 – T4b N3b M0 (IIID) Breslow = 6.7



Pacient 18 – T1a N0 M0 (IA) Breslow = 0.4 (Lentigo maligna melanom)



Patient 19 – T4b Nx M0 (IIC) Breslow = 6.4



Patient 20 – T4b N1b M0 (IIIC) Breslow = 21



Patient 21 – T4b N1a M0 (IIIC) Breslow = 5.6



Patient 22 – T4b N1a M0 (IIIC) Breslow = 8.4



Patient 23 – T3a N0 M0 (IIA) Breslow = 3.4



Patient 24 – Tis N0 M0 (CIS) Breslow = 0



Pacient 25 – T2b N1a M0 (IIIB) Breslow = 1.8 (akrolentiginózní melanoma)



14 Poděkování

V první řadě bych rád poděkoval vedoucí mé disertační práce paní primárce doc. MUDr. Ince Třeškové, Ph.D. za podnětné rady a odbornou pomoc, kterou mi poskytovala při zpracovávání mé disertační práce, a za čas, který mi věnovala. Současně bych chtěl poděkovat všem kolegům, kteří mě podporovali a poskytli mi cenné rady. Rád bych poděkoval také své rodině a všem přátelům, kteří mi byli při zpracovávání této práce oporou a bez jejichž pomoci by nebylo možné práci dokončit.