

Univerzita Karlova v Praze 1. lékařská fakulta

Studijní program: Biomedicína

Studijní obor: Fyziologie a patofyziologie člověka



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

MUDr. Martin Kuchař

Patofyziologie nádorového mikroprostředí karcinomů slinných žláz

Pathophysiology of the tumor microenvironment of the salivary gland cancers

Disertační práce

Školitel: MUDr. Jiří Skřivan, CSc.

Praha 2023

OBSAH

1 ÚVOD	10
2 KARCINOMY SLINNÝCH ŽLÁZ	12
2A EPIDEMIOLOGIE KARCINOMŮ SLINNÝCH ŽLÁZ	12
2B HISTOLOGIE KARCINOMŮ SLINNÝCH ŽLÁZ	14
3 DIAGNOSTIKA A LÉČBA KARCINOMŮ SLINNÝCH ŽLÁZ	16
3A MOLEKULÁRNÍ MARKERY	16
3B CHIRURGICKÁ LÉČBA	16
3C RADIOTERAPIE	17
3D CHEMOTERAPIE	19
3E BIOLOGICKÁ LÉČBA	20
3F IMUNOTERAPIE NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ	22
4 NÁDOROVÉ MIKROPROSTŘEDÍ	24
4A TUMOR INFILTRUJÍCÍ IMUNITNÍ BUŇKY	24
4B VÝZNAM TIICS PRO PROGNÓZU A TERAPII	25
4C IMUNOSUPRESIVNÍ NÁDOROVÉ MIKROPROSTŘEDÍ A MECHANISMY ÚNIKU NÁDOROVÉ BUŇKY	29
4D DETAILNÍ MAPOVÁNÍ BUNĚK NÁDOROVÉHO MIKROPROSTŘEDÍ	30
4E ZÁVĚRY LITERÁRNÍCH ÚDAJŮ	33
5 HYPOTÉZA	35
6 CÍLE PRÁCE	35
7 MATERIÁL A METODY	36
8 VÝSLEDKY	40
9 DISKUZE	60
10 ZÁVĚR	64
11 POUŽITÁ LITERATURA	66

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

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

V Praze, 23. 9. 2023

MARTIN KUCHARŮ

Identifikační záznam:

Kuchař, Martin. *Patofyziologie nádorového mikroprostředí karcinomů slinných žláz. [Pathophysiology of the tumor microenvironment of the salivary gland cancers]*. Praha, 2023. 73 stran, 6 příloh. Dizertační práce. Univerzita Karlova, 1. lékařská fakulta, Fyziologický ústav. Školitel MUDr. Jiří Skřivan, CSc.

Klíčová slova:

karcinomy slinných žláz, nádorové mikroprostředí, tumor infiltrující imunitní buňky, imunoterapie, inhibitory kontrolních bodů imunitní reakce, PD-1, PD-L1, Fas receptor, Fas ligand, apoptóza, peritumorální tkáň, nádorové centrum

Key words:

salivary gland carcinomas, tumor microenvironment, tumor infiltrating immune cells, immunotherapy, check-point inhibitors, PD-1, PD-L1, Fas receptor, Fas ligand, apoptosis, peritumoral tissue, tumor center

SEZNAM ZKRATEK

5-FU	5-fluorouracil
ACT	adaptive cell therapy / adaptivní buněčná terapie
AdCC	Adenoid Cystic Carcinoma / adenoidně cystický karcinom
B-ALL	akutní lymfatická leukémie z B buněk
CAP	režim chemoterapie cyklofosfamid, doxorubicin, cisplatina
CAR T	T cell chimeric antigen receptors therapy / terapie pomocí chimérických antigenních receptorů T buněk
Cdk	cyclin dependentní kináza
CRC	colorectal cancer / kolorektální karcinom
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 / cytotoxický antigen T-lymfocytů 4
DED	death-effector domain / doména efektoru smrti
DFS	disease free survival / přežití bez nemoci
DISC	death-inducing signaling complex / smrt indukující signální komplex
EGFR	epidermal growth factor receptor / receptor epidermálního růstového faktoru
FADD	Fas-associated death domain / doména smrti asociovaná s Fas
FFPE	formalin-fixed paraffin embedded / fixované formalinem zalité v parafinu
FLICE	FADD-like interleukin-1 beta-converting enzyme
FoxO1	forkhead box protein O1 / transkripční faktor
FoxP3+	forkhead box P3+ / transkripční faktor
HCC	hepatocellular carcinoma / hepatocelulární karcinom
HER2	humánní epidermální receptor 2
HPF	high power field / vysoce výkonné pole (obrazu)
ICI	immune check-point inhibitor / inhibitory imunitních kontrolních bodů
IFN	interferon
IHC	immunohistochemistry / imunohistochemie
IL-2	interleukin 2

Ki-67	jaderný protein asociovaný s buněčnou proliferací a rRNA transkripcí (protilátka Kiel klon 67)
LN	lymph node / mízní uzlina
MAP	mitogen-activated protein kinase / mitogenem aktivovaná proteinkináza
MASC	mammary analogue secretory carcinoma / mamárnímu analogický sekreční karcinom
MDSC	myeloid-derived suppressor cells / myeloidní supresorové buňky
MEC	mucoepidermoid carcinoma / mukoepidermoidní karcinom
MFS	metastasis-free survival / přežití bez metastáz
MHC	major histocompatibility complex / hlavní histokompatibilní komplex
N/A	not applicable / nepoužitelný
NK	natural killer / přirozený zabíječ
NOS	not otherwise specified / blíže nespecifikovaný
NPC	nasopharyngeal carcinoma / karcinom nosohltanu
NSCLC	non-small-cell lung cancer / nemalobuněčný karcinom plic
OS	overall survival / celkové přežití
PCNA	proliferating cell nuclear antigen / jaderný antigen proliferujících buněk
PD-1	programmed cell death protein 1 / protein programované buněčné smrti
PD-L1	programmed cell death protein ligand 1 / ligand proteinu PD-1
PD-L2	programmed cell death protein ligand 2 / ligand proteinu PD-2
PI3K	phosphatidylinositol-4,5-bisfosfát 3-kináza
RFS	relapse-free survival / přežití bez relapsu
RT	radioterapie
SCC	squamous cell carcinoma / dlaždicobuněčný karcinom
SEM	standard error of the mean / standardní odchylka průměru
SGC	salivary gland carcinoma / karcinom slinné žlázy
SPSS	statistical package for the social sciences / statistický software firmy IBM
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3 / transkripční faktor
TCR	T-cell receptor / T buněčný receptor (T lymfocytů)

TGF β	transforming growth factor β / transformující růstový faktor beta
TIIC	tumor infiltrating immune cells / imunitní buňky infiltrující tumor
TIL	tumor infiltrating lymphocytes / tumor infiltrující lymfocyty
TME	tumor microenvironment / nádorové mikroprostředí
TNFR	tumor necrosis factor receptor / receptor tumor nekrotizujícího faktoru
TNM	tumor Node Metastasis classification / klasifikace maligních tumorů
TP53	tumor protein 53 / tumor supresorový gen
TPS	tumor proportion score / nádorové proporční skóre
UICC / AJCC	Union for International Cancer Control / American Joint Committee on Cancer
WHO	World Health Organization / Mezinárodní zdravotnická organizace

Abstrakt

Možnosti léčby karcinomů slinných žláz (SGC), obzvláště pokročilých, jsou omezené. Velký pokrok a změnu v léčbě zhoubných nádorů přinesla imunoterapie, zejména terapie inhibitory imunitních kontrolních bodů – immune check-point inhibitors (ICI). Efekt a reakce na imunoterapii pomocí ICI je z velké části řízena charakteristikami imunitních buněk v nádorové tkáni a jak se ukazuje také v peritumorální tkáni. Provedli jsme imunohistochemickou analýzu exprese imunitních kontrolních bodů proteinu PD-1 a ligandu PD-L1 na povrchu nádorových buněk i nádor infiltrujících imunitních buněk (tumor infiltrating immune cells TIIC) ve vzorcích salivárních karcinomů odděleně v jejich středu a na jejich periférii. Kromě výše uvedeného stále větší množství důkazů naznačuje, že odolnost vůči ICI terapii je modulována interakcí Fas receptoru (CD95) a Fas ligandu (FasL, CD178) mezi nádorovými buňkami a imunitními buňkami. Rozhodli jsme se proto prozkoumat expresi a interakci Fas-FasL mezi nádorovými buňkami a imunitními buňkami infiltrujícími nádor v jeho středu a v peritumorální oblasti vzorků salivárních karcinomů. Diferenciální hodnocení centra nádoru a periferie nádoru napříč různými histologickými podtypy SGC odhalily roli periferních TIIC a nádorových buněk v pochopení faktorů, které určují závažnost onemocnění. Exprese PD-1 v periferních TIIC SGC potvrdila potenciál imunoterapie pomocí inhibitorů imunitních kontrolních bodů u pacientů s karcinomy slinných žláz. Exprese PD-L1 v periferních nádorových buňkách SGC vykazovaly významnou souvislost se závažností onemocnění. Naše zjištění ukazují, že periferie nádorů SGC by mohla představovat vhodnou biomarkerovou oblast pro hodnocení závažnosti SGC a vhodnou oblast pro studium vzájemných interakcí mezi nádorem a imunitním systémem. Dále analýza exprese Fas receptoru a Fas ligandu ukazují, že se interakce Fas-FasL na periférii karcinomů slinných žláz nabízí jako užitečný nový prediktor závažnosti onemocnění a odpovědi na imunoterapii. Získaná data dále naznačují, že buňky karcinomů slinných žláz jsou odolné vůči apoptóze spouštěné Fas ligandem imunitních buněk, a navíc mohou v nádorech vyšších stádií naopak využívat Fas ligand k eliminaci imunitních buněk, podílet se tím na úniku nádoru imunitní odpovědi a zprostředkovat dále odolnost vůči imunoterapii.

Abstract

Treatment options for salivary gland carcinomas (SGC), especially advanced ones, are limited. Immunotherapy, particularly therapy with immune checkpoint inhibitors (ICI), has brought significant progress and change in the treatment of malignant tumors. The effect and response to immunotherapy using ICI are largely driven by the characteristics of immune cells in the tumor tissue and, as it turns out, also in the peritumoral tissue. We conducted an immunohistochemical analysis of the expression of the immune checkpoint protein PD-1 and its ligand PD-L1 on the surface of tumor cells as well as tumor-infiltrating immune cells (TIIC) in samples of salivary carcinomas, separately in their centre and at their periphery. In addition to the above, an increasing amount of evidence suggests that resistance to ICI therapy is modulated by the interaction of the Fas receptor (CD95) and Fas ligand (FasL, CD178) between tumor cells and immune cells. We therefore decided to explore the expression and interaction of Fas-FasL between tumor cells and tumor-infiltrating immune cells in the centre of the tumor and in the peritumoral area of salivary carcinoma samples. Differential evaluation of the tumor centre and tumor periphery across various histological subtypes of SGC revealed the role of peripheral TIICs and tumor cells in understanding the factors that determine the severity of the disease. Expression of PD-1 in peripheral TIICs of SGC confirmed the potential of immunotherapy using checkpoint inhibitors in patients with salivary gland carcinomas. Expression of PD-L1 in peripheral tumor cells of SGC showed a significant correlation with disease severity. Our findings suggest that the periphery of SGC tumors might represent a suitable biomarker area for assessing the severity of SGC and a suitable area for studying the mutual interactions between the tumor and the immune system. Furthermore, the analysis of the expression of the Fas receptor and Fas ligand shows that the Fas-FasL interaction on the periphery of salivary gland carcinomas presents as a useful new predictor of disease severity and response to immunotherapy. The acquired data further suggests that salivary gland carcinoma cells are resistant to apoptosis triggered by the immune cell's Fas ligand and, in higher stage tumors, may instead utilize the Fas ligand to eliminate immune cells, contributing to tumor evasion of immune response and further mediating resistance to immunotherapy.

1 ÚVOD

Primární nádory slinných žláz (salivary gland cancer SGC) jsou vzácné a velmi heterogenní malignity lokalizované v oblasti hlavy a krku [1]. SGCs jsou jedním s nejrozmanitějším druhů humánních maligních nádorů, s více než 20 histologickými podtypy [1, 2]. Metodou volby v léčbě resekovatelných SGCs je chirurgický výkon [2], přičemž právě extrémní heterogenita si žádá osobitý přístup k jednotlivým subtypům [3]. Přes veškerou snahu dospěje velké množství pacientů s SGCs k lokoregionální recidivě [4]. Četnost recidiv závisí na histologickém podtypu, stupni diferenciacie nádoru a stadiu nádoru a je hlášena u 15-80% pacientů během 5 let po operaci [4]. U neresekovatelných SGCs jsou možnostmi léčby chemoradioterapie nebo cílená terapie. Jako jediné možnosti jsou tyto dvě alternativy často používány, ale jsou jen omezeně účinné [2, 4, 5]. Pětileté přežití u jedinců s recidivujícími high grade SGC je méně než 35% [4].

V poslední době byla vyvinuta řada nových imunoterapeutických a cílených terapeutických strategií, které se zavádějí do klinické praxe pro léčbu pokročilých a metastatických nádorů [6, 7].

Aktuálně se rozšiřuje možnost imunoterapie, která se u mnoha typů nádorů již stala první volbou léčby [8-10][6-8]. Účinnost imunoterapie se liší mezi různými typy nádorů a dokonce v rámci skupiny nádorů stejného typu [11]. Proto hlavní výzvou výzkumu v oblasti imunoterapie není pouze správně identifikovat pacienty, kteří na ni budou reagovat [11], ale také identifikovat molekulární mechanismy, které by mohly být použity k překonání odolnosti vůči imunoterapii [12-14]. K tomu je důležité pochopit molekulární interakce mezi nádorovými a imunitními buňkami v konkrétních stadiích onemocnění v jednotlivých nádorech.

U SGC předchozí studie odhalily nové cesty k cílené terapii identifikací nejběžnějších a klinicky relevantních genetických aberací, jako je gen TP53, cyklinová dráha, nebo změny dráhy PI3K [15, 16]. Mezi imunoterapeutickými strategiemi představují inhibitory kontrolních bodů hlavní průlom v léčbě těchto nádorů [7][9]. Neslibnějších výsledků bylo dosaženo s inhibitory imunitního kontrolního bodu (ICI) zacílených na cytotoxický protein 4 spojený s T-lymfocyty (CTLA-4) (ipilimumab,

tremelimumab), programovanou buněčnou smrt (PD)-1 (nivolumab, pembrolizumab a cemiplimab) a PD-ligand 1 (PD-L1) (atezolizumab, avelumab a durvalumab) [17]. Současné studie se většinou zaměřují na CTLA-4 inhibitory kontrolních bodů, výjimečně na PD-1/PD-L1 inhibitory [18, 19]. Nicméně tato terapie u SGCs neukázala lepší výsledky než chemoterapie [5]. Přestože ICI způsobily revoluci v léčbě zhoubných nádorů, významné procento onemocnění zůstává rezistentních vůči imunoterapii. Tato rezistence je způsobena mnoha mechanismy, včetně nízké infiltrace imunitními buňkami infiltrujícími nádor (tumor infiltrating immune cell TIIC) nebo omezené exprese kontrolních molekul a jejich ligandů v nádorových buňkách a/nebo TIIC [14, 20].

Stále větší množství důkazů naznačuje, že odolnost vůči checkpoint inhibitor terapii je modulována interakcí Fas receptor (Fas, CD95) - Fas ligand (FasL, CD178) mezi nádorovými buňkami a imunitními buňkami [21, 22]. Spojení FasL s receptorem Fas slouží jako mechanismus indukující apoptózu, který používají jak CD8+ T buňky, tak buňky NK k eliminaci transformovaných neoplastických buněk [23]. Tento mechanismus však byl také úspěšně využit nádorovými buňkami a tumor infiltrujícími myeloidními supresorovými buňkami (MDSCs) k protiútoky na imunitní buňky infiltrující nádor (TIICs) [21]. Není známo, zda interakce Fas-FasL může být využita SGCs jako mechanismus odolnosti vůči imunitnímu systému nebo zda hraje roli v odolnosti vůči checkpoint inhibitor terapii.

2 KARCINOMY SLINNÝCH ŽLÁZ

2A EPIDEMIOLOGIE KARCINOMŮ SLINNÝCH ŽLÁZ

Maligní novotvary slinných žláz jsou relativně vzácné onemocnění. Představují přibližně 3 % všech malignit hlavy a krku. Vznikají ve velkých slinných žlázách, tedy příušní, podčelistní a podjazykové žláze a v malých slinných žlázách horní části dýchacího a zažívacího traktu. [24] [25] Mezi všemi maligními nádory tvoří asi 0,5% onemocnění. Incidence všech nádorů slinných žláz se pohybuje kolem 5 případů na 100 000 obyvatel, incidence maligních nádorů slinných žláz je přibližně 1,3 případů na 100 000 obyvatel ročně. [26] Poměr mezi diagnostikovanými muži a ženami je asi 1,6:1. Výskyt malignit slinných žláz stoupá ve vyšších deceniích s maximem mezi 60-70 rokem věku, kdy je incidence přes 7 případů na 100 000 obyvatel. [2] V dětském věku se projeví méně než 5 % všech nádorů slinných žláz, pokud jsou však diagnostikovány, je pravděpodobnost, že jde o maligní nádor, mnohem vyšší, než u dospělých. (2) Celkové desetileté přežití u pacientů s malignitami slinných žláz se pohybuje mezi 47-74 %. Celkové pětileté přežití pacientů s rekurentním onemocněním nepřesahuje 20 %. [2, 27].

Maligní nádory slinných žláz jsou navíc velmi pestrou paletou histologických typů s různorodým biologickým chováním. Klasifikace Světové zdravotnické organizace (WHO) udává více než 30 histologických podtypů nádorů slinných žláz, dvacet čtyři z nich je hodnoceno jako maligní. [28] Ze všech slinných novotvarů, jak benigních, tak maligních, se většina vyskytuje v příušní žláze a nejméně nádorů postihuje sublinguální žlázu. Zajímavá nepřímá úměrnost existuje mezi celkovým výskytem novotvarů v jednotlivých lokalizacích a procentem zastoupení malignit v těchto lokalizacích. V přehledu 2410 případů nádorů slinných žláz bylo 73 % diagnostikováno v příušní žláze a pouze 15 % z nich bylo maligních. Na druhé straně nádory malých slinných žláz představovaly pouze 14 % z celkového počtu případů, ale 46 % bylo maligních. Podobně nádory submandibulární žlázy představovaly 11 % případů a 37 % bylo maligních, nádory podjazykové žlázy představovaly pouze 0,3 % a 86 % z nich bylo maligních. [29] Frekvence různých histologických typů karcinomů slinných žláz (salivary gland

carcinoma SGC) se také liší v závislosti na místě výskytu. Řada studií ukázala, že nejčastější primární malignitou ve slinných žlázách je mukoepidermoidní karcinom (mucoepidermoid carcinoma MEC). [2, 24, 27] V jednom z největších přehledů novotvarů slinných žláz, celkem 2807 pacientů, zkoumal Spiro 278 případů maligních nádorů slinných žláz a uvádí, že 34 % tvořil mukoepidermoidní karcinom. Dalším nejčastějším typem byl adenoidně cystický karcinom (22 %), následovaný adenokarcinomem blíže nespecifikovaným (18 %), dále maligní smíšený nádor (13%), acinocelulární karcinom (7 %) a dlaždicový karcinom (4%). Pokud zohledníme lokalizaci, mukoepidermoidní karcinom byl nejčastější malignitou příušní žlázy, adenoidně cystický karcinom byl nejčastější u submandibulárních žláz a malých slinných žláz. [24] Relativní vzácnost těchto malignit a pestrá škála histologických typů komplikuje jejich výzkum a standardizaci terapeutických postupů. Absolutní většina poznatků o jejich klinickém chování a výsledcích léčby je založena na retrospektivních studiích.

Ke zhodnocení závažnosti onemocnění a dalšího osudu pacientů s karcinomy slinných žláz bylo navrženo několik klinických charakteristik primárního nádoru. Jako základní parametr hodnotíme stádium tumoru (T), které bere v úvahu jak velikost tumoru, tak přítomnost extraglandulárního postižení, infiltraci okolních struktur a postižení lícního nervu. [30] Byla prokázána souvislost stadia tumoru s výskytem metastáz a špatnou prognózou pacientů. [31] Současně i lokalizace primárního nádoru souvisí s přežitím. U pacientů s maligními tumory submandibulárních a sublinguálních žláz pozorujeme častěji metastázování a horší přežití než u pacientů s maligními tumory příušní žlázy. [32] V multivariační analýze provedené Terhaardem byl pokročilý věk nezávislým prediktorem nízkého celkového přežití a mužské pohlaví bylo spojeno s o 17 % vyšším rizikem vzdálených metastáz. [31] O'Brien a kolegové uvádějí, že pacienti ve věku 60 let a více měli významně kratší přežití oproti nižším věkovým kategoriím, pohlaví ovšem nepředstavuje významný faktor pro prognózu. [33] Jako další prognostické faktory byly ve studiích navrženy dysfunkce lícního nervu a bolestivost nádoru v době diagnózy. V Terhaardově studii byla paréza lícního nervu nezávislým prediktorem neúspěšné regionální kontroly s relativním rizikem 6,1. [31] Podobně v multivariační analýze provedené Northem paréza lícního nervu predikovala špatný výsledek s 3letým přežitím bez relapsu pouze 13 %. [34] Kromě souvislosti s nízkým přežitím se ukázalo, že

postižení lícního nervu je vysoce prediktivní pro metastázy v lymfatických uzlinách. [32]

Stav krčních lymfatických uzlin je důležitým prognostickým faktorem karcinomů slinných žláz. Dlouhodobě studie potvrzují snížené přežití u pacientů s regionální krční lymfatickou metastázou v době diagnózy a pětiletá míra přežití byla signifikantně odlišná s metastázami do cervikálních lymfatických uzlin a bez nich - 44-48 % vs. 73-77 %. [35, 36]

2B HISTOLOGIE KARCINOMŮ SLINNÝCH ŽLÁZ

Karcinomů slinných žláz je popisováno 24 druhů. Jednotlivé typy malignit slinných žláz lze rozdělit do skupin s relativně příznivou prognózou, nebo s nepříznivým biologickým chováním a nepříznivou prognózou. Parametr, který tento fakt nejlépe popisuje je histopatologický stupeň diferenciacie, resp. dediferenciacie, tedy grading nádoru. Grading (stupňování) zhoubných nádorů odkazuje na hodnocení abnormality nádorových buněk ve vztahu k normálním buňkám. Pomáhá predikovat agresivitu nádoru, rychlost růstu a šíření a také navrhnout vhodné léčebné metody. Nádory méně dediferencované, dobře diferencované, označujeme jako low grade nádory, nádory s vysokým stupněm dediferenciacie, špatně diferencované, označujeme jako high grade nádory.

Některé histologické typy patří ze své podstaty mezi high grade nebo low grade nádory; například salivární duktální karcinom je malignitou vysokého stupně, zatímco low grade polymorfni adenokarcinom je nádorem nízkého stupně. Je důležité zmínit, že termín high grade nádor se v literatuře používá k označení jak high grade histologických typů, obecně považovaných za high grade nádory, tak je používán pro high grade subtypy určitých druhů malignit, nejčastěji mukoepidermoidního karcinomu MEC a adenokarcinomu blíže nespecifikovaného (not otherwise specified NOS). Z hlediska histopatologického stupně, za maligní nádory high grade se považuje SCC, nediferencovaný karcinom, MEC vysokého stupně, karcinom z pleomorfni adenomu a salivární duktální karcinom. [37, 38] Nádory nízkého stupně malignity zahrnují mukoepidermoidní karcinom nízkého stupně, adenokarcinom z bazálních buněk, mucinózní adenokarcinom a papilární cystadenokarcinom. V multivariační analýze 470

maligních nádorů velkých slinných žláz bylo prokázáno, že histologický stupeň je nezávislým prognostickým faktorem přežití. [37] Toto bylo potvrzeno v dalším retrospektivním přehledu Chena a kolegů u 207 pacientů s karcinomy velkých slinných žláz, kteří byli léčeni pouze chirurgickým výkonem. V této studii bylo také zjištěno, že vysoký grade je nezávislým prediktorem lokoregionální recidivy. [27] Pokud zvažujeme jednotlivé histologické typy karcinomů slinných žláz samostatně, grading subtypu také vysoce koreluje s léčebným výsledkem. V přehledu 108 pacientů s MEC velkých a malých slinných žláz byla diagnóza high grade subtypů nádorů spojena s významně sníženou pětiletou mírou přežití specifického pro onemocnění (22,5 %) ve srovnání s nádory nízkého stupně (97 %, $P < 0,0001$). [39] Podobně analýza 60 pacientů s MEC ukázala, že pacienti s nádory nízkého stupně mají významně lepší přežití, než pacienti s nádory středního nebo vysokého stupně. [40]

Specifický je případ adenoidně cystických karcinomů slinných žláz AdCC. Ačkoli AdCC mají jeden z nejrůznorodějších histologických fenotypů (tubulární vs. kribriformní vs. solidní), který umožňuje snadnější vnitrodruhovou klasifikaci, existují velké pochybnosti ohledně užitečnosti stanovení histopatologického stupně nádoru při predikci prognózy pacientů s touto malignitou. [2] Ukazuje se, že je to lokální tkáňová invaze, bez ohledu na histologický subtyp, která předznamenává horší klinický výsledek léčby. Bylo zjištěno, že perineurální invaze a perineurální šíření je prediktorem agresivnějšího chování nádorů. V multivariační analýze Terhaarda a kolegů byla perineurální invaze nezávislým prognostickým faktorem spojeným s rizikem vzdálených metastáz (relativní riziko 2,2). [31] Bylo také prokázáno, že místní infiltrace kostěných struktur je nezávislým faktorem spojeným se zvýšeným rizikem lokální recidivy a kratším celkovým přežitím. [31, 41] Pochopitelně i přítomnost pozitivních chirurgických okrajů byla spojena s horším klinickým výsledkem. Therkildsen a kolegové zjistili, že tato proměnná nezávisle koreluje s horší lokoregionální kontrolou a nižší mírou přežití pacientů. [42]

3 DIAGNOSTIKA A LÉČBA KARCINOMŮ SLINNÝCH ŽLÁZ

3A MOLEKULÁRNÍ MARKERY

Tak jako u jiných nádorů, jeden z trendů v diagnostice a léčbě nádorů slinných žláz směřuje k identifikaci molekulárních markerů specifických pro jednotlivé typy nádorů. Bylo popsáno několik translokací a chromozomových zlomů, které jsou specifické pro jednotlivé nádory, zejména pro mukoepidermoidní karcinom, adenoidně cystický karcinom a salivární analog mamárního sekreční karcinomu. Širší využití pro diagnostiku či léčbu zatím nemají. Užitečnými prognostickými markery pro pacienty se zhoubnými nádory slinných žláz jsou markery buněčné proliferace. Studie, které se zabývaly proliferační frakcí v nádorech slinných žláz prokázaly souvislost mezi proliferační aktivitou a přežitím. [43] Dva z nejčastěji studovaných markerů proliferace jsou jaderný antigen proliferačních buněk a Ki-67. Ukázalo se, že exprese jaderného antigenu proliferačních buněk (proliferating cell nuclear antigen) PCNA a Ki-67 v nádorových buňkách koreluje s vyšším histopatologickým stupněm a kratším přežitím u pacientů s AdCC a MEC. [44, 45] Obecně je Ki-67 považován za přesnější ukazatel proliferační aktivity buněk, protože má kratší poločas a vykazuje specifitější barvení. U mukoepidermoidního karcinomu bylo prokázáno, že nádory s vysokou expresí Ki-67 a nízkou expresí p27 – inhibitor cyklin-dependentní kinázy buněčného cyklu, jehož působení zpomaluje buněčný cyklus ve fázi G1, mají horší prognózu. [46]

3B CHIRURGICKÁ LÉČBA

Jednoznačnou první volbou v terapii karcinomů slinných žláz je chirurgická léčba. Tyto nádory jsou považovány za chemo- i radiorezistentní, tedy konvenční onkologické režimy, radioterapie a chemoterapie, mají nízkou účinnost a jsou spojeny se závažnými nežádoucími účinky. [47, 48] Zatímco časná stadia SGC mohou být účinně léčena chirurgickým zákrokem samostatně, ve vyšších stádiích chirurgickou léčbou v kombinaci s adjuvantní radioterapií, pacienti s inoperabilními, recidivujícími, nebo generalizovanými onemocněními mají omezené možnosti léčby a tudíž nepříznivou prognózu. [47, 48]

Pro rozsah chirurgického výkonu platí: kompletní odstranění postižené žlázy, v případě extraglandulárního šíření nádoru radikální zákrok s lemem okolní zdravé tkáně zhruba 1 cm. V případě postižení regionálních krčních lymfatických uzlin je indikována kompletní stejnostranná lymfadenektomie. U operací příušní žlázy je u maligních nádorů vždy otázkou možnost uchování lícního nervu a vychází z perioperačního nálezu. [25]

Studie srovnávající pětileté celkové přežití a pětileté přežití bez recidivy onemocnění u pacientů léčených chirurgicky, nebo jinými modalitami bez chirurgického výkonu, uvádí u chirurgické skupiny celkové přežití 87,5 % a přežití bez recidivy onemocnění 68,6 %, zatímco v nechirurgické skupině je to 47,9 % a 0 %. Multivariační analýza potvrdila, že chirurgická léčba je jediný nezávislý faktor ovlivňující přežívání bez recidivy nemoci ($P=0,015$) a jeden z faktorů, ovlivňujících celkové pětileté přežití ($P=0,024$). [49] Stejně tak je zásadní význam chirurgie i jako záchranné léčby při recidivě onemocnění. U pacientů s recidivou karcinomu slinných žláz je v případě provedení chirurgického výkonu udáván medián přežití 90 měsíců, ve skupině, u které nebyl proveden chirurgický výkon, pouze 14,7 měsíců. [50]

3C RADIOTERAPIE

Primární nádor

Obecně se dá říci, že použití pooperační radioterapie (RT) zlepšuje míru lokoregionální kontroly po resekci malignit slinných žláz. Multivariační analýzou 140 pacientů s adenoidně cystickým karcinomem Chen a kolegové zjistili, že vynechání pooperační RT bylo nezávislým prediktorem lokální recidivy s poměrem rizika 5,82 proti kontrolní skupině ($P=0,002$). [51] Pomocí retrospektivních studií byly vylíčeny parametry pro indikaci adjuvantní radioterapie snižující výskyt lokoregionální recidiv. Mezi tyto parametry patří nádory v pokročilém stádiu, přítomnost pozitivních okrajů po resekci, nádory vysokého stupně malignity, rizikové histologické perineurální šíření nádoru, infiltrace kostěných struktur v okolí. [47, 48, 51]

V největší retrospektivní analýze pacientů podstupujících adjuvantní RT pro high grade nebo lokálně pokročilé maligní nádory velkých slinných žláz Mahmood a kolegové zkoumali pacienty starší 20 let, kteří podstoupili operaci v letech 1988 až 2005. V

multifaktoriální analýze těchto 2170 pacientů zjistili významně zlepšené přežití spojené s adjuvantní RT (poměr rizika úmrtnosti 0,76; 95 % CI 0,65 až 0,89; $P < 0,001$). [52](32) V další velké retrospektivní multivariační analýze Terhaard a kolegové zkoumali výsledky a prognostické proměnné u 565 pacientů léčených pro heterogenní směs malignit slinných žláz. Zjistili, že pacienti, kteří byli léčeni chirurgicky, měli relativní riziko lokální recidivy 9,7 a relativní riziko regionální recidivy 2,3 ve srovnání s pacienty léčenými chirurgickým zákrokem následovaným RT. Místní kontrola nádorů T3 a T4 léčených chirurgickým zákrokem s následným ozařováním byla 84% po 10 letech, což představuje výrazně lepší výsledky ve srovnání s případy léčenými samotným chirurgickým zákrokem (18% po 10 letech, $P < 0,001$). [53]. Tato zlepšení v lokální kontrole nebyla pozorována u T1 nádorů (95% pro chirurgický zákrok plus záření vs. 83% pro samotný chirurgický zákrok) nebo T2 nádorů (91% pro chirurgický zákrok plus záření vs. 88% pro samotný chirurgický zákrok). Neprokázalo se také, že by RT ovlivňovala vznik vzdálených metastáz. Platí, že u tumorů ve stadiu I a II nepředstavuje adjuvantní radioterapie pro pacienty přínos.

Pooperační záření se také doporučuje v případech, kdy nádor infiltroval místní tkáň. Perineurální i kostní invaze jsou nepříznivé histologické rysy a jsou spojeny se špatným léčebným výsledkem. Ve studii 565 pacientů s karcinomem slinné žlázy pooperační ozáření významně zlepšilo 10letou lokální míru kontroly v případech perineurální nebo kostní invaze ve srovnání s výsledky samotné operace. [53]

Krční lymfatické uzliny

Bylo prokázáno, že pooperační radioterapie krčních uzlin v případech, kdy jsou lymfatické uzliny postiženy metastázami, zlepšuje lokoregionální kontrolu a přežití. Ve studii Armstronga a kolegů, která porovnávala 16 pacientů s metastázami v krčních lymfatických uzlinách léčených pouze chirurgicky, s 23 pacienty léčenými chirurgicky a radiačně, bylo pozorováno zlepšení v 5leté lokoregionální kontrole ze 40% na 69% ($P = 0,05$). Odpovídající 5leté přežití se zlepšilo z 19% na 49% ($P = 0,015$). [54] Užitečnost pooperačního záření krku potvrdila studie Terhaarda a kolektivu, kteří pozorovali 83% regionální míru kontroly krční uzliny po 10 letech u pacientů s krčními metastázami léčených pooperačním lokoregionálním zářením. Naproti tomu 10letá regionální míra

kontroly krční uzliny byla 57% u pacientů (n = 10) léčených bez ozařování nebo pouze s lokálním pooperačním ozařováním místa primárního tumoru (P = 0,04). Ukazuje se tedy, že RT po chirurgické ablaci uzlinově pozitivního onemocnění zlepšuje výsledek. [53]

Použití záření při léčbě nemocných s negativním uzlinovým nálezem zatím zůstává nerozhodnuto. Studie zkoumala 251 pacientů s karcinomy slinných žláz bez uzlinových metastáz, kteří byli léčeni chirurgickým zákrokem a pooperační RT. Elektivní ozáření krku bylo použito u 131 pacientů (90 ipsilaterálních a 41 bilaterálních). Významné snížení bylo zaznamenáno v 10leté míře selhání regionální kontroly, která poklesla z 26% na 0% (P = 0,0001). Za zmínku stojí, že u pacientů, kteří nebyli léčeni ozařováním krku, došlo k regionální uzlinové recidivě v případech high grade typů: SCC, nediferencovaný karcinom, adenokarcinom NOS a MEC. [55]

Otázka, zda u pacientů bez klinicky zjevných regionálních metastáz provádět elektivní exenteraci uzlin, či zda provádět elektivní iradiaci krku, zatím nebyla jednoznačně zodpovězena. [56]

3D CHEMOTERAPIE

Použití systémové chemoterapie při léčbě malignit slinných žláz je v současné době omezeno na paliativní léčbu lokálně pokročilého, neresekovatelného, rekurentního a metastatického onemocnění. Byla prozkoumána řada terapeutik, publikované studie jsou však převážně nerandomizované a hodnotí malý počet pacientů, což ztěžuje hodnocení účinnosti těchto léků. Metaanalýza dat 205 pacientů získaných ze 17 studií léčby fáze II nebo III hodnotila použití chemoterapeutik cisplatiny, karboplatiny, epirubicinu, cyklofosfamidu, doxorubicinu, mitoxantronu, paclitaxelu, 5-fluorouracilu, vinorelbinu, methotrexátu a bleomycinu. Všichni pacienti byli léčeni pro karcinom velkých a malých slinných žláz buď jedním typem paliativní chemoterapie, nebo kombinací chemoterapeutik. Regresivní analýzou bylo zjištěno, že u pacientů léčených chemoterapií na bázi platiny nebo antracyklinů (např. Mitoxantron) došlo ke zvýšení jejich mediánu přežití. Při zhodnocení dat pomocí vícerozměrné analýzy bylo zjištěno, že pouze chemoterapie na bázi platiny je významně spojena se zvýšeným přežitím, ale byla zřejmá pozitivní interakce mezi deriváty platiny a antracyklinem. [57]

Neexistují žádná široce uznávaná doporučení týkající se komplexních režimů chemoterapie. Proto léčba pacientů s inoperabilními nádory, s recidivami a se vzdálenými metastázami zůstává výzvou. Konvenční režimy chemoterapie, např. cisplatina a 5-FU, nebo CAP (cisplatina, doxorubicin a cyklofosfamid) se stále používají jako léčba první linie pro pacienty s pokročilými onemocněními. [49]

Randomizovaná studie hodnotila užitečnost adjuvantní chemoradioterapie na bázi platiny u pacientů s vysoce rizikovými karcinomy slinných žláz. Analýza ukázala, že skupina s chemoradioterapií měla horší 3leté celkové přežití (52,2% vs. 78,1%; $p = 0,004$), lokoregionální kontrolu (79,3% proti 91,2%; $p = 0,031$), a přežití bez vzdálených metastáz (52,7% vs. 83,3%; $p < 0,001$). Studie uzavírá, že standardní použití chemoradioterapie pro vysoce rizikové slinné malignity nelze doporučit. Chemoterapie tak zůstává jako paliativní léčba u pacientů s neléčitelnými nebo rychle progredujícími nádory. [58]

3E BIOLOGICKÁ LÉČBA

Vzhledem k nízké účinnosti onkologické léčby byla pozornost zaměřena na možnosti cílené biologické terapie proti strukturám exprimovaným buňkami karcinomů slinných žláz. Jako potenciální cíle léčby byly zjištěny receptory s tyrosinkinázovou aktivitou, jako je proto-onkogen c-KIT, receptor pro epidermální růstový faktor 1 a 2. V léčbě karcinomů slinných žláz pak byly zkoušeny různé preparáty, jako imatinib, cetuximab, gefitinib, trastuzumab.

Bylo prokázáno, že adenoidně cystický karcinom nadměrně exprimuje c-KIT ve více než 90 % případů a exprese c-KIT byla korelována s histopatologickým stupněm nádoru. [59] Léčba zaměřená na c-KIT, jako je imatinib, však pro tento účel nebyla úspěšná. Celkem osm studií hodnotilo efekt imatinibu u dohromady 80 pacientů s pokročilým AdCC. Sedm studií hodnotilo léčbu imatinibem v monoterapii, jedna studie v kombinaci imatinibu s cisplatinou. Zjištěna byla pouze dílčí odpověď ve čtyřech případech, s mírou objektivní odpovědi pouze 5 % a krátkou dobou odpovědi v rozmezí 9–15 měsíců. [60, 61]

Receptor epidermálního růstového faktoru je exprimován u 79% všech malignit průdušných žláz [62](43), zdá se tedy, že terapie monoklonální protilátkou proti EGFR, jako je cetuximab, by mohla přinést dobrý terapeutický efekt. Studie léčby pokročilého metastatického adenoidně cystického karcinomu cetuximabem v kombinaci s cisplatinou prokázala míru objektivní odpovědi více než 40% a medián celkového přežití byl 24 měsíců. [63] Jiné protilátky proti EGFR, jako je gefitinib nebo lapatinib byly také testovány při léčbě metastazujícího karcinomu slinných žláz. Terapeutické výsledky však byly zklamáním a nedosáhly žádných objektivních odpovědí. [64]

Další molekulou, u které byl zkoumán potenciální prognostický a terapeutický význam u karcinomů slinných žláz, je receptor s tyrosinkinázovou aktivitou z rodiny ErbB. HER-2/neu, nyní označovaný jako ERBB2, je receptor lidského epidermálního růstového faktoru. Monoklonální protilátka proti ERBB2/HER2 je součástí standardních léčebných protokolů léčby karcinomu prsu. [65] Metaanalýza 39 prací hodnotících expresi ERBB2 v karcinomech slinných žláz u 11 z nich zjistila, že zvýšená exprese HER2 byla spojena se špatnou prognózou a agresivním chováním nádorů. [66] Haddád et al. a Perissinotti et al. [67, 68] hodnotili účinnost léčby monoklonální protilátkou proti anti-HER2 Trastuzumab u pacientů s karcinomem slinné žlázy se závěrem, že léčba neměla vliv na přežití pacientů s HER2 pozitivním nádorem. Naproti tomu některé další studie zahrnuté v metaanalýze uvádí pozitivní účinek léčby anti-HER2 v případě, že byla kombinována s jinými chemoterapeutiky. [66]

Souhrnně lze říci, že chemoterapie jako paliativní léčba byla aplikována u pacientů s lokálně recidivujícím a / nebo generalizovaným onemocněním, které nebylo možné podrobit další operaci nebo ozařování. Režim chemoterapie na bázi platiny by mohl být přínosem pro pacienty s nevléčitelnými SGC, zejména pro symptomatické nebo rychle progresivní pacienty. Budoucí studie jsou nutné k identifikaci nových chemoterapeutických látek se snahou o zlepšení prognózy pacientů s SGC.

Současně je pro zlepšení léčby a její optimalizaci nezbytné detailně porozumět mikroprostředí těchto nádorů.

3F IMUNOTERAPIE NÁDOROVÝCH ONEMOCNĚNÍ

Imunoterapeutické přístupy lze rozdělit na terapii monoklonálními protilátkami, blokádu kontrolních bodů – checkpoint inhibitory, terapii buněčnými preparáty a terapii geneticky modifikovanými vakcínami, ať již CAR T buňkami (chirmění antigenní receptory T buněk), nebo onkolytickými viry.

Terapie monoklonálními protilátkami spočívá v podávání protilátky proti konkrétnímu tumor asociovanému antigenu, která se na něj naváže a způsobí protilátkami zprostředkovanou smrt nádorové buňky. Aplikace cílených monoklonálních protilátek je možná pouze tam, kde známe konkrétní tumor asociovaný antigen, který je ve vysoké míře exprimován v tkáni nádorové a minimálně v tkáni zdravé.

Monoklonální protilátky jsou využívány i v léčbě pomocí blokády kontrolních bodů - checkpoint blokáde. Tento přístup však necílí na nádorové buňky jako konvenční onkologická terapie různými chemoterapeutiky, ale na buňky imunitní. Blokáda checkpoint receptorů, které slouží jako inhibiční receptory T buněk, brání vazbě inhibičních molekul na jejich povrch a znemožní nádorovým buňkám způsobit útlum buněk imunitních. Tyto T buňky, se zablokovanými inhibičními receptory, jsou nadměrně a opakovaně aktivované a mohou velmi efektivně zabíjet buňky nádorové. V klinické praxi nejčastěji užívané preparáty jsou protilátky proti receptoru programmed cell death 1 - anti PD-1 protilátky (nivolumab, pembrolizumab) a anti-CTLA4 protilátky (ipilimumab). [6, 17]

Další metodou imunoterapeutické léčby jsou buněčné vakcíny. Buněčné vakcíny jsou připraveny z periferní krve pacienta a obecně postup spočívá v extrakci konkrétní buněčné populace, množení žadoucích buněk in vitro a následné navrácení velkého množství buněk zpět do těla pacientovi. V klinické praxi se používají především T buněčné vakcíny a dendritické vakcíny.

Mezi geneticky modifikované vakcíny řadíme terapii pomocí arteficiálních buněčných receptorů - buněčnou terapii T lymfocyty s chimérickými antigenními receptory – CAR T. Ta představuje variantu adoptivního buněčného transferu, ve kterém jsou využívány T buňky s geneticky modifikovaným T-buněčným receptorem (TCR), který je

vzniklý fúzí klasického TCR a monoklonální protilátky. Nepotřebuje tedy ke své aktivaci komplex antigenu a MHC molekuly, nýbrž rozeznává nádorový antigen pomocí protilátky. CAR T buněčná terapie zaznamenala převratný úspěch především v léčbě hematologických malignit. U dětí s B-ALL vedla ke dlouhodobé kompletní remisi u 36 z 39 dětí. Omezením plošného užívání této terapie je především její cena. [69]

Poslední imunoterapeutický přístup, který je zatím předmětem klinických studií, spočívá v aplikaci geneticky modifikovaného onkolytického viru. Takový virus v sobě nese gen pro selektivní replikaci pouze v nádorových buňkách a pomnoží-li se v nádorové buňce, způsobí její lýzu. Takto lyzovaná nádorová buňka uvolní velké množství nádorových antigenů a zároveň cytokiny atrahující do místa nádoru dendritické buňky. Ty následně fagocytují uvolněné nádorové antigeny a účinně je prezentují efektorovým T buňkám. [6]

4 NÁDOROVÉ MIKROPROSTŘEDÍ

Již desítky let je známo, že nádorová masa není tvořena pouze nádorovými buňkami, ale též četnými imunitními buňkami, buňkami pojivové tkáně, cévami a nádorovou matrix. Jednotným termínem pro celé toto uskupení je nádorové mikroprostředí (tumor microenvironment TME).

Nádorové mikroprostředí je živým systémem, ve kterém spolu některé buňky vzájemně kooperují a jiné naopak vykonávají antagonistické funkce. Jestliže nádorové onemocnění progreduje, směřují zpravidla molekulární pochody ve prospěch nádorového růstu a funkce imunitního systému jsou potlačovány. Taková situace pak vede, u nehematologických malignit, ke zvětšení nádorové masy, útlaku infiltraci a destrukci okolních tkání a v pozdních stádiích také k diseminaci do vzdálených orgánů. [70]

Procesy vzájemného působení imunitního systému a nádoru se tradičně rozdělují do 3 fází, které nazýváme též teorií 3E (z anglického elimination, equilibrium, escape). Ve fázi eliminace jsou nádorové buňky aktivně likvidovány buňkami imunitního systému. Následně dochází k fázi rovnováhy, která může trvat řadu měsíců až let. V této fázi na sebe působí vzájemně buňky imunitního systému a buňky nádorové, není však již dosahováno efektivního odstraňování maligních buněk a nádor zůstává v čase a prostoru nezměněn. V poslední fázi dochází k úniku nádorových buněk imunitnímu dohledu, onemocnění progreduje a je umožněno i metastazování. [6]

4A TUMOR INFILTRUJÍCÍ IMUNITNÍ BUŇKY

V protinádorové imunitní odpovědi se uplatňují především makrofágy a NK buňky z buněk přirozené imunity. T buňky (T lymfocyty), a zejména jejich cytotoxická subpopulace CD8+, pak reprezentuje hlavní populaci efektorových protinádorových buněk ze skupiny adaptivní imunity. Je však popsáno i protinádorové působení žírných buněk, B buněk a jiných buněčných populací v nádorovém mikroprostředí. [71]

Pro imunitní buňky, které opustily periferní krevní řečiště a infiltrovaly do nádorového mikroprostředí se užívá termín tumor infiltrující imunitní buňky (tumor

infiltrating immune cells TIICs). Tato různorodá skupina buněk je reprezentována zejména T lymfocyty a NK buňkami. Samotná přítomnost větší či menší lymfocytární infiltrace v nádoru se zdá být významným prognostickým faktorem. U karcinomu prsu, plic či jícnu je vysoká infiltrace CD8+ T lymfocytů faktorem zlepšujícím celkové přežití a prodlužujícím období bez progresu onemocnění. Tato skutečnost vede mnohé výzkumné skupiny ke snaze podpořit infiltraci nádoru těmito buňkami či alespoň ke snaze objasnit mechanismy, které negativním způsobem ovlivňují počet a chování imunitních buněk v nádoru. [72]

4B VÝZNAM TIICS PRO PROGNÓZU A TERAPII

Imunitní buňky pronikající do nádorového mikroprostředí (tumor microenvironment TME) byly nalezeny v různých poměrech téměř u každého lidského zhoubného onemocnění. Spektrum infiltrujících imunitních buněk spolu s fenotypem těchto buněk definuje vzájemné působení nádorového a imunitního systému. Předchozí výsledky identifikovaly mnoho populací imunitních buněk infiltrujících nádor, zapojených do interakce nádorového a imunitního systému, jako jsou leukocyty, makrofágy, dendritické buňky, žírné buňky, NK buňky a další. [73] Tyto buňky buď potlačují nebo usnadňují růst nádoru. Mezi těmito populacemi jsou TILs (nádor infiltrující lymfocyty) považovány za podskupinu nádor infiltrujících imunitních buněk TIICs obsahující populaci pro nádor specifických T-buněk. [73] TILs se tak staly tradičním zdrojem pro adaptivní buněčnou terapii (adaptive cell therapy ACT) a při klinických pokusech s pacienty s metastazujícími nádory vykázaly výborné výsledky. TILs obsahují různé frakce CD4+ T buněk a CD8+ T buněk. Přítomnost TILs a jejich dopad na prognózu onemocnění byly analyzovány u mnoha malignit. Mnoho studií se pokusilo popsat interakci nádorových buněk s imunitním systémem hodnocením CD8+ TILs a korelací zjištění s histopatologickými charakteristikami nádoru. [74, 75] Pro tento přístup je nejběžnější detekční metodou imunohistochemická analýza buněčných subpopulací ve vzorku reprezentativní tkáně. [74] Příznivá prognostická role TILs byla již popsána u melanomu, karcinomu plic, karcinomu prsu, karcinomu vaječníků a mnoha dalších solidních nádorů; avšak prognostický význam TIICs obecně byl široce zkoumán také u rakoviny žaludku, nebo kolorektálního karcinomu. [73]

Hustota imunitních infiltrátů v nádorové tkáni byla mnohokrát analyzována. Ovšem jen nemnoho studií zohlednilo význam kompartmentu tkáně okolo nádoru – význam peritumorální tkáně. Galon et al. poskytli podrobnou analýzu imunitních buněk infiltrujících nádor ve velkých kohortách lidských kolorektálních karcinomů (CRC). Přítomnost TIICs v nádoru významně korelovala s příznivou prognózou. Vysoká hustota intratumorálních T-buněk byla dále spojena s nižším rizikem diseminace do lymfatických uzlin u studovaných pacientů. Tyto nálezy následně vedly k vytvoření jednotné metodiky pro stanovení hustoty lymfocytárního infiltrátu, tzv. immunoscore. [76] U CRC se immunoscore stal relevantnějším prognostickým faktorem než TNM klasifikace a v současnosti představuje nezávislý prognostický marker pro dobu přežití bez nemoci (DFS) a celkové přežití (OS). [77] V současné době probíhají mezinárodní validační studie immunoscore.

Metaanalýzy ukázaly, že vysoký výskyt CD8+ lymfocytů má příznivou prognostickou hodnotu pro většinu malignit, podíl CD4+ buněk má částečně příznivou prognostickou hodnotu a regulační subpopulace FoxP3+ má ve většině případů nepříznivý prognostický význam. [75] TIICs však nejsou pouze prognostickým biomarkerem, ale mohou také naznačit, zda pacient zareaguje na imunoterapii kontrolních bodů. [73] Maligní melanom se stal modelem malignity pro imunoterapeutické přístupy a několik studií prokázalo pozitivní prognostický význam TIICs u tohoto onemocnění. [78]

Infiltrace TIICs nejen naznačuje, zda je nádor vhodný k imunoterapii, ale také může naznačovat citlivost k jiným léčebným modalitám. U Her2+ karcinomu prsu různá zastoupení TIICs ukazovala pacienty, u kterých bylo možné očekávat dobrý efekt imunoterapie. [79] U NSCLC (non-small-cell lung cancer, nemalobuněčného karcinomu plic) byla u 129 pacientů po radikálním chirurgickém odstranění nádorové tkáně pozorována pozitivní korelace mezi vysokou intratumorální infiltrací CD8+ buněk, vysokou expresí IL-2 (interleukin-2) a celkovým přežitím OS. [80] Do metaanalýzy Yao et al. bylo celkem zařazeno 23 studií s 3173 pacienty s HCC (hepatocelulárním karcinomem). U HCC bylo prokázáno, že TIICs představují cenný prognostický marker, kde FoxP3+ TIICs byly spojeny s horším celkovým přežitím (OS) a přežitím bez

nemoci/přežitím bez recidivy (DFS/RFS). Navíc poměry FoxP3+/CD4+ a FoxP3+/CD8+ byly negativně korelovány s OS a DFS/RFS. [81] Více studií prokázalo prognostický efekt intratumorální infiltrace CD3+, CD8+ a CD4+ buněk u NSCLC. Zeng et al. navrhli, že TIICs by měly sloužit jako prognostický biomarker u NSCLC. [82] Tuto hypotézu dále podporuje Remark et al., který ukazuje, že imunitní charakteristiky NSCLC jsou hlavním aspektem ve vývoji a progresi maligního onemocnění. [83]

Pozitivní prognostický význam CD3+ TIICs byl prokázán u 115 pacientů s karcinomem nosohltanu (NPC nasopharyngeal cancer). U pacientů s nízkou intratumorální hustotou TIICs bylo zjištěno nízké přežití specifické pro onemocnění. Tato studie ukázala jednoduchost hodnocení TIICs a naznačila, že TIICs by mohly být pravidelně hodnoceny u NPC. [84] Podobně retrospektivní data 55 pacientů s angiosarkomem ukázala, že vysoká zátěž CD3+, CD8+ a CD4+ TIICs byla spojena s delším přežitím bez metastáz (MFS) a celkovým přežitím (OS). [85] U análního planocelulárního karcinomu byla zaznamenána lepší prognóza u pacientů s vysokou intratumorální hustotou CD8+ T-buněk. Navíc vysoká zátěž peritumorálních CD8+ T-buněk byla spojena se zlepšeným OS. [86] Vysoká infiltrace intratumorálních CD8+ T-buněk, vysoká exprese PD 1 a vysoká mutační zátěž souvisí s mírou odpovědi na imunoterapii. [87]

Stejně tak u NK buněk infiltrujících zhoubné nádory různých typů byla potvrzena prediktivní role pro terapii. [88] Navíc byla s vysokým podílem NK buněk v nádoru významně spojena odpověď na imunoterapii inhibitory kontrolních bodů. Dále v myších modelech vedly cytokinem řízené indukce intratumorálních NK buněk k citlivosti TME (nádorového mikroprostředí) na imunoterapii [89, 90]

Prognóza pacientů a jejich reakce na chemoterapii a imunoterapii je ovlivněna mnoha faktory, ovšem prediktivní význam TIICs u mnoha typů zhoubných nádorů je evidentní.

Stále více důkazů potvrzuje, že TME je utvářeno během dlouhodobého procesu vývoje nádoru. [21] Tento závěr je obzvláště relevantní vzhledem k tomu, že přítomnost TIICs v TME byla spojena s lepší prognózou u většiny zhoubných nádorů, naopak nízká infiltrace TIICs se stala prediktorem selhání imunoterapie.

Nedávné zjištění, že nádorově produkovaný Fas ligand z myeloidních supresorových buněk (MDSC myeloid-derived supressor cells) indukuje apoptózu nádorově specifických CD8+ T lymfocytů a vede k jejich postupnému vymizení z nádoru a nádorové periferie zdůraznilo význam výskytu receptorů smrti u tumor infiltrujících imunokompetentních buněk. Apoptóza TIICs prostřednictvím těchto receptorů byla dále popsána jako hlavní faktor přispívající k selhání imunoterapie. [21]

Rozsáhlé profilování TIICs se stalo výkonným nástrojem při předpovídání prognózy pacienta a reakce na různé terapeutické modality. Nicméně informace o prognostické hodnotě TIICs mají svá omezení a u několika malignit se zdá, že údaje, které lze získat ze zastoupení jednotlivých buněk a z fenotypických vzorců nádor infiltrujících imunitních buněk, dosáhly maxima svého využití. [91] Několik nedávných studií prokázalo, že vzájemné působení nádorového imunitního systému sahá za hranice nádoru a že paratumorální tkáňové kompartmenty, jako jsou peritumorální tkáň a přilehlá zdravá tkáň, mohou poskytnout další podstatné informace. [92-94] Park et al. ukázali, že přítomnost lymfocytů v peritumorální tkáni může sloužit jako platný prognostický faktor u kožního melanomu. Navíc bylo ukázáno, že vysoká koncentrace peritumorálních lymfocytů ovlivňuje Breslowovu klasifikaci a DFS u pacientů s kožním melanomem. [95]

Giraldo et al. dále odhalili, že pacienti s nízkou expresí imunitních checkpointů, ale s dendritickými buňkami lokalizovanými v peritumorálních imunitních agregátech, měli dobré prognózy. Navíc Miksch et al. zaznamenali přítomnost leukocytů především v peritumorální oblasti, což naznačuje, že efektorové buňky nemusí dosáhnout samotného nádoru. Umístění a imunitní profily buněk mohou významně ovlivnit prognózu pacientů a pomoci definovat pacienty, kteří pravděpodobně zareagují na terapii blokující imunitní checkpointy. Tedy hodnocení peritumorální distribuce imunitních buněk infiltrujících nádor a jejich fenotypické vzorce je důležité a podstatné pro pochopení mechanismů, které ovlivňují růst nádoru a řídí rezistenci vůči imunoterapii. [92, 93, 95-98]

4C IMUNOSUPRESIVNÍ NÁDOROVÉ MIKROPROSTŘEDÍ A MECHANISMY ÚNIKU NÁDOROVÉ BUŇKY

Tradičně je peritumorální tkáň chápána jako tkáň obklopující nádorovou hmotu, která představuje hranici mezi nádorem a zdravou tkání. Peritumorální tkáň lze považovat za interaktivní a dynamické rozhraní, které ovlivňuje a je ovlivňováno biologii nádoru a hostitelskou imunitní reakcí. Dochází zde k dalšímu šíření nádoru, toto je místo, kde dediferencované buňky nádoru pronikají do organizované diferencované tkáně, kde selhává očekávaná imunitní bariera organismu. Lze předpokládat, že srovnání mezi fenotypem nádorových a imunitních buněk ve vlastní nádorové tkáni a peritumorální tkáni umožní zachytit dynamiku změn probíhajících při růstu a infiltrativním šíření nádoru. Lze předpokládat, že pochopení těchto procesů posune diagnostiku a léčbu nádorových onemocnění.

Z poznatků vyplývá, že je nezbytné studovat nejen kvantitativně lymfocytární infiltraci u jednotlivých malignit, ale též hodnotit fenotypické znaky, a tudíž chování těchto buněčných infiltrátů. Imunitní buňky totiž mohou být v nádoru přítomné ve velkém množství, avšak jejich aktivita může být nulová. Nádorové buňky produkují celou řadu inhibičních molekul, které se v rámci imunitní odpovědi vyskytují přirozeně a působí na lymfocyty tlumivě. Molekuly jako programmed cell death protein ligand 1 PD-L1 a CD80/86 se váží na inhibiční receptory T lymfocytů, například receptor CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4), nebo receptor PD-1 (Programmed cell death protein 1) a způsobují jejich útlum a přesmyk do fenotypu vyčerpání (z angl. exhausted phenotype).

Mechanismy, jimiž nádorové buňky unikají buňkám imunitní reakce, jsou nejen produkce tlumivých inhibičních molekul, ale i produkce molekul vedoucích k buněčné smrti. Způsob, který se nejvíce uplatňuje v likvidaci tumor-infiltrujících lymfocytů je produkce Fas ligandu, který se váže na lymfocytární Fas receptor a spouští jejich apoptózu. V in vivo modelech maligního melanomu dochází po intratumorální aplikaci buněčného preparátu z T buněk k apoptóze většiny těchto T lymfocytů osou Fas-Fas Ligand (FasL). Řada studií též popisuje, že se stoupající expresí Fas receptoru na T

buňkách se zvyšuje pravděpodobnost FasL indukované buněčné smrti tumor infiltrujících lymfocytů. [99]

4D DETAILNÍ MAPOVÁNÍ BUNĚK NÁDOROVÉHO MIKROPROSTŘEDÍ

U řady malignit však imunoterapie přináší efekt nedostatečný, nezdědka je léčba zcela bez efektu. Tato rezistence je vyvolána různými mechanismy, včetně nízké infiltrace nádoru lymfocytů, nebo změněné exprese molekul kontrolních bodů a jejich ligandů v nádorových buňkách nebo tumor infiltrujících lymfocytech [14, 17]. Několik studií se pokusilo najít algoritmy umožňující předpovědět účinnost imunoterapie na základě exprese těchto molekul v nádorových buňkách a TILs [14]. U některých nádorů jsou vysoké hladiny TILs spojeny s příznivou prognózou [75], zatímco u jiných nádorů jsou spojeny se špatnou prognózou. Podobné výsledky byly také hlášeny, pokud jde o jejich vztah k rezistenci či citlivosti na imunoterapii [91]. Studie také ukázaly, že imunosuprese vyvolaná nádorem může být v mikroprostředí nádoru nerovnoměrně distribuována [92].

Expese Fas receptoru či jiných receptorů smrti byla popisována na buňkách karcinomu slinných žláz, nikoliv však na tumor infiltrujících lymfocytech. Znalost tohoto parametru u různých stádií a histologických typů nádoru by mohla významně napomoci objasnit roli receptoru Fas v buněčné smrti imunokompetentních buněk. [100]

Fas receptor (také známý jako CD95, APO-1 nebo TNFRSF6) je protein nacházející se na povrchu mnoha buněk lidského těla a hraje klíčovou roli v regulaci apoptózy, což je proces programované buněčné smrti. Je to člen rodiny receptorů faktorů nádorové nekrózy (tumor necrosis factor receptor TNFR).

Fas ligand (FasL, CD95L, CD178) je transmembránový protein typu II z rodiny TNF cytokinů. Vytváří homotrimer na povrchu T lymfocytů, který interaguje s transmembránovým receptorem Fas (FasR, CD95, APO-1, TNFRSF6) na cílových buňkách. Na rozdíl od Fas receptoru, který je široce rozšířen, expese Fas ligandu je mnohem více kontrolována. Na svém povrchu jej exprimují zralé CD4+ T lymfocyty, dále cytotoxické CD8+ T lymfocyty, ale až po své aktivaci. [101]

Protein Fas byl poprvé identifikován pomocí monoklonální protilátky vytvořené imunizací myší buněčnou linií FS-7. Název Fas je tedy odvozen od označení povrchového antigenu spojeného s FS-7 – FS-7 associated surface antigen.[102]

Navázání ligandu na receptor spouští u postižené buňky apoptózu, proto také bývá nazýván receptor smrti. Tento mechanismus tělo používá k odstranění starých, poškozených nebo nepotřebných buněk. Rovněž hraje roli v imunitní regulaci, kde pomáhá omezit expanzi lymfocytů po odezvě na infekci a také v eliminaci buněk, které by mohly napadnout vlastní tkáň (což je důležité pro prevenci autoimunitních onemocnění). Interakci Fas receptor-Fas ligand využívají cytotoxické T lymfocyty a NK buňky. [103]

Fakt, že smrt buňky je zprostředkována aktivací Fas receptoru Fas ligandem, dokazuje neutralizace FasL specifickou protilátkou anebo blokace Fas receptoru. [23] Stav, kdy nádorové buňky získají rezistenci k Fas indukované apoptóze posune rovnováhu v nádorovém prostředí ve prospěch růstu tumoru. [104] Navíc mohou nádorové buňky zneužít tento mechanismus k eliminaci aktivovaných tumor infiltrujících lymfocytů. [21]

Buněčná smrt, apoptóza, může být iniciována několika mechanismy. Vazba Fas ligandu na Fas receptor zahajuje tzv. vnější dráhu apoptózy. Po aktivaci Fas receptoru se začne skládat intracelulární komplex zvaný DISC (death-inducing signaling complex), který se prostřednictvím adaptorového proteinu Fas associated protein with death domain FADD spojí s FADD-like interleukin-1 beta-converting enzymem (FLICE), pro-kaspasou 8, prostřednictvím homotypické interakce DED (death-effector domain). [105] Pro-kaspáza 8 mění svou konformaci, plně se aktivuje a opouští DISC. Aktivovaná kaspáza 8 iniciuje proteolytickou kaspázovou kaskádu vedoucí k apoptóze (štěpí další pro-kaspasy a tím je aktivuje – typ signální dráhy I). Kromě toho DISC komplex spouští uvolnění proapoptotických faktorů z mitochondrií a tím dále urychluje aktivační kaskádu kaspáz. [103] Nakonec jsou apoptotické buňky a tělíčka rozpoznány a fagocytovány sousedními buňkami nebo makrofágy, což umožňuje rychlé a nezápalové odstranění umírajících buněk.

PD-1 (Programmed cell death protein 1, také CD279), je protein na povrchu buněk, nejčastěji T lymfocytů. Jde o receptor, který má roli v regulaci buněčné složky imunitního systému, účinkuje prostřednictvím down-regulace imunitního systému a utvářením tolerance k vlastním buňkám potlačením zánětlivé aktivity T lymfocytů. To brání vzniku autoimunitních onemocnění, ale může také být zneužit nádorovými buňkami k zabránění imunitnímu systému v ničení nádorových buněk. [106]

PD-1 je imunitní kontrolní bod a chrání před autoimunitou dvěma mechanismy. Podporuje apoptózu (programovanou buněčnou smrt) nežádoucích antigen-specifických T-buněk v lymfatických uzlinách. Za druhé, bylo prokázáno, že signály z PD-1 mohou podporovat diferenciaci T-lymfocytů směrem k regulačním T-lymfocytům (Tregs), které mají inhibiční funkci vůči dalším imunitním buňkám. [107]

Aktivace T-lymfocytů vyžaduje signály z T-buněčného receptoru (TCR) a často také kostimulační signály z receptorů jako je CD28. Vazba PD-L1 na PD-1 inhibuje aktivační signály z TCR a CD28, čímž se snižuje aktivace a proliferace T-lymfocytů a produkce cytokinů.

Signalizaci tímto receptorem ovšem mohou zneužít nádorové buňky pro únik před imunitním systémem, což vede k toleranci nádoru. [106] Zvýšená aktivace PD-1 dráhy během chronických virových infekcí a nádorových onemocnění může u T-lymfocytů vést k tzv. "vyčerpanému" fenotypu. U vyčerpaných buněk je výrazně zvýšena exprese PD-1 a dochází ke ztrátě proliferační kapacity a výpadku produkce cytokinů a cytotoxické aktivity. [108] PD1 signalizace inhibuje PI3K/Akt dráhu a MAP-kinázovou dráhu. Hlavní důsledek inhibice těchto signálních drah je zastavení buněčného cyklu. Jednak dochází k utlumení exprese aktivační tyrozin fosfatázy pro cyklin-dependentní kinázy (Cdk). Inhibicí Cdk nedochází k fosforylaci mediátoru signalizace z TGFβ receptoru, čímž dochází ke zvýšení jeho aktivity a blokaci progresu buněčného cyklu z G1 do S fáze. [109] Inhibice PI3K dráhy vede ke stimulaci apoptózy. Dochází ke snížení exprese inhibitoru apoptózy Bcl-xL, který je jinak exprimován při kostimulační signalizaci přes CD28. Blokování PI3K dráhy má dále za následek aktivaci (absenci inhibiční fosforylace) transkripčního faktoru FoxO1, což vede k zvýšení exprese PD-1 pozitivní zpětnou vazbou. Toto přispívá k vyčerpanému fenotypu T-buněk. [110]

Receptor PD-1 má dva ligandy, proteiny PD-L1 (CD274) a PD-L2 (CD273). PD-L2 je exprimován na antigen prezentujících buňkách - dendritické buňky a makrofágy a také na žírných buňkách a peritoneálních B1 buňkách. PD-L1 je exprimován na T a B-lymfocytech, dendritických buňkách, makrofázích, mesenchymálních kmenových buňkách a žírných buňkách odvozených z kostní dřeně. Dále se nachází i na neuronech, keratinocytech, na buňkách pankreatu, plic, jater, endotelu. [111] PD-L1 se dále vyskytuje na mnoha typech nádorů, kdy je jeho zvýšená exprese asociována s nepříznivou prognózou a zvýšenou invazivitou. [112] Exprese je indukována transkripčním faktorem STAT3, hyperaktivací PI3K/Akt dráhy a hypoxií. [113] Zpětná signalizace přes PD-L1 slouží jako signál přežití. Redukuje cytotoxicitu zprostředkovanou IFN typu I, díky inhibici fosforylace proteinu STAT3. [114]

4E ZÁVĚRY LITERÁRNÍCH ÚDAJŮ

Vzhledem k roli v imunitním dohledu nádorů byly vyvinuty léčivé látky, které blokují interakci PD-1 s jeho ligandy, což vede k zesílení protinádorové imunitní odpovědi. Tyto léky se nazývají inhibitory kontrolních bodů (checkpoint inhibitors) a představují významný průlom v léčbě některých typů zhoubných nádorů, jako je melanom, nádory ledvin, plicní karcinom a další. Léky jako pembrolizumab a nivolumab jsou příklady inhibitorů PD-1, které jsou nyní schváleny pro léčbu některých nádorů.

Pochopení toho, jaké buňky karcinomy slinných žláz infiltrují, v jakém množství a s jakým fenotypem, je nezbytným krokem k možné modulaci nádorového mikroprostředí za účelem zvýhodnit imunitní buňky oproti buňkám nádorovým.

K dnešnímu dni existuje minimum údajů o expresi receptoru naprogramované smrti buňky 1 (programed cell death 1 PD-1) a ligandu tohoto receptoru (programed cell death ligand 1 PD-L1) v karcinomech slinných žláz (SGC), což by mohlo pomoci implementaci imunoterapie ICI u tohoto onemocnění. Provedli jsme proto imunohistochemickou analýzu exprese PD-1 a PD-L1 na povrchu nádorových buněk nádor infiltrujících imunitních buněk (tumor infiltrating immune cells TIIC) ve vzorcích salivárních karcinomů odděleně v jejich středu a na jejich periferii. Kromě výše uvedeného stále větší množství důkazů naznačuje, že odolnost vůči ICI terapii je

modulována interakcí Fas receptoru (CD95) a Fas ligandu (FasL, CD178) mezi nádorovými buňkami a imunitními buňkami. V této práci jsme proto dále zkoumali vyjádření Fas a FasL u nádorových buněk a TIICs ve vzorcích pacientů se SGCs, opět odděleně v jejich středu a na jejich periférii. Získaná data byla poté korelována s klinicko-patologickými údaji pacientů s otázkou, zda vyjádření a kompartmentální lokalizace těchto molekul ve zkoumaných buňkách odráží závažnost onemocnění a mohla by indikovat mechanismus odolnosti SGCs vůči imunitnímu reakci organismu a imunoterapii.

5 HYPOTÉZA

Infiltrace imunokompetentních buněk se pravděpodobně liší v centru a na periférii nádorové masy. Stejně tak receptorová výbava tumor infiltrujících buněk a vlastních nádorových buněk se v centru nádoru a na periférii může lišit, a tak významně ovlivňovat biologické chování jednotlivých nádorů.

Analýza parametrů mikroprostředí by tak mohla přispět k poznání patogenetického vývoje nádoru a tím i k jeho diagnostice a výběru vhodné terapie.

6 CÍLE PRÁCE

1. Ve vzorcích karcinomů slinných žláz detekovat tumor infiltrující lymfocyty v centru nádorů a na periférii nádorů.
2. Za použití barvených protilátek imunohistochemickými metodami stanovit expresi PD-1 receptoru, PD-1 ligandu, Fas receptoru a Fas ligandu ve vzorcích nádoru.
3. Analyzovat výskyt těchto molekul jednak na imunokompetentních buňkách, současně na buňkách nádorových.
4. Zhodnotit, zda se liší schéma výskytu těchto molekul v centru nádoru a na periférii nádoru.
5. Tento výskyt pomocí statistických metod korelovat s daty o biologickém chování jednotlivých zkoumaných nádorů – hodnocení histopatologického stupně diferenciacie nádoru, hodnocení primárního stadia tumoru, hodnocení výskytu regionálních uzlinových metastáz a vzdálených metastáz.

7 MATERIÁL A METODY

Pacienti

V této retrospektivní práci byly analyzovány vzorky 62 pacientů se salivárními karcinomy. Všichni pacienti se SGC (n = 62) podstoupili operaci mezi lednem 2013 a prosincem 2018 a poskytli písemný souhlas s účastí ve studii. Celkový počet žen 36, celkový počet hodnocených mužských pacientů 26, ve věkovém rozmezí od 21 do 85 let (tabulka 1). Všichni pacienti byli kavkazského typu. Všechny experimentální protokoly byly schváleny etickými standardy institucionálního a národního výboru pro výzkum – Etickou komisí fakultní nemocnice Motol v Praze (EK-1394/20; schváleno 23. října 2020) a provedeno v souladu s Helsinskou deklarací z roku 1964 a jejími pozdějšími dodatky nebo srovnatelnými etickými standardy. Celkem bylo zahrnuto 13 histologických podtypů. Studovaná kohorta sestávala z 13 mukoepidermoidních karcinomů, 8 acinocelulárních karcinomů, 11 adenoidně cystických karcinomů, 6 salivárních duktálních karcinomů, 6 adenokarcinomů blíže nespecifikovaných (NOS), 1 adenoskvamózního karcinomu, 1 karcinosarkom, 3 karcinomy z pleomorfního adenomu, 4 nediferencované karcinomy, 1 kribriformní cystadenokarcinom, 3 mammárnímu analogické sekreční karcinomy (MASC), , 3 myoepiteliální karcinomy a 2 spinocelulární karcinomy. Každý nádor byl hodnocen na základě stupně diference a klinického stadia nádoru. Stupeň diference tumoru byl stanoven podle histopatologického nálezu a s ohledem na stratifikaci biologického chování malignit slinných žláz stanovenou WHO [155].

Vyhodnocení stadia onemocnění (staging) bylo provedeno s použitím 8. vydání TNM klasifikace maligních nádorů (TNM) a systému stadia UICC / AJCC pro nádory hlavy a krku [30]. Individuální nádory byly hodnoceny na základě stupně dediference a stadia nádoru. Nádory byly přiřazeny buď do skupiny s nízkým stupněm – low grade (0), nebo vysokým stupněm dediference – high grade nádory. U jednoho pacienta nebylo možné stanovit stadium primárního nádoru. U každého pacienta byla hodnocena přítomnost regionálních lymfatických metastáz vyšetřením ultrazvukem nebo magnetickou rezonancí a byly korelovány s histopatologickými údaji.

	Patients (n = 62)	Patients (%)
Gender		
Female	36	58.06%
Male	26	42.94%
Histology		
Mucoepidermoid carcinoma	13	20.98%
Adenoid cystic carcinoma	11	17.74%
Acinic cell carcinoma	8	12.90%
Adenocarcinoma, not otherwise specified (NOS)	6	9.68%
Salivary duct carcinoma	6	9.68%
Undifferentiated carcinoma	4	6.45%
Carcinoma ex pleiomorphic adenoma	3	4.84%
Mammary analogue secretory carcinoma (MASC)	3	4.84%
Myoepithelial carcinoma	3	4.84%
Squamous cell carcinoma	2	3.23%
Adenosquamous carcinoma	1	1.61%
Carcinosarcoma	1	1.61%
Cribriform cystadenocarcinoma	1	1.61%
Grade		
Low (0)	22	35.48%
High (1)	40	64.52%
Primary tumor stage		
1	15	24.19%
2	9	14.55%
3	6	9.68%
4	31	50.00%
Not established	1	1.61%
Metastases		
Yes (+)	19	30.65%
No (-)	43	69.35%
Age		
≥45 years	13	20.97%
45–70 years	27	43.55%
≤70 years	22	35.48%

Tabulka 1. Klinická a patologická data pro kohortu pacientů. Stínování označuje každou skupinu proměnných a pomáhá identifikovat hlavní proměnné.

Příprava vzorků a imunohistochemie

Vzorky tkáně byly fixovány formaldehydem a zalité v parafínu (FFPE) ve Fakultní nemocnici Motol. Histologické řezy byly retrospektivně sebrány a analyzovány se souhlasem místní etické komise (EK č. EK-1394/20). Diagnóza a spolehlivost vzorků byly přezkoumány zkušeným patologem a každý vzorek tkáně byl hodnocen ručně/individuálně. Pro ověření kvantitativního hodnocení imunohistochemického barvení, a abychom vyloučili subjektivní zkreslení výsledků, byl proveden test vnitřní spolehlivosti hodnotitele – test intrareliability. Sklíčka s řezy (tloušťka 3 um) byla obarvena pomocí následujících standardizovaných protilátek: anti-PD-L1 (kat. č. M3653; Dako, Santa Clara, CA, USA), anti-PD-1 (CD279) (kat. č. 516-18662; Zytomed, Berlín,

Německo), anti-Fas (CD95) (kat. # MA5-32489; klon JJ0942, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) a anti-FasL (CD95L) (kat. # 506-2714; Zytomed, Berlin, Germany).

Exprese PD-1, PD-L1, Fas a FasL na nádorových a imunitních buňkách byla analyzována samostatně a nezávisle na sobě, jednak v centru nádoru a na jeho periferii. Tkáň za vlastním, mikroskopicky patrným, okrajem nádoru, peritumorální tkáň, byla definována jako oblast pokrývající rozhraní tumor-zdravá tkáň rozšířené o jedno vysoce výkonné pole (high power field) (HPF, 400násobné zvětšení) od okraje tumoru. Centrum nádoru bylo definováno jako oblast směrem k nádorovému centru od rozhraní nádor – zdravá tkáň.[115]. Zastoupení pozitivních buněk bylo hodnoceno pomocí nádorového proporčního skóre (tumor proportion score TPS), které se hojně používá u nádorů hlavy a krku a bylo vyhodnoceno jako cenný marker pro predikci odpovědi ICI [116-118]. V intencích tohoto přístupu byla hodnocena jako pozitivní pouze silná PD-1 cytoplazmatická reakce TIIC a nádorových buněk, u PD-L1 bylo za pozitivní barvení považováno silné barvení membrán nádorových buněk a silné PD-L1 membránové a cytoplazmatické barvení TIIC (tabulka 2). Byla použita následující metoda: $TPS = (\text{počet buněk nádoru obarvených PD-1, PD-L1, Fas, FasL}) / (\text{celkový počet životaschopných nádorových buněk}) \times 100$; (Počet obarvených PD-1, PD-L1, Fas, nebo FasL imunitních buněk infiltrujících nádor) / (celkový počet životaschopných imunitních buněk infiltrujících nádor) $\times 100$. V případě PD-1/PD-L1 bylo v souladu s dříve publikovanými studiemi zastoupení pozitivních buněk (hodnoceno pomocí TPS) hodnoceno následovně: skóre 0: negativní, skóre 1 (slabé): 1–10 %, skóre 2 (střední): 10–49 % a skóre 3 (silné): nad 50 % [26–29]. Detailní skórovací systém byl převeden do teplotních map (obrázky 3–5), kde byla barevná škála prezentována takto: žlutá barva: skóre 0, barva oranžová barva: skóre 1, okrová barva: skóre 2, a bronzová barva: skóre 3. V případech, kdy nebyla nalezena infiltrace lymfocytů, byla exprese PD-1/PD L1 klasifikována jako N/A (not applicable – nepoužitelné).

V případě Fas/FasL byla pozitivita barvení protilátkou hodnocena podle dříve publikovaného hodnotícího systému založeného na procentu plochy nádoru pokryté pozitivně nabarvenými buňkami [119-122]. Hodnocení bylo následující: skóre 0 (žádné

barvení), negativní; skóre 1 (slabé barvení), 1-10%; skóre 2 (střední barvení), 10-49%; a skóre 3 (silné barvení), nad 50%.

Statistická analýza

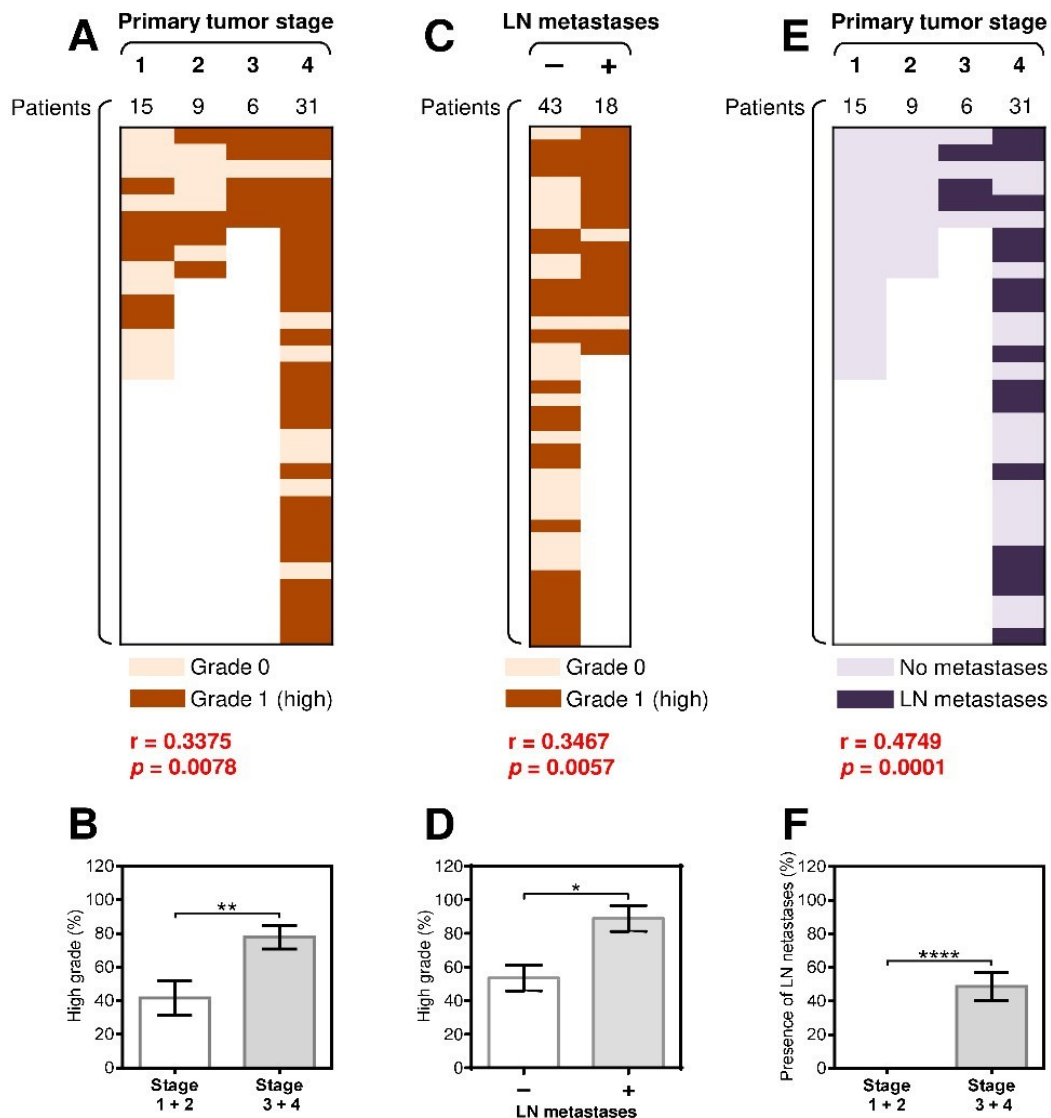
Data jsou prezentována jako průměr \pm standardní odchylka průměru (SEM), pokud není stanoveno jinak. Vztahy mezi dvěma studovanými proměnnými byly hodnoceny Spearmanovým korelačním koeficientem pořadí. Pro posouzení rozdílů byl proveden Mann-Whitney U test v PD-1 a PD-L1 vyjádření založené na různých seskupovacích proměnných (stupeň: 0/1; regionální Metastázy LN: Ne/Ano; stadium primárního nádoru: 1, 2, 3 a 4). Rozdíly v párových měřeních (např. PD-1 v centru nádoru/PD-1 na periférii nádoru; PD-L1 v TIIC/PD L1 v nádorových buňkách) byly testovány Wilcoxonovým testu značeného rozsahu. Oba Mann-Whitney U a Wilcoxonovy testy byly provedeny za použití postupu Monte Carlo resampling s $n = 10\,000$ vzorků, které kompenzují nerozhodné hodnoty a nezávisí na asymptomatických aproximacích pro p-hodnoty. Statistická významnost byla testována na hladině $\alpha = 0,05$ (v některých případech uvádíme p-hodnoty následovně: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ a **** $p < 0,0001$). Pro statistické analýzy byly použity SPSS Statistical Software verze 25.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) a GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Pro účely grafické prezentace byly použity GraphPad Prism 6, Microsoft Excel a Raw Graphs (rawgraphs.io, přístup k 10. lednu 2021).

8 VÝSLEDKY

8a Přítomnost metastáz v regionálních lymfatických uzlinách (LN) významně koreluje se stupněm diferenciacie nádoru a stadiem primárního nádoru

V této studii jsme vyhodnotili vzorky nádorů od 62 pacientů s SGC, abychom přinesli nové, hlubší informace o této vzácné skupině malignit. Jak ukazuje Tabulka 1, 62 vzorků SGC tvořilo 13 odlišných histologických subtypů. Nejčastějšími diagnózami byly acinocelulární karcinom, adenoidně cystický karcinom a mukoepidermoidní karcinom. Nejméně časté byly kribriformní cystadenokarcinom, adenoskvamózní karcinom a karcinosarkom. Z 62 pacientů s SGC bylo 15 diagnostikováno s primárním stadiem nádoru 1, 9 se stadiem 2, 6 se stadiem 3 a 31 se stadiem 4. U jednoho pacienta nebylo možné stanovit primární stadium nádoru. Dvaadvacet pacientů bylo diagnostikováno s nízkým stupněm dediferenciacie (stupeň 0) nádorů a čtyřicet pacientů s vysokým stupněm dediferenciacie (stupeň 1) nádorů. Přítomnost metastáz v lymfatických uzlinách (LN) byla hodnocena u každého pacienta.

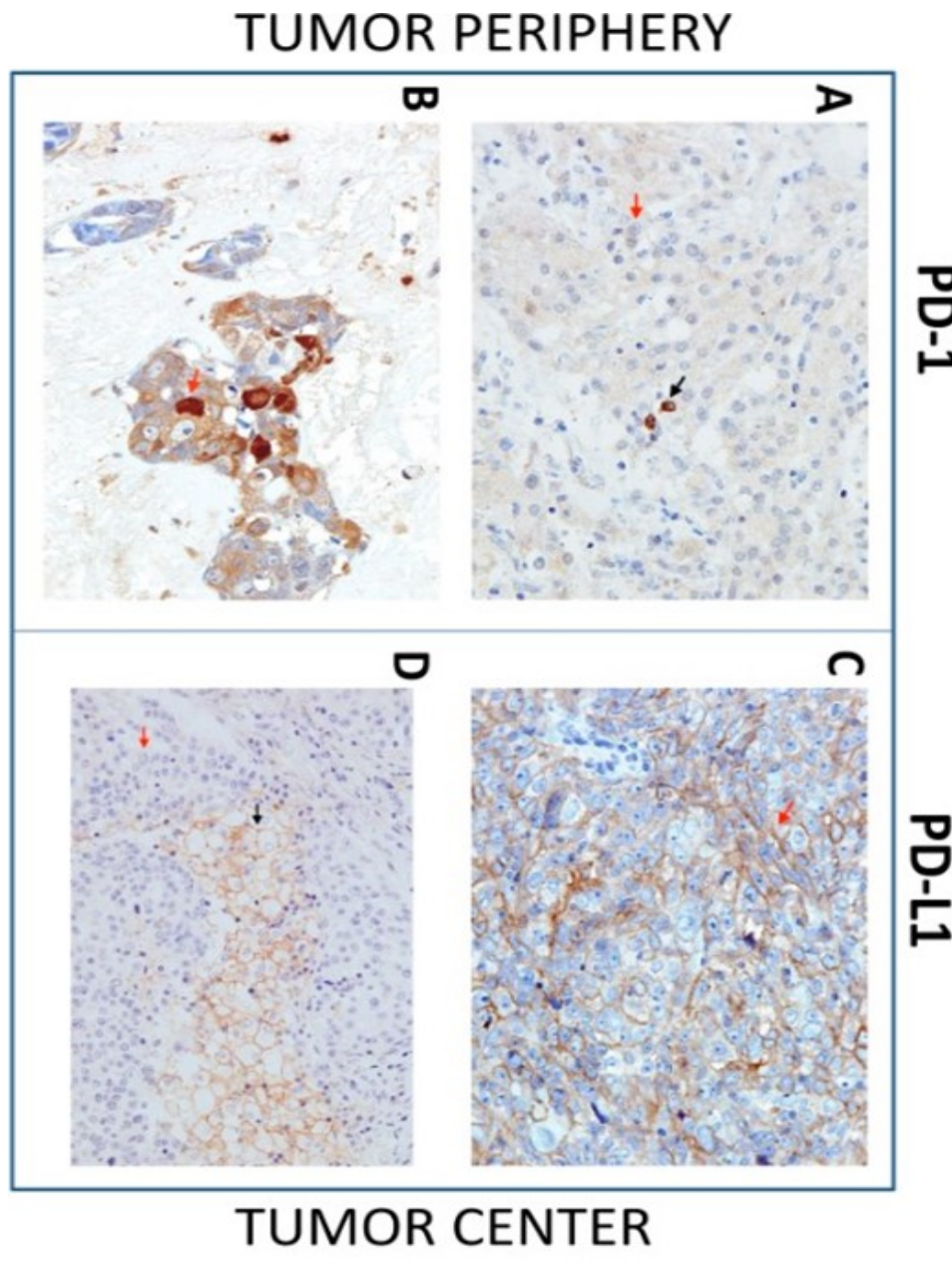
Nejprve jsme analyzovali souvislost mezi expresí PD-1/PD-L1 u různých skupin věku a pohlaví, nicméně jsme nezaznamenali žádné významné rozdíly. Dále jsme zkoumali korelace mezi stupněm dediferenciacie nádoru a primárním stadiem nádoru u pacientů s SGC. Podobně jako studie jiných typů karcinomů [123, 124], jsme zjistili významnou korelaci mezi stupněm nádoru a primárním stupněm nádoru v době diagnózy (Obrázek 1A) a významně vyšší prevalenci high grade nádorů v primárních stádiích 3 a 4 SGC než ve stádiích 1 a 2 SGC (Obrázek 1B). Dále jsme analyzovali, zda závažnost onemocnění koreluje s přítomností LN metastáz. Jak je vidět na Obrázku 1C, byla silná korelace mezi přítomností LN metastáz a stupněm dediferenciacie nádoru. High grade nádory byly také více zastoupené u pacientů s LN metastázami než u pacientů bez LN metastáz (Obrázek 1D). Ještě silnější korelace byla nalezena mezi přítomností LN metastáz a primárním stadiem nádoru (Obrázek 1E–F). Tyto údaje ukazují, že patologicky hodnocená závažnost onemocnění (primární stadium nádoru a stupeň/grade) u pacientů s SGC také koreluje s metastatickým potenciálem onemocnění.



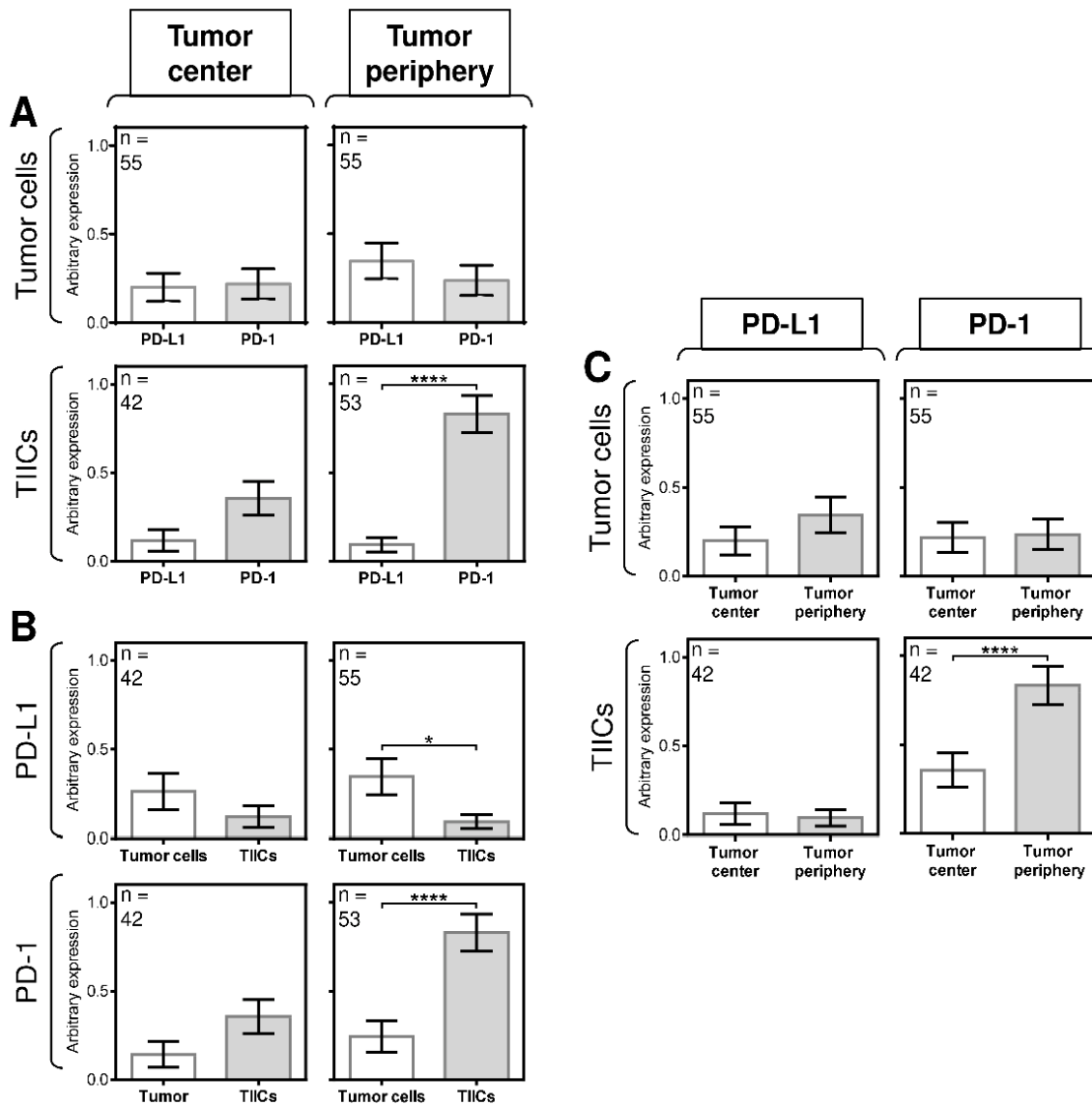
Obrazek 1. Přítomnost metastáz v regionálních lymfatických uzlinách (LN) významně koreluje s gradingem nádoru a stadiem nádoru. (A) Kohorta 61 pacientů s karcinomem slinných žláz (SGC) byla rozdělena do 4 skupin podle stadia nádoru a byla stanovena Spearmanova korelace s gradingem nádoru (stupeň 0: světle hnědý, stupeň 1: tmavě hnědý). (B) Pacientská kohorta v (A) byla rozdělena do 2 skupin podle stadia nádoru (skupina 1: pacienti ve stadiu 1 a 2, skupina 2: pacienti ve stadiu 3 a 4) a byl stanoven podíl vysoce diferencovaných nádorů v každé skupině. (C) Pacientská kohorta v (A) byla rozdělena do 2 skupin podle přítomnosti (+) nebo absence (–) LN metastáz a korelace se stadiem nádoru byla stanovena jako v (A). (D) Podíl vysoce diferencovaných nádorů v každé skupině v (C) byl stanoven. (E) Pacientská kohorta v (A) byla rozdělena do 4 skupin podle stadia primárního nádoru a byla stanovena korelace s LN metastázami (bez LN metastáz: světle modrá, stupeň 1: tmavě modrá). (F) Pacientská kohorta v (E) byla rozdělena do 2 skupin podle stadia primárního nádoru (skupina 1: pacienti ve stadiu 1 a 2, skupina 2: pacienti ve stadiu 3 a 4) a byl stanoven podíl pacientů s LN metastázami v každé skupině. V (A), (C) a (E) byly korelace vyhodnoceny pomocí Spearmanova korelačního testu ($n = 61$). * $p < 0,05$ bylo považováno za významné. V (B), (D) a (F) byl rozdíl mezi stratifikovanými skupinami pacientů vyhodnocen pomocí Mann–Whitneyho U testu (stadium 1 a 2, $n = 24$; stadium 3 a 4, $n = 37$; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$). Data jsou prezentována jako průměr \pm standardní chyba průměru (SEM).

8b Rozdíly v expresi PD-L1 a PD-1 u nádorových buněk a TIIC jsou lokalizovány na periférii nádoru

Mnoho studií se pokusilo charakterizovat mikroprostředí u různých typů nádorů se záměrem rozpoznat potenciál imunoterapie na základě exprese PD-L1 a PD-1 v nádorech [20, 125-127]. Studie také ukázaly, že nádorem indukovaná imunosuprese může být v tkáni nádorů nerovnoměrně rozložena [92, 93]. Proto jsme zkoumali vzorce exprese PD-L1 a PD-1 v buňkách nádorů a TIICs jak v centru nádorů, tak na jejich periférii (Obrázek 2) pomocí systému hodnocení uvedeného v části Materiály a metody. Nejprve jsme nenalezli významný rozdíl ve vyjádření PD-1 nebo PD-L1 v buňkách nádorů a TIICs v centru nádorů (Obrázek 3A, levé panely) nebo na periférii lokalizovaných buňkách nádorů (Obrázek 3A, horní pravý panel). Avšak exprese PD-1 byla významně vyšší než vyjádření PD-L1 v periferních TIICs (Obrázek 3A, dolní pravý panel). Další analýzy odhalily, že rozdíly ve vyjádření obou molekul mezi buňkami nádorů a TIICs se také vyskytovaly hlavně na periférii nádorů. Zatímco v centru nádorů byly buňky nádorů a TIICs s porovnatelným vyjádřením PD-L1 (Obrázek 3B, horní levý panel), periferní část nádorů ukázala významně vyšší vyjádření molekuly v buňkách nádorů než v TIICs (Obrázek 3B, horní pravý panel). Podobně nebyl zjištěn žádný významný rozdíl ve vyjádření PD-1 mezi buňkami nádorů a TIICs v centru nádorů (Obrázek 3B, dolní levý panel). Nicméně, navzdory těmto indiciím, další analýzy neukázaly žádné významné rozdíly ve vyjádření PD-L1 mezi periférií nádorů a centrem nádorů (Obrázek 3C, levé panely), ani nebyl rozdíl ve vyjádření PD-1 mezi periférií nádorů a centrem nádorů (Obrázek 3C, pravý horní panel). Byl však zjištěn významný rozdíl v expresi PD-1 mezi TIICs na periférii nádorů a centrem nádorů (Obrázek 3C, dolní pravý panel). Tyto údaje ukazují, že rozdíly ve vyjádření PD-L1 a PD-1 u pacientů s SGC byly seskupené na periférii nádorů.



Obrázek 2. Imunohistochemie (IHC) proteinu programované buněčné smrti-1 (PD-1) a ligandu proteinu programované buněčné smrti-1 (PD-L1) v tkáních SGC. Snímky ukazují expresi PD-1 nebo PD-L1 v nádorových buňkách (červená šipka) a v buňkách imunitního systému infiltrujících do nádoru (TIICs), (černá šipka) na periferii nádoru (levé snímky) a v centru nádoru (pravé snímky). (A) IHC ukazuje pozitivní expresi PD-1 v TIICs a negativní expresi PD-1 v nádorových buňkách (40× zvětšení). (B) IHC ukazuje pozitivní expresi PD-1 v nádorových buňkách (40× zvětšení). (C) IHC ukazuje pozitivní expresi PD-L1 v nádorových buňkách (40× zvětšení). (D) IHC ukazuje PD-L1-pozitivní TIICs a PD-L1-negativní nádorové buňky (40× zvětšení).



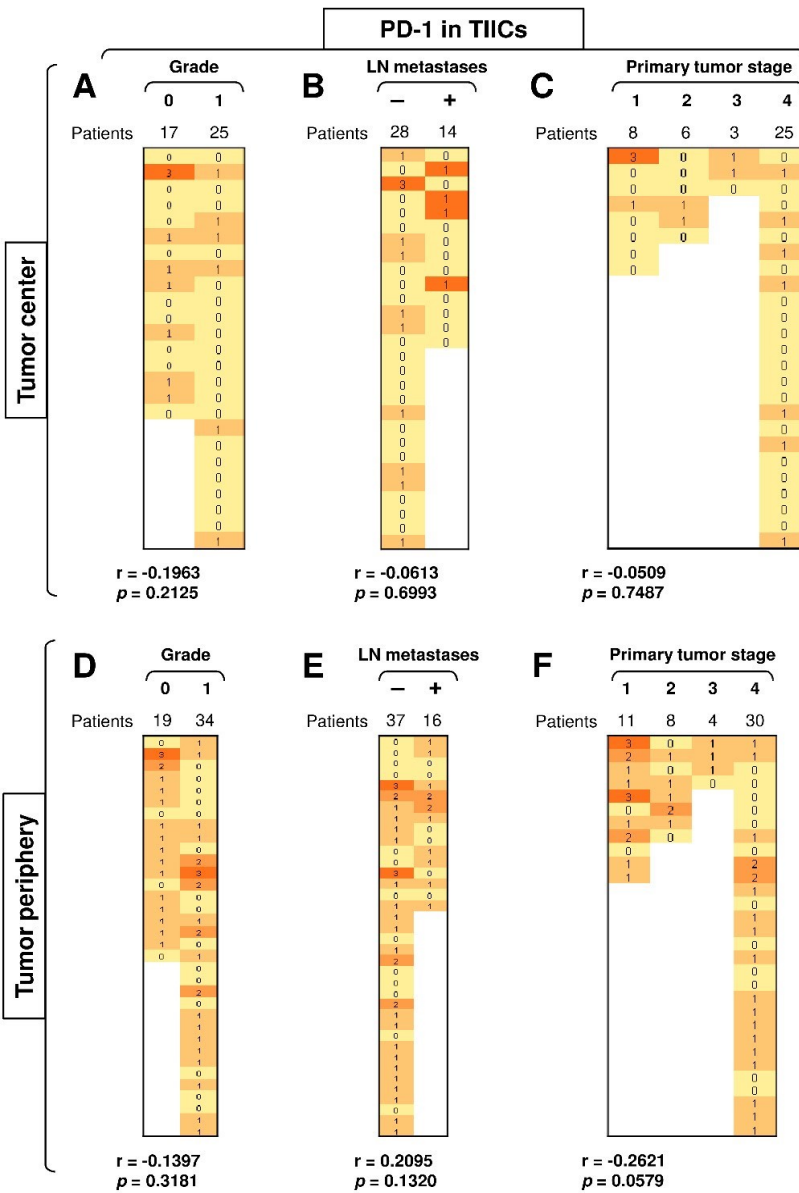
Obrázek 3. Rozdíly v expresi PD-L1 a PD-1 mezi nádorovými buňkami a TIICs jsou lokalizovány na periférii nádoru. (A) Expres PD-L1 a PD-1 se liší mezi nádorovými buňkami a TIICs v centru nádoru a na jeho periférii. Počet vyhodnocených pacientů (n) je uveden v levém horním rohu každého panelu. (B) Expres PD-L1 a PD-1 se liší mezi nádorovými buňkami a TIICs v centru nádoru a na jeho periférii. Počet vyhodnocených pacientů (n) je uveden v levém horním rohu každého panelu. (C) Expres PD-L1 a PD-1 se liší mezi nádorovými buňkami a TIICs v centru nádoru a na jeho periférii. Počet vyhodnocených pacientů (n) je uveden v levém horním rohu každého panelu. V (A–C) byl rozdíl mezi skupinami vyhodnocen s ohledem na frekvenci exprese PD-1/PD-L1 a jejich průměrné hodnoty a byl analyzován pomocí Mann–Whitneyho U testu (n je uvedeno v levém horním rohu každého panelu; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001). Data jsou prezentována jako průměr ± SEM a libovolná úroveň exprese odpovídá skórovacímu systému popsaném v sekci Materiály a metody.

8c Závažnost onemocnění nekoreluje s expresí PD-L1 a PD-1 v TIIC

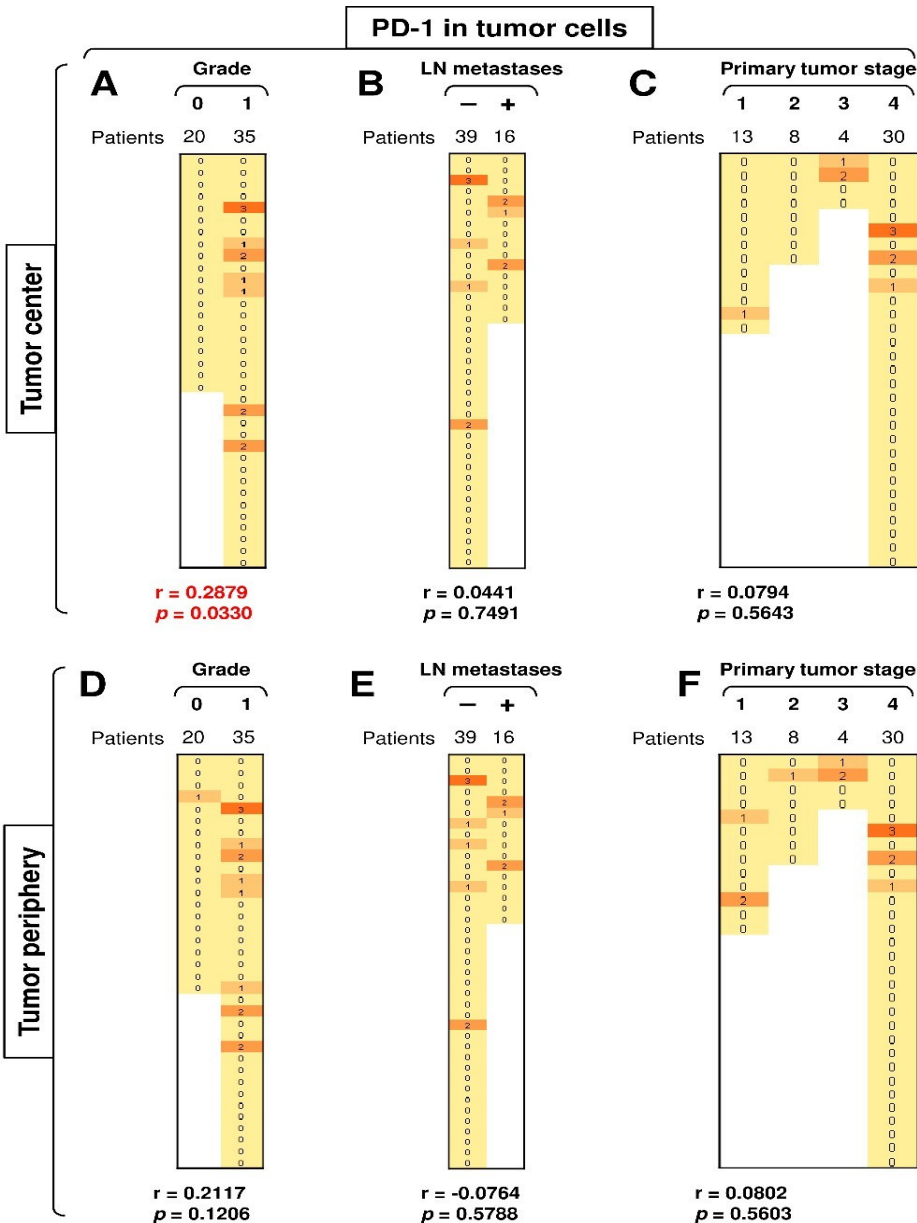
Vyjádření PD-1 a/nebo PD-L1 u různých typů nádorů často souvisí se závažností onemocnění [128]. Tyto molekuly jsou také důležitými biomarkery pro užití ICI imunoterapie [7, 14, 20]. Protože naše data ukázala, že rozdíly v expresi PD-L1 a PD-1 v nádorových buňkách a TIICs byly seskupené na periférii nádorů pacientů s SGC, dále jsme zkoumali, zda tento nálezný koreluje také se závažností onemocnění (stupněm dediferenciace nádoru, primárním stádiem nádoru a přítomností LN metastáz). Zjistili jsme, že závažnost onemocnění nekoreluje s expresí PD-L1 v TIICs ani v periférii nádoru, ani v centru nádoru (Obrázek 1), ani nebyla prokázána korelace mezi hojně exprimovaným PD-1 v TIICs v centru nádoru (Obrázek 4A-C) nebo dokonce v ještě významněji exprimovaném PD-1 v periferních TIICs (Obrázek 4D-F). Tyto údaje ukazují, že i když byla exprese PD-1 v periferních TIICs vyšší než v centrálních TIICs, tato exprese se neodráží v závažnosti onemocnění.

8d Vysoké zastoupení nádorových buněk s PD-1+ v nádorovém centru koreluje se stupněm nádoru

PD-1 se většinou vyskytuje v T buňkách [129]. Avšak, PD-1 může být také vyjádřeno v nádorových buňkách [130]. Naše analýza ukázala, že část nádorů pacientů s SGC exprimovalo tuto molekulu jak v centrálních, tak v periferních nádorových buňkách (Obrázek 5). Těžkost onemocnění (stupeň diferenciací nádoru, primární stádium nádoru a přítomnost LN metastáz) neměla významnou vazbu na expresi této molekuly v periferních nádorových buňkách (Obrázek 5D-F), stejně tak přítomnost LN metastáz nebo primární stádium nádoru neovlivnilo její expresi v centrálních nádorových buňkách (Obrázek 5B-C). Avšak stupeň diferenciací nádoru byl významně spojený s expresí PD-1 v buňkách umístěných v centru nádoru, protože exprese PD-1 v centrálních nádorových buňkách byla detekována výhradně v nádorech vysokého stupně dediferenciace (stupně 1), ale ne v nádorech nízkého stupně dediferenciace (stupně 0) (Obrázek 5A). Tyto zjištění ukazují, že procento PD-1+ nádorových buněk v centru nádoru by mohlo sloužit jako biomarker biologického chování nádoru.



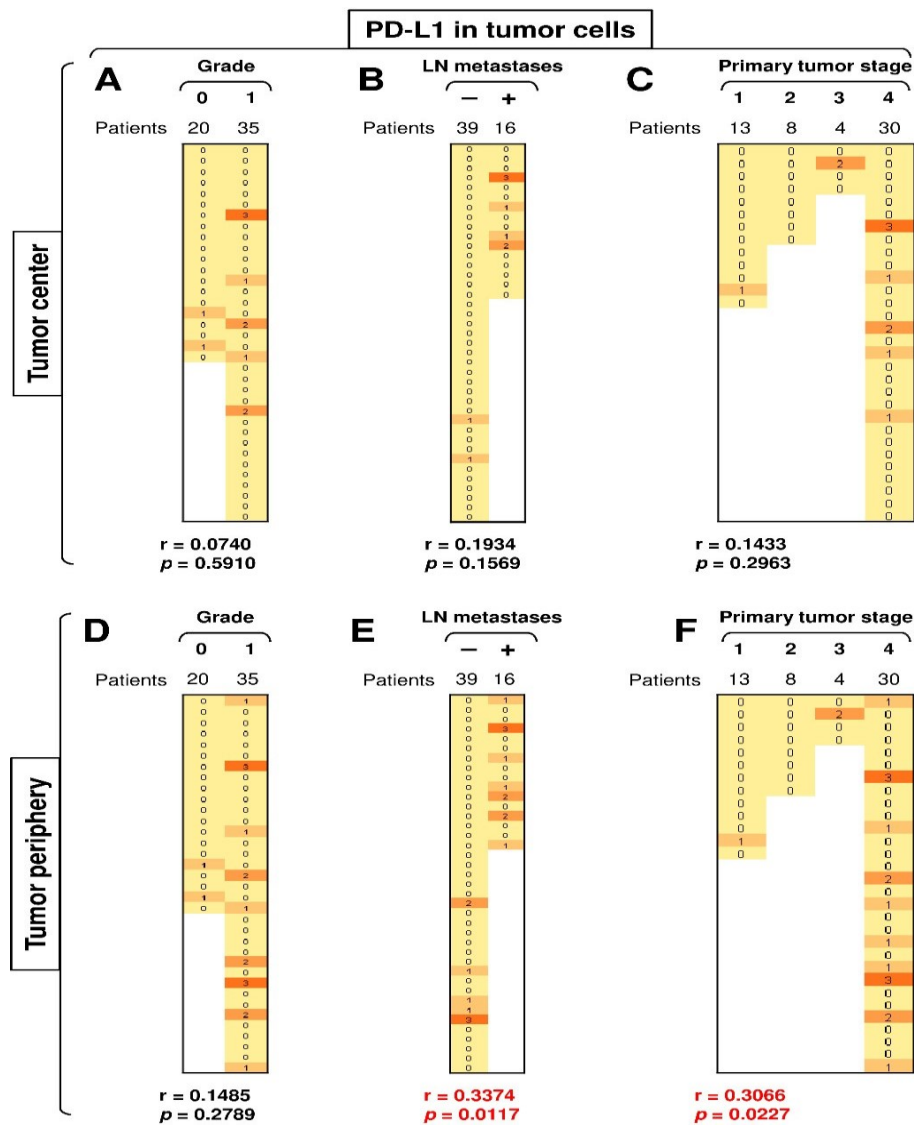
Obrázek 4. Závažnost onemocnění nekoreluje s expresí PD-L1 a PD-1 v TIICs. (A) Soubor 42 pacientů s SGC byl stratifikován do 2 skupin podle stupně diferenciace nádoru (stupeň 0 a stupeň 1) a byla určena Spearmanova korelace s expresí PD-1 v TIICs v centru nádoru. (B) Soubor pacientů v (A) byl stratifikován do 2 skupin podle přítomnosti (+) nebo nepřítomnosti (-) metastáz v LN, a Spearmanova korelace byla určena jako v (A). (C) Soubor pacientů v (A) byl stratifikován do 4 skupin podle stadia nádoru a Spearmanova korelace byla určena jako v (A). (D–F) Soubor 53 pacientů s SGC byl stratifikován do skupin jako v (A–C) a byla určena Spearmanova korelace s expresí PD-1 v TIICs na periferii nádoru. V (A–F) byly korelace vyhodnoceny pomocí Spearmanových korelačních testů, (A–C): n = 42, (D–F): n = 53. * p < 0,05 bylo považováno za významné. V (A–F) byly analýzy exprese PD-1 provedeny podle skórovacího systému popsaném v sekci Materiály a metody. Data jsou prezentována jako teplotní mapa se skórováním. Barevná škála je prezentována následovně: žlutá barva: skóre 0; meruňková barva: skóre 1; okrová barva: skóre 2; bronzová barva: skóre 3.



Obrázek 5. Vysoký počet nádorových buněk PD-1 pozitivních v centru nádoru koreluje se stupněm nádoru. (A) Soubor 55 pacientů s SGC byl stratifikován do 2 skupin podle stupně diferenciace nádoru (stupeň 0 a stupeň 1) a byla určena Spearmanova korelace s expresí PD-1 v nádorových buňkách v centru nádoru. (B) Soubor pacientů v (A) byl stratifikován do 2 skupin podle přítomnosti (+) nebo nepřítomnosti (–) metastáz v LN a Spearmanova korelace byla určena jako v (A). (C) Soubor pacientů v (A) byl stratifikován do 4 skupin podle stadia nádoru a Spearmanova korelace byla určena jako v (A). (D–F) Soubor 55 pacientů s SGC byl stratifikován do skupin jako v (A–C) a byla určena Spearmanova korelace s expresí PD-1 v nádorových buňkách na periférii nádoru. V (A–F) byly korelace vyhodnoceny pomocí Spearmanových korelačních testů, (A–F): $n = 55$. * $p < 0,05$ bylo považováno za významné. V (A–F) byly analýzy exprese PD-1 provedeny podle skórovacího systému popsáném v sekci Materiály a metody. Data jsou prezentována jako teplotní mapa se skórováním. Barevná škála je prezentována následovně: žlutá barva: skóre 0; meruňková barva: skóre 1; okrová barva: skóre 2; bronzová barva: skóre 3.

8e Přítomnost metastáz LN a stádium nádoru významně koreluje s PD-L1 expresí v buňkách na periférii nádoru

Expresí PD-L1 v buňkách periferního nádoru měla tendenci být vyšší než v centrální nádorových buňkách (obrázek 3C, horní levý panel; $p = 0,0625$). Dále jsme data stratifikovali podle závažnosti onemocnění (stupeň diferenciace nádoru, stadium primárního nádoru a přítomnost LN metastázy) a odhalili, že závažnost onemocnění nekoreluje s expresí PD-L1 v centru nádoru (obr. 6A–C), stejně tak stupeň nádoru významně neovlivňoval významně expresi PD-L1 v periferních nádorových buňkách (obr. 6D). Přítomnost metastáz LN a stádium nádoru však významně korelovalo s expresí PD-L1 v buňkách periferie nádoru (obrázek 6E–F). Tato data ukázala nejen to, že závažnost SGC korelovala s expresí PD-L1 v nádorových buňkách, ale také to, že tato korelující exprese byla sdružena na periférii nádoru.

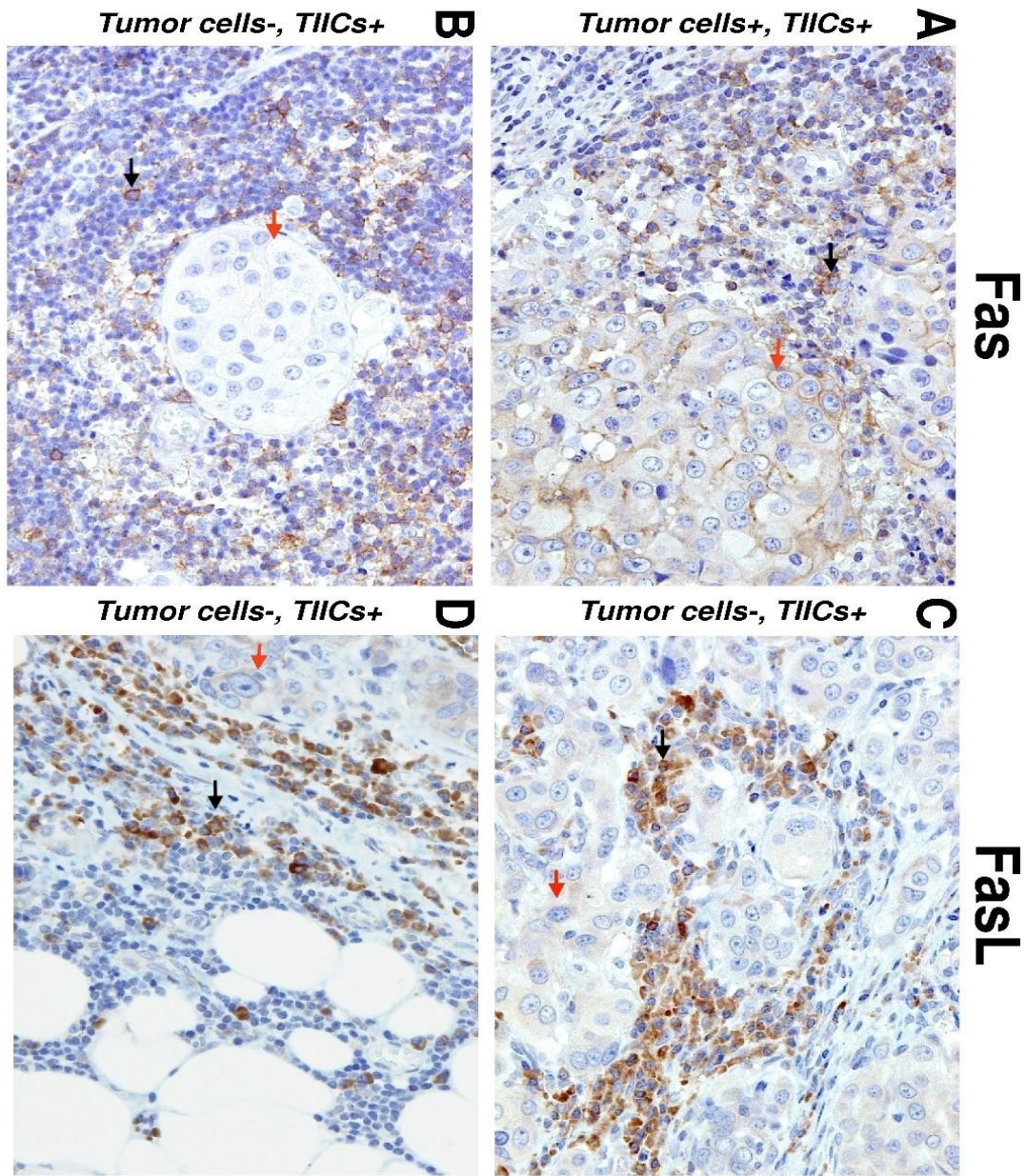


Obrázek 6. Přítomnost metastáz LN a stádium nádoru významně koreluje s expresí PD-L1 v periferních nádorových buňkách. (A) Soubor 55 pacientů s SGC byl stratifikován do 2 skupin podle stupně diference nádoru (stupeň 0 a stupeň 1), a byla určena Spearmanova korelace s expresí PD-L1 v nádorových buňkách v centru nádoru. (B) Soubor pacientů v (A) byl stratifikován do 2 skupin podle přítomnosti (+) nebo nepřítomnosti (–) metastáz v LN a Spearmanova korelace byla určena jako v (A). (C) Soubor pacientů v (A) byl stratifikován do 4 skupin podle stadia nádoru a Spearmanova korelace byla určena jako v (A). (D–F) Soubor 55 pacientů s SGC byl stratifikován do skupin jako v (A–C) a byla určena Spearmanova korelace s expresí PD-L1 v nádorových buňkách na periferii nádoru. V (A–F) byly korelace vyhodnoceny pomocí Spearmanových korelačních testů, (A–F): $n = 55$. * $p < 0,05$ bylo považováno za významné. V (A–F) byly analýzy exprese PD-1 provedeny podle skórovacího systému popsaném v sekci Materiály a metody. Data jsou prezentována jako teplotní mapa se skórováním. Barevná škála je prezentována následovně: žlutá barva: skóre 0; meruňková barva: skóre 1; okrová barva: skóre 2; bronzová barva: skóre 3.

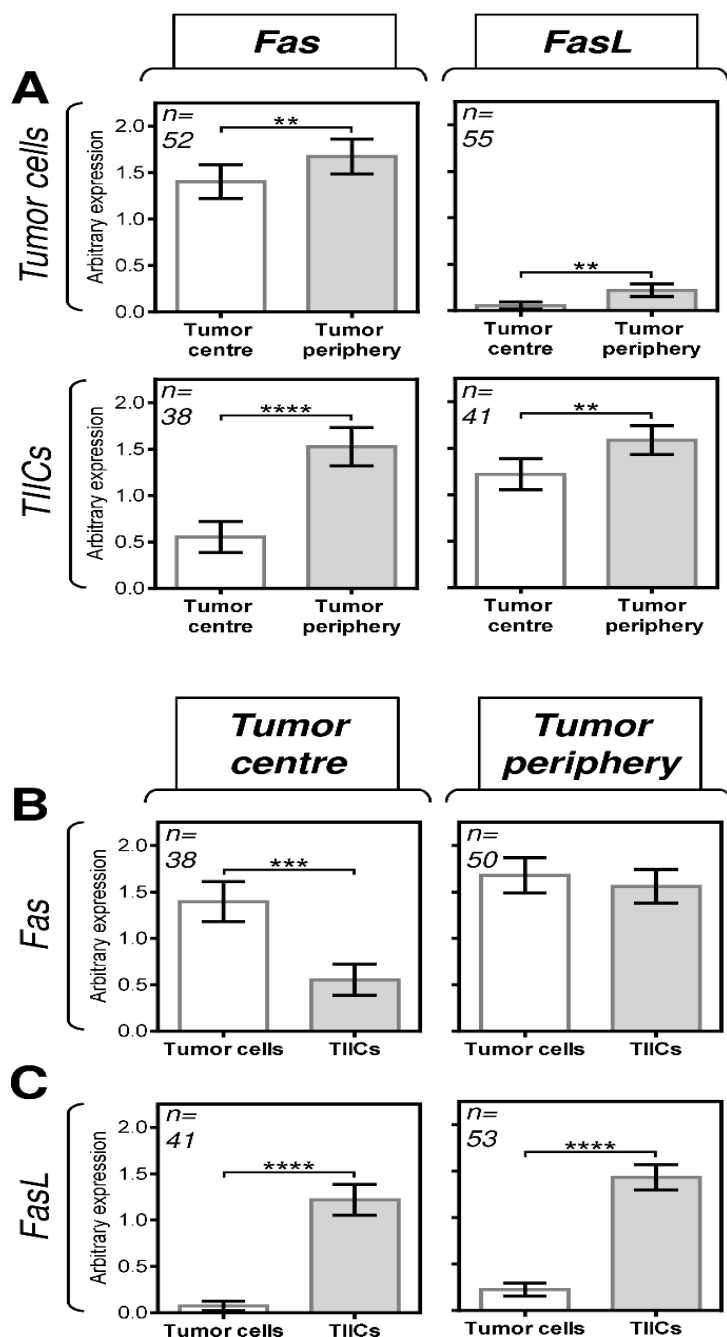
8f Rozdíly mezi vyjádřením Fas a FasL u nádorových buněk a TIICs jsou lokalizovány v centru nádorů

Analyzovali expresi Fas a FasL u nádorových buněk a TIICs v centru a periferní části nádorů. Analýza exprese byla provedena imunohistochemií s použitím specifických protilátek proti Fas nebo FasL (Obrázek 7). Úroveň exprese v tkáňových vzorcích byly analyzovány podle hodnotícího systému popsaného v sekci Materiály a metody.

Zjistili jsme, že jak nádorové buňky, tak TIIC exprimovaly více Fas a FasL v periférii nádoru než v centru nádoru (obrázek 8A). Tyto údaje naznačovaly, že interakce Fas receptoru a FasL mezi nádorovými buňkami a TIIC by mohla být soustředěna v periférii nádorů. Následné analýzy však odhalily, že nádorové buňky a TIIC měly srovnatelné hladiny exprese Fas na periférii nádoru (obrázek 8B, pravý panel), ale různé úrovně exprese v centru nádoru (obrázek 8B, levý panel). Tyto údaje tedy naznačují, že by také mohla probíhat interakce mezi nádorovými buňkami a TIIC řízená Fas receptorem v centru nádorů. Na druhou stranu tyto údaje neukazovaly žádnou takovou interakci pro FasL protože rozdíly v jeho expresi mezi nádorovými buňkami a TIIC byly srovnatelné v obou kompartmentech, přičemž vykazovaly mnohem vyšší expresi FasL v TIIC než v nádorových buňkách (Obrázek 8C).



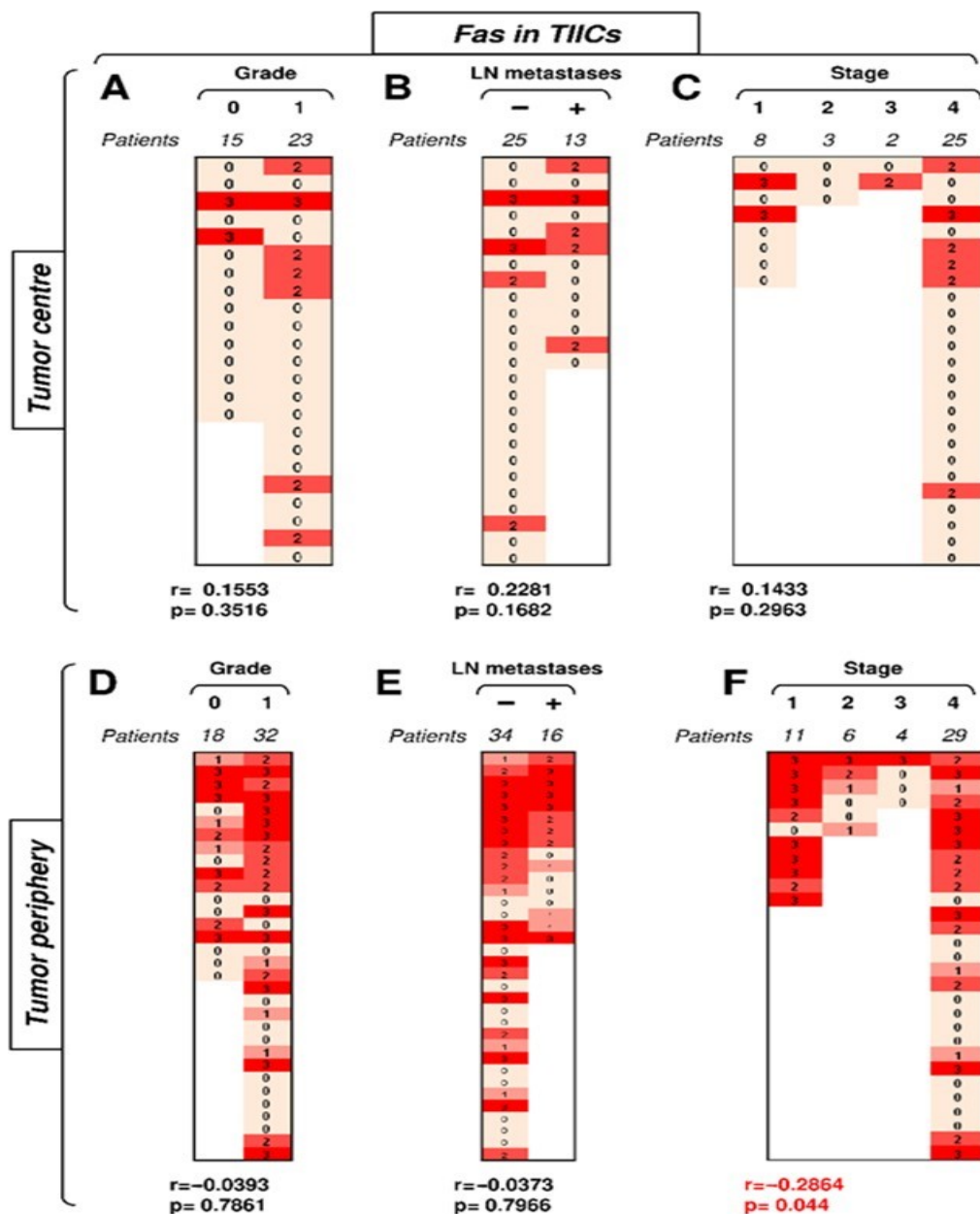
Obrázek 7. Imunohistochemie (IHC) exprese Fas a ligandu Fas (FasL) v tkáních karcinomu slinných žláz (SGC). Snímky ukazují zbarvení Fas (vlevo) a FasL (vpravo) v nádorových buňkách (červené šipky) a v imunitních buňkách infiltrujících nádor (TIICs) (černé šipky) na periferii nádoru. (A) IHC ukazuje pozitivní barvení Fas v TIICs a nádorových buňkách (20×). (B) IHC ukazuje negativní barvení Fas v nádorových buňkách a pozitivní barvení Fas v TIICs (20×). (C) IHC ukazuje pozitivní barvení FasL v nádorových buňkách a TIICs (20×). (D) IHC ukazuje negativní barvení FasL v nádorových buňkách a pozitivní barvení FasL v TIICs (20×).



Obrázek 8. Expresse Fas a FasL v nádorových buňkách a TIICs na periferii a v centru nádoru. (A) Expresse (skóre podílu nádoru (tumor proportion score TPS)) Fas a FasL v nádorových buňkách a TIICs je vyšší v periferii nádoru než ve středu nádoru. Počet pacientů (n), kteří byli vyhodnoceni, je uveden v levém horním rohu každého panelu. (B) Expresse Fas v nádorových buňkách je vyšší než v TIICs ve středu nádoru, ale srovnatelná na periferii nádoru. (C) Expresse FasL v nádorových buňkách je nižší než v TIICs jak ve středu nádoru, tak na jeho periferii. V A-C byly analýzy exprese provedeny podle skórovacího systému TPS popsaného v části Materiály a metody. Data jsou prezentována jako průměr ± SEM skóre TPS vypočítaného ze skóre TPS jednotlivých vzorků pacientů. Počet hodnocených pacientů (n) je uveden v levém horním rohu každého panelu. Rozdíl mezi skupinami byl vyhodnocen Mann-Whitneyho U testem (n je uvedeno v levém horním rohu každého panelu, ** p < 0,01, *** p < 0,001 a **** p < 0,0001).

8g Expres Fas v TIIC negativně koreluje se stádiem nádoru na periférii nádoru

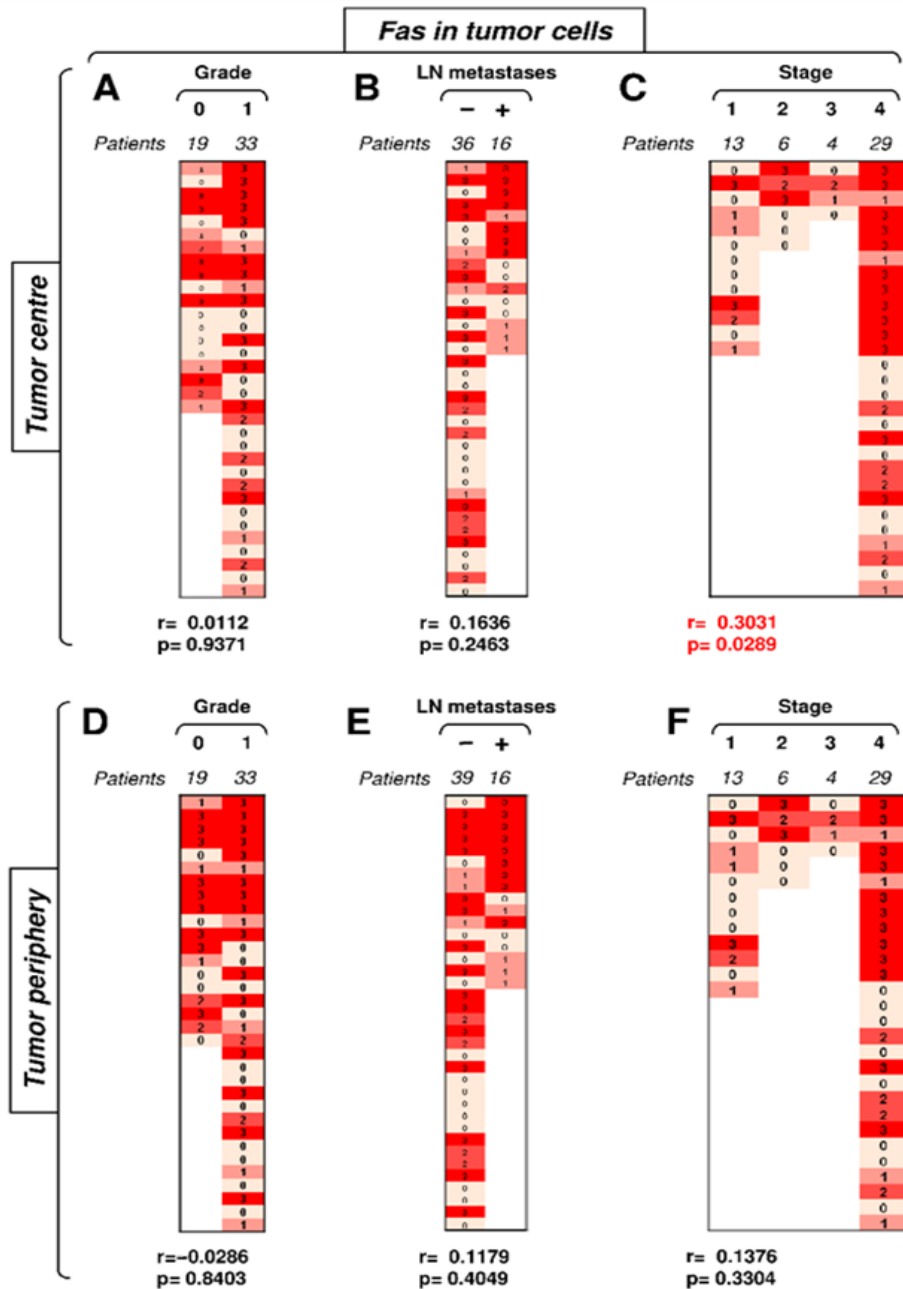
Interakce Fas-FasL byla dříve spojována se závažností onemocnění a naznačovala možné mechanismy odolnosti nádorů vůči imunitnímu systému [21, 22, 131-133]. V následující sérii analýz jsme korelovali kompartmentální výskyt Fas a FasL v buňkách nádorů a TIICs s diferenciací nádorů, s jejich stádiem a přítomností nebo nepřítomností metastáz do lymfatických uzlin (Tabulka 1). Nádory byly rozděleny do dvou skupin na základě diferenciaci: nádory nízkého stupně dediferenciaci (stupeň 0), nebo nádory vysokého stupně dediferenciaci (stupeň 1). Nádory byly také rozděleny do dvou skupin na základě přítomnosti nebo nepřítomnosti metastáz: nepřítomnost metastáz (-) nebo přítomnost metastáz (+). Nakonec byly nádory rozděleny do čtyř skupin na základě stadia nádorů: stadia 1, 2, 3 nebo 4. Nejprve jsme zkoumali, jak výskyt Fas v TIICs v centru nebo periférii nádorů koreluje se závažností onemocnění. Data ukázala výrazně vyšší frekvenci nádorů s TIICs exprimujícími Fas v periférii nádorů než v jeho centru (Obrázek 9). V centru nádorů výskyt Fas v TIICs nekoreloval s žádným z testovaných klinicko-patologických parametrů (Obrázek 9A-C). Nebyly nalezeny žádné korelace mezi výskytem Fas v TIICs v periferní části nádoru a stupněm nádoru nebo přítomností metastáz (obrázek 9D, E). Avšak v periferní části nádoru bylo zjištěno, že stadium nádoru negativně koreluje s výskytem Fas v TIICs (obrázek 9F). Tyto údaje ukazují, že stadium onemocnění je nepřímo úměrné výskytu Fas v TIICs v periferní části nádorů, ale ne v jejich středu.



Obrazek 9. Expresie Fas v TIICs v periferii nádoru koreluje se stádiem nádoru. (A) Skupina 38 pacientů s SGC byla rozdělena do 2 skupin podle stupně diferenciace nádoru (stupeň 0 a stupeň 1) a byla určena Spearmanova korelace (r) podle exprese Fas v TIICs ve středu nádoru. Analýzy exprese byly provedeny podle skórovacího systému popsaného v části Materiály a metody. Data jsou prezentována jako tepelná mapa se skórováním a pro hodnotu $p < 0,05$ (červená) bylo považováno za významné. (B) Skupina pacientů v (A) byla rozdělena do 2 skupin podle absence (-) nebo přítomnosti (+) metastáz v lymfatických uzlinách (LN) a Spearmanova korelace (r) byla stanovena jako v (A). (C) Skupina pacientů v (A) byla rozdělena do 4 skupin podle stádia nádoru a Spearmanova korelace (r) byla určena jako v (A). (D–F) Skupina 40 pacientů s SGC byla rozdělena do skupin jako v (A–C) a byla určena Spearmanova korelace (r) podle exprese Fas v TIICs v periferii nádoru.

8h Expresie Fas v nádorových buňkách pozitivně koreluje se stádiem nádoru v nádorovém centru

Dále jsme analyzovali, zda exprese Fas v nádorových buňkách koreluje se závažností onemocnění. Frekvence a intenzita exprese Fas v buňkách nádoru byly v studovaných oblastech nádoru vysoké (obrázek 10). Kompartmentová analýza neodhalila korelaci exprese Fas v buňkách nádoru na periférii vzorků (obrázek 10D-F). Stupeň malignity a přítomnost metastáz LN nekorelovaly s expresí Fas v buňkách nádoru v centru nádoru (obrázek 10A, 10B). Nicméně stádium nádoru ukázalo korelaci s expresí FAS v buňkách nádoru v centru nádoru (obrázek 10C). Tyto údaje ukazují, že na rozdíl od zjištění u T11C, stádium onemocnění pozitivně koreluje s expresí FAs v nádorových buňkách v centru nádoru, ale ne na periférii nádorů.



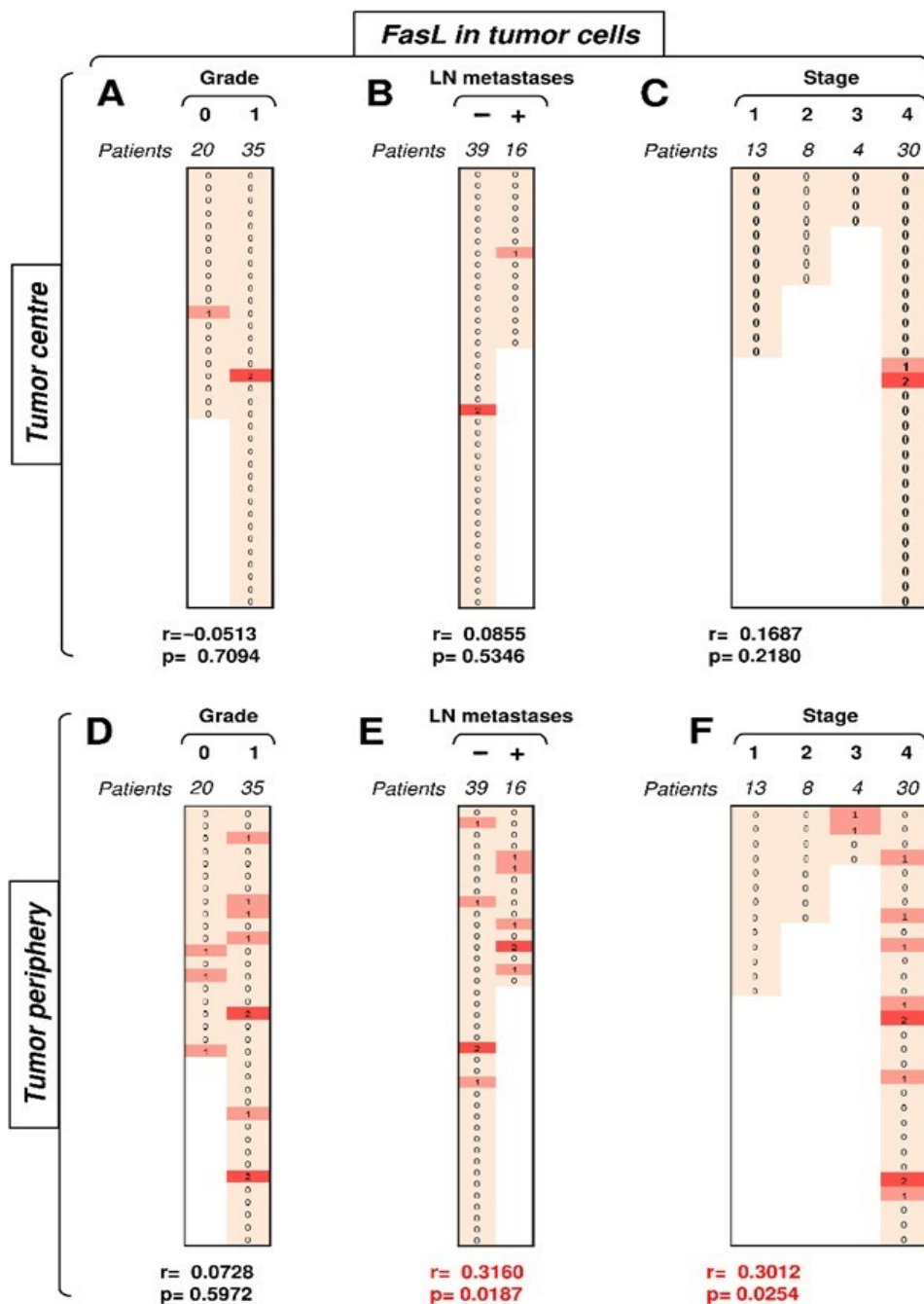
Obrázek 10. Expres Fas v nádorových buňkách ve středu nádoru koreluje se stádiem nádoru. (A) Skupina 52 pacientů s SGC byla rozdělena do 2 skupin podle stupně diferenciace nádoru (stupeň 0 a stupeň 1) a byla určena Spearmanova korelace (r) podle exprese Fas v nádorových buňkách ve středu nádoru. Analýzy exprese byly provedeny podle skórovacího systému popsaného v části Materiály a metody. Data jsou prezentována jako tepelná mapa s uvedeným skórováním. Pro hodnoty $p < 0,05$ (červená) bylo považováno za významné. (B) Skupina pacientů v (A) byla rozdělena do 2 skupin podle absence (–) nebo přítomnosti (+) metastáz v lymfatických uzlinách (LN) a Spearmanova korelace (r) byla určena jako v (A). (C) Skupina pacientů v (A) byla rozdělena do 4 skupin podle stádia nádoru a Spearmanova korelace (r) byla určena jako v (A). (D–F) Skupina 52 pacientů s SGC byla rozdělena do skupin jako v (A–C) a byla určena Spearmanova korelace (r) podle exprese Fas v nádorových buňkách v periferii nádoru.

8i Expres FasL v TIIC není ovlivněna závažností onemocnění ani distribucí v jednotlivých částech nádoru

Analýza ukázala, že výskyt faktoru Fas v TIICs koncentroval rozdíly v závažnosti onemocnění na periférii nádoru. Následné analýzy však odhalily, že výskyt faktoru FasL v TIICs nevykazoval stejný vzorec. Navzdory celkové vysoké frekvenci a intenzitě výskytu v TIICs nebyly nalezeny žádné korelace výskytu s tíží onemocnění (obrázek 11). Bez ohledu na kompartmentální distribuci, stupeň malignity, přítomnost metastáz LN a stádium nádoru nekorelovaly s výskytem faktoru FasL v TIICs (obrázek 11). Proto na rozdíl od faktoru Fas, expres FasL v TIICs neodrážel tíži onemocnění.

8j Expres FasL v nádorových buňkách pozitivně koreluje se stádiem nádoru v nádorové periférii

Data ukázala, že expres Fas v buňkách nádoru souvisel s rozdíly v závažnosti onemocnění v centru nádoru. V následných analýzách jsme zkoumali výskyt faktoru FasL v těchto buňkách. Na rozdíl od výskytu faktoru Fas, výskyt faktoru FasL v buňkách nádoru v centru nádoru nekoreloval se závažností onemocnění a téměř všechny vzorky byly negativní pro FasL v tomto oddílu (obrázek 12A-C). Na druhou stranu, výskyt faktoru FasL v buňkách nádoru na periférii nádoru byl častější než v centru nádoru (obrázek 6D-F). A co je důležité, výskyt faktoru FasL v tomto oddílu nádoru souvisel se závažností onemocnění. Zatímco stupeň malignity ukázal jen tendenci (obrázek 12D, $p = 0.0728$), přítomnost metastáz LN nebo stádium nádoru už významně korelovalo s expresí FasL v buňkách nádoru na periférii nádoru (obrázek 12E-F). Nejzajímavějším nálezem byla absence periferního výskytu faktoru FasL v nádorech stupně 1 a 2, ale jeho častý výskyt v nádorech stupně 3 a 4 (obrázek 12F). Tyto údaje ukazují, že buňky nádorů vysokého stupně mohou mobilizovat mechanismus zabíjení Fas-FasL v periférii SGCs.



Obrazek 12. Expres FasL v nádorových buňkách na periférii nádoru koreluje se stádiem nádoru. (A) Skupina 55 pacientů s SGC byla rozdělena do 2 skupin podle stupně nádoru (stupeň 0 a stupeň 1) a byla určena Spearmanova korelace (r) podle exprese FasL v nádorových buňkách ve středu nádoru. Analýzy exprese byly provedeny podle skórovacího systému popsaného v části Materiály a metody. Data jsou prezentována jako tepelná mapa s uvedeným skórováním a pro hodnoty $p < 0,05$ (červená) bylo považováno za významné. (B) Skupina pacientů v (A) byla rozdělena do 2 skupin podle absence (-) nebo přítomnosti (+) metastáz v lymfatických uzlinách (LN) a Spearmanova korelace (r) byla určena jako v (A). (C) Skupina pacientů v (A) byla rozdělena do 4 skupin podle stádia nádoru a Spearmanova korelace (r) byla určena jako v (A). (D–F) Skupina 55 pacientů s SGC byla rozdělena do skupin jako v (A–C) a byla určena Spearmanova korelace (r) podle exprese FasL v nádorových buňkách na periférii nádoru.

9 DISKUZE

Analýza molekulárních signatur receptoru a ligandu programované smrti PD-1 a PD-L1 ukázala, že jsou seskupené především v periférii nádorů SGC a mohou odrážet závažnost onemocnění. Ukázalo se, že infiltrace nádorů TIIC je cenným markerem prognózy onemocnění a citlivosti nádoru k imunoterapii [92, 128, 129]. U některých nádorů jsou vysoké hladiny TIICs spojené s příznivou prognózou [75], zatímco u jiných nádorů jsou spojené s špatnou prognózou [75, 91]. Podobné výsledky byly reportovány i v souvislosti s jejich vztahem k odolnosti/citlivosti nádoru na imunoterapii [91]. U SGCs se obsah TIICs velmi liší mezi jednotlivými podtypy, to však není nutně spojeno s odlišným biologickým chováním onemocnění. Například adenoidní cystický karcinom a salivární duktální karcinom se velmi liší v obsahu TIICs [134], ale oba patří k nejvíce terapeuticky náročným podtypům SGC [135, 136]. Proto musí být informace o infiltraci nádoru TIICs u SGCs doplněna o hodnocení molekulárních parametrů jejich mikroprostředí.

V této práci jsme ukázali, že PD-L1 pozitivní a PD-1 pozitivní TIIC byly rozdílně přítomny v jednotlivých SGC nádorech. Hlavním rozdílem však byla jejich distribuce mezi nádorovým centrem a periferií. Zatímco PD-L1 pozitivní TIIC byly rovnoměrně distribuovány mezi nádorovým centrem a periferií, PD-1 pozitivní TIIC byly převážně umístěny na periférii nádoru. Překvapivě však tato akumulace neodrážela závažnost onemocnění, což ukazuje, že periferní PD-1 pozitivní TIIC samotné nejsou dobrými prediktory závažnosti onemocnění. Studie ukázaly, že PD-1 může být také exprimován v nádorových buňkách [130]. Naše data potvrdila přítomnost PD-1 pozitivních nádorových buněk v několika vyšetřených nádorech. Nečekaně naše data také potvrdila souvislost mezi přítomností PD-1 pozitivních nádorových buněk v centru nádoru a stupněm dediferenciace nádoru. Velmi nedávná zjištění ukázala, že populace nádorových buněk, které vyjadřují PD-1/PD-L1, jsou odolné proti imunoterapii [130], a buňky nádoru, které exprimují PD-1, blokují cytotoxicitu neutrofilů v nádorové tkáni [137]. Nicméně, zda tento mechanismus působení PD-1 pozitivních nádorových buněk hraje roli také v high grade SGC bude ještě nutné objasnit.

Expres PD-L1 v nádorových buňkách silně naznačuje, že nádorové buňky využívají signální cestu PD-L1/PD-1 k potlačení imunitního systému lokálně [87]. Tato lokální buňkami zprostředkovaná suprese může hrát roli na periférii nádoru v blokování infiltrace nádoru imunitními buňkami cílícími na nádor [92, 93]. Naše data skutečně ukázala, že velké podíly buněk nádoru exprimujících PD-L1 byly seskupené v periférii vyšetřovaných nádorů. Navíc, na rozdíl od exprese PD-1 v periferních TIICs, kde nebyly nalezeny žádné korelace se závažností onemocnění, exprese PD-L1 v periferních nádorových buňkách korelovala s přítomností LN metastáz a stádiem nádoru. Překvapivě však přítomnost periferních PD-L1 pozitivních nádorových buněk nekoreloval s přítomností periferních PD-1 pozitivních TIICs. Předchozí studie ukázaly, že vzorce vyčerpání v peritumorálních imunitních buňkách jsou spojené s dobrou odpovědí na léčbu checkpoint inhibitory [138, 139]. Navíc bylo také prokázáno, že peritumorální aplikace ICI je spojena s lepším přežitím u určitých typů malignit [140]. V souladu s těmito studiemi naše výsledky také naznačují, že exprese PD-L1 v periferních TIICs pokročilých SGCs by mohla predikovat účinnost léčby ICI [141]. Navíc, exprese PD-L1 v periferních nádorových buňkách SGCs by mohla představovat cenný nástroj pro předpověď prognózy onemocnění.

Rozmístění signatur imunitních a nádorových buněk je důležitým faktorem s možným uplatněním jako biomarkery [92, 128]. Byly snahy o hodnocení nejen intra-tumorálních buněčných signatur, ale také vzorců rozmístění, které přesahují samotné nádory [92, 95, 98, 128]. Existuje však také stále více pokusů o hodnocení signatur v jednotlivých lokalitách samotných nádorů [142]. Výsledky naší práce ukázaly, že lokalizace buněk exprimujících PD-1 a PD-L1 je podstatná pro posuzování jejich prediktivních hodnot a vlivu na závažnost nádoru. Nejvýraznějším zjištěním souvisejícím s rozmístěním těchto buněk v nádoru se týká expresi PD-L1 v periferních nádorových buňkách. Zatímco vyjádření PD-L1 v buňkách nádoru umístěných v centru nádoru nebylo spojeno s přítomností LN metastáz a nekorelovalo se stádiem nádoru, vyjádření PD-L1 v buňkách nádoru umístěných v periférii nádoru ano. Tato zjištění ukazují, že nejen para-tumorální oblasti [94, 98], ale i intra-tumorální oddíly mohou poskytovat cenné dodatečné informace. Navíc mohou tyto informace odhalit nové prediktivní hodnoty biomarkerů na základě jejich buněčných/imunitních signatur.

Studie Fas receptoru a jeho ligandu ukázala, že jejich exprese v buňkách nádoru a TIICs se liší v centru a periférii nádoru. Naše údaje ukázaly, že vzorce výskytu receptoru Fas a ligandu Fas v těchto buňkách v těchto dvou kompartmentech tvoří signatury, které odrážejí tíži SGC a naznačují možný mechanismus odolnosti SGC vůči imunoterapii. Vazba faktoru FasL na faktor Fas slouží jako mechanismus indukující apoptózu, kterým mohou imunitní buňky eliminovat buňky nádoru [143]. Na druhou stranu ovšem může být tento mechanismus zneužit buňkami nádoru k eliminaci aktivovaných TIICs a zároveň tak zvýšit odolnosti nádoru vůči imunoterapii [21]. Naše data ukázala, že TIICs v SGCs exprimovaly vysoké hladiny faktoru FasL v obou oddílech nádoru a tyto hladiny byly mnohem vyšší než hladiny v buňkách nádoru. Tuto pozorování můžeme interpretovat tak, že při FasL-indukované apoptóze mají TIICs výhodu nad buňkami nádoru. Nicméně, FasL-indukovaná apoptóza vyžaduje, aby byl signální systém Fas v FasL-stimulovaných buňkách zachován a funkční [144]. V buňkách nádoru se to však nemusí vždy dít, protože buňky nádoru mohou ztratit sensitivitu k FasL-indukované apoptóze [104, 131, 145, 146]. Naše data skutečně naznačují, že tuto strategii by mohly používat buňky SGC, protože buňky nádorů v SGC vykazovaly vysoké hladiny Fas bez ohledu na přítomnost TIIC s vysokými hladinami FasL. Navíc byla hladina Fas v buňkách nádorů v centru nádoru vyšší u tumorů vysokého stadia než u nádorů nízkého stadia. Toto zjištění naznačuje, že i když TIIC vykazovaly mnohem vyšší hladiny FasL, tato exprese pravděpodobně nezabránila šíření buněk nádorů s vysokou hladinou Fas. Neúčinné likvidování buněk nádorů prostřednictvím interakce Fas-FasL může být mechanismem imunorezistence v SGC. Ovšem naše data také naznačují, že zatímco imunitní buňky jsou pravděpodobně neúčinné při likvidaci buněk nádorů prostřednictvím FasL [104, 131, 146], likvidace TIIC prostřednictvím buněk nádorů pomocí FasL může současně efektivně probíhat. [147, 148].

Dva hlavní závěry z této práce potvrzují tento dohad.

- 1) Periférie nádorů nízkého stadia byla infiltrativně obsazena TIIC s vysokými hladinami Fas, zatímco nádory pokročilého stadia měly sníženou expresi Fas v TIIC.
- 2) Nebyla nalezena exprese FasL v buňkách nádorů na periférii nádorů nízkého stadia, avšak byla nalezena v jejich pokročilých protějšcích.

To naznačuje, že high-grade nádory by mohly vyčerpat Fas exprimující TIIC na periférii SGC prostřednictvím apoptózy indukované FasL. Pravděpodobnost tohoto scénáře je mnohem vyšší, protože ve srovnání s buňkami nádorů se dá u nádorově netransformovaných, zdravých buněk očekávat s mnohem menší pravděpodobností poškozenou a nefunkční Fas-FasL signální osu, i pokud se vyskytují v nádorové tkáni [144, 149-151]. Navíc, apoptóza indukovaná FasL je klíčová pro eliminaci autoreaktivních lymfocytů za fyziologických podmínek a často je zneužívána nádory ke zvýšení jejich imunorezistence [147]. Účinnost imunoterapie u SGC, včetně checkpoint inhibitorů, nenaplnila očekávání [5]. Je těžké definovat mechanismy rezistence nádorů v SGC pro jejich extrémní rozmanitost. Tato rozmanitost se také promítá do rozmanitosti imunitního mikroprostředí nádorů (tumor immune microenvironment TME). Rozmanitost TME v SGC je dobře dokumentována pozorováními, že nejagresivnější podtypy SGC se značně liší v jejich TME. [134] Naše data však naznačují, že bez ohledu na podtyp SGC a rozmanitost TME mohou nádory široce využívat osu Fas-FasL jako společný mechanismus zamezení své eliminace. Na jedné straně může tento mechanismus zajistit odolnost buňky nádorů vůči apoptóze indukované FasL, na druhé straně tyto buňky nádorů mohou exprimovat FasL a indukovat apoptózu TIIC na periférii vysokostupňových nádorů, kde je exprese FasL v buňkách nádorů zvýšená. Z tohoto pohledu by měl jakýkoliv protokol imunoterapie zaměřený na překonání odolnosti SGC využívajících tento mechanismus založený na Fas-FasL ose podporovat nebo využívat imunitní buňky s vyšší odolností vůči apoptóze indukované FasL [152, 153] a imunitní buňky s cytotoxicitou takovou, jejíž mechanismus účinku nevyužívá apoptózu indukovanou FasL [154].

10 ZÁVĚR

Peritumorální tkáň lze považovat za interaktivní a dynamické rozhraní, které ovlivňuje a je ovlivňováno biologií nádoru a hostitelskou imunitní reakcí. Dochází zde k dalšímu šíření nádoru, toto je místo kde dediferencované buňky nádoru pronikají do organizované diferencované tkáně, kde selhává očekávaná imunitní bariera organismu. V této práci jsme doložili, že srovnáním mezi fenotypem nádorových buněk a imunitních buněk ve vlastní nádorové tkáni a peritumorální tkáni karcinomů slinných žláz lze zachytit dynamiku změn probíhajících při růstu a infiltrativním šíření nádoru. Oprávněně tak očekáváme, že zmapování a pochopení těchto procesů posune diagnostiku a léčbu nádorových onemocnění.

Tato práce přináší poprvé analýzu vzorců exprese receptoru naprogramované smrti buňky 1 (programed cell death 1 PD-1) a ligandu tohoto receptoru (programed cell death ligand 1 PD-L1) v karcinomech slinných žláz (salivary gland cancer SGC) jak v nádorových buňkách, tak v imunitních buňkách infiltrujících nádor (tumor infiltrating immune cell TIIC) pacientů s karcinomy slinných žláz. Diferenciální hodnocení centra nádoru a periferie nádoru napříč různými histologickými podtypy SGC odhalily roli periferních TIIC a nádorových buněk v pochopení faktorů, které určují závažnost onemocnění. Navíc exprese PD-1 v periferních TIIC SGC odhalila potenciál pro implementaci imunoterapie pomocí inhibitorů imunitních kontrolních bodů (ICI immune check-point inhibitors) u pacientů s SGC. Exprese PD-L1 v periferních nádorových buňkách SGC vykazovaly významnou souvislost se závažností onemocnění. Naše zjištění ukazují, že periferie nádorů SGC by mohla představovat vhodnou biomarkerovou oblast pro hodnocení závažnosti SGC a vhodnou oblast pro studium vzájemných interakcí mezi nádorem a imunitním systémem.

Periferní část nádoru vykazovala výrazně vyšší expresi PD-L1 v nádorových buňkách než v TIIC. Navíc periferní TIIC měly významně vyšší expresi PD-1 než nádorové buňky na periférii. PD-1-pozitivní nádorové buňky byly detekované výhradně v nádorovém centru high-grade nádorů, a co je nejdůležitější, přítomnost metastázy do lymfatických uzlin a stádium nádoru významně korelovaly s přítomností PD-L1-

pozitivních nádorových buněk na periférii nádoru. Molekulární signatury PD-1/PD-L1 v SGC se shlukují převážně na periférii nádoru, odrážejí závažnost onemocnění a mohou předpovídat odpověď na imunoterapii ICI u pacientů s SGC.

Současně tato práce ukázala, že zastoupení nádorových buněk SGC exprimujících Fas receptor v centru nádoru se zvyšuje s rostoucím stupněm diferenciací nádoru, zastoupení buněk imunitního systému exprimujících Fas receptor na periférii nádorů SGC se snižuje s rostoucím stupněm diferenciací nádoru a exprese FasL v nádorových buňkách SGC na periférii nádoru koreluje s gradingem nádoru. Tato zjištění ukazují, že interakce Fas-FasL na periférii nádorů SGC se nabízí jako užitečný nový prediktor závažnosti onemocnění a odpovědi na imunoterapii.

Zjistili jsme dále, že buňky nádoru produkující Fas receptor se s rostoucím stadiem nádoru hromadí ve středu karcinomů slinných žláz, a to bez ohledu na přítomnost TIICs produkujících vysoké hladiny FasL. Na druhou stranu s rostoucím stadiem nádoru jsme zjistili pokles buněk TIICs produkujících Fas na periférii nádoru, zatímco exprese FasL v nádorových buňkách na periférii nádoru korelovala se stadiem nádoru. Tyto údaje naznačují, že buňky SGC jsou odolné vůči apoptóze vyvolané FasL TIICs a navíc mohou v nádorech vyšších stádií využívat FasL k eliminaci imunitních buněk, podílet se na úniku nádoru imunitní odpovědi a zprostředkovat dále odolnosti vůči imunoterapii.

11 POUŽITÁ LITERATURA

1. Lee, R.J., et al., *Epidemiology, Prognostic Factors, and Treatment of Malignant Submandibular Gland Tumors: A Population-Based Cohort Analysis*. JAMA Otolaryngol Head Neck Surg, 2015. **141**(10): p. 905-12.
2. Galdirs, T.M., et al., *Current aspects of salivary gland tumors - a systematic review of the literature*. GMS Interdiscip Plast Reconstr Surg DGPW, 2019. **8**: p. Doc12.
3. Ettl, T., et al., *Salivary gland carcinomas*. Oral Maxillofac Surg, 2012. **16**(3): p. 267-83.
4. Gillespie, M.B., W.G. Albergotti, and D.W. Eisele, *Recurrent salivary gland cancer*. Curr Treat Options Oncol, 2012. **13**(1): p. 58-70.
5. Cohen, R.B., et al., *Pembrolizumab for the Treatment of Advanced Salivary Gland Carcinoma: Findings of the Phase 1b KEYNOTE-028 Study*. Am J Clin Oncol, 2018. **41**(11): p. 1083-1088.
6. Waldman, A.D., J.M. Fritz, and M.J. Lenardo, *A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice*. Nat Rev Immunol, 2020. **20**(11): p. 651-668.
7. Vaddepally, R.K., et al., *Review of Indications of FDA-Approved Immune Checkpoint Inhibitors per NCCN Guidelines with the Level of Evidence*. Cancers (Basel), 2020. **12**(3).
8. Voelker, R., *Immunotherapy Is Now First-line Therapy for Some Colorectal Cancers*. JAMA, 2020. **324**(5): p. 433-433.
9. Peters, S., et al., *How to make the best use of immunotherapy as first-line treatment of advanced/metastatic non-small-cell lung cancer*. Ann Oncol, 2019. **30**(6): p. 884-896.
10. Labriola, M.K., et al., *Immunotherapy Is Changing First-Line Treatment of Metastatic Renal-Cell Carcinoma*. Clin Genitourin Cancer, 2019. **17**(3): p. e513-e521.
11. Ventola, C.L., *Cancer Immunotherapy, Part 3: Challenges and Future Trends*. P T, 2017. **42**(8): p. 514-521.
12. Sharma, P., et al., *Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy*. Cell, 2017. **168**(4): p. 707-723.
13. Kawakami, Y., et al., *Immune-resistant mechanisms in cancer immunotherapy*. Int J Clin Oncol, 2020. **25**(5): p. 810-817.
14. Barrueto, L., et al., *Resistance to Checkpoint Inhibition in Cancer Immunotherapy*. Transl Oncol, 2020. **13**(3): p. 100738.
15. Kato, S., et al., *Genomic landscape of salivary gland tumors*. Oncotarget, 2015. **6**(28): p. 25631-45.
16. Ross, J.S., et al., *Comprehensive genomic profiles of metastatic and relapsed salivary gland carcinomas are associated with tumor type and reveal new routes to targeted therapies*. Ann Oncol, 2017. **28**(10): p. 2539-2546.
17. Lee, H.T., S.H. Lee, and Y.S. Heo, *Molecular Interactions of Antibody Drugs Targeting PD-1, PD-L1, and CTLA-4 in Immuno-Oncology*. Molecules, 2019. **24**(6).
18. Jiang, Y., et al., *PD-1 and PD-L1 in cancer immunotherapy: clinical implications and future considerations*. Hum Vaccin Immunother, 2019. **15**(5): p. 1111-1122.
19. Seidel, J.A., A. Otsuka, and K. Kabashima, *Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 Therapies in Cancer: Mechanisms of Action, Efficacy, and Limitations*. Front Oncol, 2018. **8**: p. 86.
20. Nowicki, T.S., S. Hu-Lieskovan, and A. Ribas, *Mechanisms of Resistance to PD-1 and PD-L1 Blockade*. Cancer J, 2018. **24**(1): p. 47-53.
21. Zhu, J., et al., *Resistance to cancer immunotherapy mediated by apoptosis of tumor-infiltrating lymphocytes*. Nat Commun, 2017. **8**(1): p. 1404.

22. Gibson, J.T., et al., *Obesity-Associated Myeloid-Derived Suppressor Cells Promote Apoptosis of Tumor-Infiltrating CD8 T Cells and Immunotherapy Resistance in Breast Cancer*. *Front Immunol*, 2020. **11**: p. 590794.
23. Peter, M.E., et al., *The role of CD95 and CD95 ligand in cancer*. *Cell Death Differ*, 2015. **22**(4): p. 549-59.
24. Spiro, R.H., *Salivary neoplasms: overview of a 35-year experience with 2,807 patients*. *Head Neck Surg*, 1986. **8**(3): p. 177-84.
25. Cummings, C. and Flint, P. et al, 2014. *Cummings Otolaryngology Head & Neck Surgery 6th edition*. Philadelphia: Mosby Elsevier.
26. Pinkston, J.A. and P. Cole, *Incidence rates of salivary gland tumors: results from a population-based study*. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 1999. **120**(6): p. 834-40.
27. Chen, A.M., et al., *Local-regional recurrence after surgery without postoperative irradiation for carcinomas of the major salivary glands: implications for adjuvant therapy*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2007. **67**(4): p. 982-7.
28. El-Naggar, A., et al., *Biochar affects the dissolved and colloidal concentrations of Cd, Cu, Ni, and Zn and their phytoavailability and potential mobility in a mining soil under dynamic redox-conditions*. *Sci Total Environ*, 2018. **624**: p. 1059-1071.
29. Eveson, J.W. and R.A. Cawson, *Salivary gland tumours. A review of 2410 cases with particular reference to histological types, site, age and sex distribution*. *J Pathol*, 1985. **146**(1): p. 51-8.
30. Huang, S.H. and B. O'Sullivan, *Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer*. *Curr Treat Options Oncol*, 2017. **18**(7): p. 40.
31. Terhaard, C.H., et al., *Salivary gland carcinoma: independent prognostic factors for locoregional control, distant metastases, and overall survival: results of the Dutch head and neck oncology cooperative group*. *Head Neck*, 2004. **26**(8): p. 681-92; discussion 692-3.
32. Bhattacharyya, N. and M.P. Fried, *Nodal metastasis in major salivary gland cancer: predictive factors and effects on survival*. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2002. **128**(8): p. 904-8.
33. O'Brien, C.J., et al., *Malignant salivary tumors--analysis of prognostic factors and survival*. *Head Neck Surg*, 1986. **9**(2): p. 82-92.
34. North, C.A., et al., *Carcinoma of the major salivary glands treated by surgery or surgery plus postoperative radiotherapy*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1990. **18**(6): p. 1319-26.
35. Feinstein, T.M., et al., *Prognostic factors in patients with high-risk locally advanced salivary gland cancers treated with surgery and postoperative radiotherapy*. *Head Neck*, 2011. **33**(3): p. 318-23.
36. Amit, M., et al., *Incidence of cervical lymph node metastasis and its association with outcomes in patients with adenoid cystic carcinoma. An international collaborative study*. *Head Neck*, 2015. **37**(7): p. 1032-7.
37. Spiro, R.H., et al., *Carcinoma of major salivary glands. Recent trends*. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 1989. **115**(3): p. 316-21.
38. Renehan, A.G., et al., *Clinico-pathological and treatment-related factors influencing survival in parotid cancer*. *Br J Cancer*, 1999. **80**(8): p. 1296-300.
39. Guzzo, M., et al., *Mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands: clinicopathologic review of 108 patients treated at the National Cancer Institute of Milan*. *Ann Surg Oncol*, 2002. **9**(7): p. 688-95.
40. Aro, K., I. Leivo, and A.A. Makitie, *Management and outcome of patients with mucoepidermoid carcinoma of major salivary gland origin: a single institution's 30-year experience*. *Laryngoscope*, 2008. **118**(2): p. 258-62.
41. Lopes, M.A., G.C. Santos, and L.P. Kowalski, *Multivariate survival analysis of 128 cases of oral cavity minor salivary gland carcinomas*. *Head Neck*, 1998. **20**(8): p. 699-706.

42. Therkildsen, M.H., et al., *Salivary gland carcinomas--prognostic factors*. Acta Oncol, 1998. **37**(7-8): p. 701-13.
43. Suzzi, M.V., et al., *Prognostic relevance of cell proliferation in major salivary gland carcinomas*. Acta Otorhinolaryngol Ital, 2005. **25**(3): p. 161-8.
44. Hicks, M.J., et al., *Prognostic factors in mucoepidermoid carcinomas of major salivary glands: a clinicopathologic and flow cytometric study*. Eur J Cancer B Oral Oncol, 1994. **30B**(5): p. 329-34.
45. Hicks, J. and C. Flaitz, *Mucoepidermoid carcinoma of salivary glands in children and adolescents: assessment of proliferation markers*. Oral Oncol, 2000. **36**(5): p. 454-60.
46. Lim, J.J., et al., *Expression of vascular endothelial growth factor in salivary gland carcinomas and its relation to p53, Ki-67 and prognosis*. J Oral Pathol Med, 2003. **32**(9): p. 552-61.
47. Okabe, M., et al., *Prognostic significance of p27 and Ki-67 expression in mucoepidermoid carcinoma of the intraoral minor salivary gland*. Mod Pathol, 2001. **14**(10): p. 1008-14.
48. Wang, X., et al., *Management of salivary gland carcinomas - a review*. Oncotarget, 2017. **8**(3): p. 3946-3956.
49. Lagha, A., et al., *Systemic therapy in the management of metastatic or advanced salivary gland cancers*. Head Neck Oncol, 2012. **4**: p. 19.
50. Liu, T.R., et al., *Adenoid cystic carcinoma of the nasopharynx: 27-year experience*. Laryngoscope, 2008. **118**(11): p. 1981-8.
51. Iseli, T.A., et al., *Role of radiotherapy in adenoid cystic carcinoma of the head and neck*. J Laryngol Otol, 2009. **123**(10): p. 1137-44.
52. Mahmood, U., et al., *Adjuvant radiation therapy for high-grade and/or locally advanced major salivary gland tumors*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2011. **137**(10): p. 1025-30.
53. Terhaard, C.H., et al., *The role of radiotherapy in the treatment of malignant salivary gland tumors*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2005. **61**(1): p. 103-11.
54. Armstrong, J.G., et al., *Malignant tumors of major salivary gland origin. A matched-pair analysis of the role of combined surgery and postoperative radiotherapy*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 1990. **116**(3): p. 290-3.
55. Chen, A.M., et al., *Patterns of nodal relapse after surgery and postoperative radiation therapy for carcinomas of the major and minor salivary glands: what is the role of elective neck irradiation?* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2007. **67**(4): p. 988-94.
56. Szewczyk, M., et al., *Management of clinically negative neck in salivary gland cancers - elective neck dissection, irradiation, or surveillance?* Contemp Oncol (Pozn), 2019. **23**(3): p. 169-173.
57. Rizk, S., et al., *Activity of chemotherapy in the palliative treatment of salivary gland tumors: review of the literature*. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2007. **264**(6): p. 587-94.
58. Mifsud, M.J., et al., *Adjuvant radiotherapy versus concurrent chemoradiotherapy for the management of high-risk salivary gland carcinomas*. Head Neck, 2016. **38**(11): p. 1628-1633.
59. Jeng, Y.M., C.Y. Lin, and H.C. Hsu, *Expression of the c-kit protein is associated with certain subtypes of salivary gland carcinoma*. Cancer Lett, 2000. **154**(1): p. 107-11.
60. Hotte, S.J., et al., *Imatinib mesylate in patients with adenoid cystic cancers of the salivary glands expressing c-kit: a Princess Margaret Hospital phase II consortium study*. J Clin Oncol, 2005. **23**(3): p. 585-90.
61. Pfeffer, M.R., et al., *A phase II study of Imatinib for advanced adenoid cystic carcinoma of head and neck salivary glands*. Oral Oncol, 2007. **43**(1): p. 33-6.
62. Sorensen, K.B., et al., *Parotid carcinoma: expression of kit protein and epidermal growth factor receptor*. J Oral Pathol Med, 2006. **35**(5): p. 286-91.
63. Hitre, E., et al., *Cetuximab and platinum-based chemoradio- or chemotherapy of patients with epidermal growth factor receptor expressing adenoid cystic carcinoma: a phase II trial*. Br J Cancer, 2013. **109**(5): p. 1117-22.

64. Agulnik, M., et al., *Phase II study of lapatinib in recurrent or metastatic epidermal growth factor receptor and/or erbB2 expressing adenoid cystic carcinoma and non adenoid cystic carcinoma malignant tumors of the salivary glands*. J Clin Oncol, 2007. **25**(25): p. 3978-84.
65. Nixon, N.A., M.B. Hannouf, and S. Verma, *A review of the value of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-targeted therapies in breast cancer*. Eur J Cancer, 2018. **89**: p. 72-81.
66. Alotaibi, A.M., et al., *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2/neu) in Salivary Gland Carcinomas: A Review of Literature*. J Clin Diagn Res, 2015. **9**(2): p. ZE04-8.
67. Haddad, R., et al., *Herceptin in patients with advanced or metastatic salivary gland carcinomas. A phase II study*. Oral Oncol, 2003. **39**(7): p. 724-7.
68. Perissinotti, A.J., et al., *The role of trastuzumab in the management of salivary ductal carcinomas*. Anticancer Res, 2013. **33**(6): p. 2587-91.
69. Newick, K., et al., *CAR T Cell Therapy for Solid Tumors*. Annu Rev Med, 2017. **68**: p. 139-152.
70. Oiseth, S.J. and M.S. Aziz, *Cancer immunotherapy: a brief review of the history, possibilities, and challenges ahead*. Journal of Cancer Metastasis and Treatment, 2017. **3**: p. 250-261.
71. Fife, B.T. and J.A. Bluestone, *Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways*. Immunol Rev, 2008. **224**: p. 166-82.
72. Lei, Y., et al., *Telltale tumor infiltrating lymphocytes (TIL) in oral, head & neck cancer*. Oral Oncol, 2016. **61**: p. 159-65.
73. Badalamenti, G., et al., *Role of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with solid tumors: Can a drop dig a stone?* Cell Immunol, 2019. **343**: p. 103753.
74. Robins, H.S., et al., *Digital genomic quantification of tumor-infiltrating lymphocytes*. Sci Transl Med, 2013. **5**(214): p. 214ra169.
75. Gooden, M.J., et al., *The prognostic influence of tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: a systematic review with meta-analysis*. Br J Cancer, 2011. **105**(1): p. 93-103.
76. Galon, J., et al., *Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome*. Science, 2006. **313**(5795): p. 1960-4.
77. Pages, F., et al., *International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study*. Lancet, 2018. **391**(10135): p. 2128-2139.
78. Herzberg, B. and D.E. Fisher, *Metastatic melanoma and immunotherapy*. Clin Immunol, 2016. **172**: p. 105-110.
79. Stanton, S.E., S. Adams, and M.L. Disis, *Variation in the Incidence and Magnitude of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer Subtypes: A Systematic Review*. JAMA Oncol, 2016. **2**(10): p. 1354-1360.
80. Tian, C., et al., *Prognostic significance of tumor-infiltrating CD8(+) or CD3(+) T lymphocytes and interleukin-2 expression in radically resected non-small cell lung cancer*. Chin Med J (Engl), 2015. **128**(1): p. 105-10.
81. Yao, W., et al., *The Prognostic Value of Tumor-infiltrating Lymphocytes in Hepatocellular Carcinoma: a Systematic Review and Meta-analysis*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 7525.
82. Zeng, D.Q., et al., *Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes for clinical therapeutic research in patients with non-small cell lung cancer*. Oncotarget, 2016. **7**(12): p. 13765-81.
83. Remark, R., et al., *The non-small cell lung cancer immune contexture. A major determinant of tumor characteristics and patient outcome*. Am J Respir Crit Care Med, 2015. **191**(4): p. 377-90.
84. Almangush, A., et al., *Tumor-infiltrating lymphocytes associate with outcome in nonendemic nasopharyngeal carcinoma: a multicenter study*. Hum Pathol, 2018. **81**: p. 211-219.
85. Fujii, H., et al., *CD8(+) tumor-infiltrating lymphocytes at primary sites as a possible prognostic factor of cutaneous angiosarcoma*. Int J Cancer, 2014. **134**(10): p. 2393-402.

86. Hu, W.H., et al., *Tumor-infiltrating CD8(+) T lymphocytes associated with clinical outcome in anal squamous cell carcinoma*. J Surg Oncol, 2015. **112**(4): p. 421-6.
87. Alsaab, H.O., et al., *PD-1 and PD-L1 Checkpoint Signaling Inhibition for Cancer Immunotherapy: Mechanism, Combinations, and Clinical Outcome*. Front Pharmacol, 2017. **8**: p. 561.
88. Larsen, S.K., Y. Gao, and P.H. Basse, *NK cells in the tumor microenvironment*. Crit Rev Oncog, 2014. **19**(1-2): p. 91-105.
89. Rautela, J., et al., *Molecular insight into targeting the NK cell immune response to cancer*. Immunol Cell Biol, 2018. **96**(5): p. 477-484.
90. Dyck, L. and L. Lynch, *New Job for NK Cells: Architects of the Tumor Microenvironment*. Immunity, 2018. **48**(1): p. 9-11.
91. Hendry, S., et al., *Assessing Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method from the International Immunology Oncology Biomarkers Working Group: Part 2: TILs in Melanoma, Gastrointestinal Tract Carcinomas, Non-Small Cell Lung Carcinoma and Mesothelioma, Endometrial and Ovarian Carcinomas, Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck, Genitourinary Carcinomas, and Primary Brain Tumors*. Adv Anat Pathol, 2017. **24**(6): p. 311-335.
92. Fridman, W.H., et al., *The immune contexture in cancer prognosis and treatment*. Nat Rev Clin Oncol, 2017. **14**(12): p. 717-734.
93. Giraldo, N.A., et al., *Orchestration and Prognostic Significance of Immune Checkpoints in the Microenvironment of Primary and Metastatic Renal Cell Cancer*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(13): p. 3031-40.
94. Strizova, Z., et al., *NK and T cells with a cytotoxic/migratory phenotype accumulate in peritumoral tissue of patients with clear cell renal carcinoma*. Urol Oncol, 2019. **37**(7): p. 503-509.
95. Park, C.K. and S.K. Kim, *Clinicopathological significance of intratumoral and peritumoral lymphocytes and lymphocyte score based on the histologic subtypes of cutaneous melanoma*. Oncotarget, 2017. **8**(9): p. 14759-14769.
96. Miksch, R.C., et al., *Prognostic Impact of Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Neutrophils on Survival of Patients with Upfront Resection of Pancreatic Cancer*. Cancers (Basel), 2019. **11**(1).
97. Sorbye, S.W., et al., *Prognostic impact of peritumoral lymphocyte infiltration in soft tissue sarcomas*. BMC Clin Pathol, 2012. **12**: p. 5.
98. Strizova, Z., et al., *The paratumoral immune cell signature reveals the potential for the implementation of immunotherapy in esophageal carcinoma patients*. J Cancer Res Clin Oncol, 2020. **146**(8): p. 1979-1992.
99. Vinay, D.S., et al., *Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies*. Semin Cancer Biol, 2015. **35** Suppl: p. S185-S198.
100. da Silva, G.M., et al., *Apoptotic signaling in salivary mucoepidermoid carcinoma*. Head Neck, 2019. **41**(9): p. 2904-2913.
101. Tanaka, M., et al., *Expression of the functional soluble form of human fas ligand in activated lymphocytes*. EMBO J, 1995. **14**(6): p. 1129-35.
102. Nagata, S., *Early work on the function of CD95, an interview with Shige Nagata*. Cell Death Differ, 2004. **11** Suppl 1: p. S23-7.
103. Wajant, H., *The Fas signaling pathway: more than a paradigm*. Science, 2002. **296**(5573): p. 1635-6.
104. Sordo-Bahamonde, C., et al., *Mechanisms of Apoptosis Resistance to NK Cell-Mediated Cytotoxicity in Cancer*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(10).
105. Wang, L., et al., *The Fas-FADD death domain complex structure reveals the basis of DISC assembly and disease mutations*. Nat Struct Mol Biol, 2010. **17**(11): p. 1324-9.

106. Syn, N.L., et al., *De-novo and acquired resistance to immune checkpoint targeting*. Lancet Oncol, 2017. **18**(12): p. e731-e741.
107. Fife, B.T. and K.E. Pauken, *The role of the PD-1 pathway in autoimmunity and peripheral tolerance*. Ann N Y Acad Sci, 2011. **1217**: p. 45-59.
108. Barber, D.L., et al., *Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection*. Nature, 2006. **439**(7077): p. 682-7.
109. Patsoukis, N., et al., *Selective effects of PD-1 on Akt and Ras pathways regulate molecular components of the cell cycle and inhibit T cell proliferation*. Sci Signal, 2012. **5**(230): p. ra46.
110. Parry, R.V., et al., *CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(21): p. 9543-53.
111. Keir, M.E., et al., *PD-1 and its ligands in tolerance and immunity*. Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 677-704.
112. He, J., et al., *Development of PD-1/PD-L1 Pathway in Tumor Immune Microenvironment and Treatment for Non-Small Cell Lung Cancer*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 13110.
113. Eppihimer, M.J., et al., *Expression and regulation of the PD-L1 immunoinhibitory molecule on microvascular endothelial cells*. Microcirculation, 2002. **9**(2): p. 133-45.
114. Gato-Canas, M., et al., *PDL1 Signals through Conserved Sequence Motifs to Overcome Interferon-Mediated Cytotoxicity*. Cell Rep, 2017. **20**(8): p. 1818-1829.
115. O'Kane, G., et al., *Zonal differences in PD-1 expression in centre of tumour versus periphery in microsatellite stable and unstable colorectal cancer*. Journal of Clinical Oncology, 2015. **33**(15_suppl): p. 3574-3574.
116. Emancipator, K., et al., *Comparing programmed death ligand 1 scores for predicting pembrolizumab efficacy in head and neck cancer*. Mod Pathol, 2021. **34**(3): p. 532-541.
117. de Ruyter, E.J., et al., *Comparison of three PD-L1 immunohistochemical assays in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC)*. Mod Pathol, 2021. **34**(6): p. 1125-1132.
118. Rasmussen, J.H., et al., *Intratumor heterogeneity of PD-L1 expression in head and neck squamous cell carcinoma*. Br J Cancer, 2019. **120**(10): p. 1003-1006.
119. Ferrata, M., et al., *PD-L1 Expression and Immune Cell Infiltration in Gastroenteropancreatic (GEP) and Non-GEP Neuroendocrine Neoplasms With High Proliferative Activity*. Front Oncol, 2019. **9**: p. 343.
120. Phillips, T., et al., *Development of an automated PD-L1 immunohistochemistry (IHC) assay for non-small cell lung cancer*. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2015. **23**(8): p. 541-9.
121. Igarashi, T., et al., *Scoring of PD-L1 expression intensity on pulmonary adenocarcinomas and the correlations with clinicopathological factors*. ESMO Open, 2016. **1**(4): p. e000083.
122. Cedres, S., et al., *Analysis of expression of programmed cell death 1 ligand 1 (PD-L1) in malignant pleural mesothelioma (MPM)*. PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0121071.
123. Derwinger, K., et al., *Tumour differentiation grade is associated with TNM staging and the risk of node metastasis in colorectal cancer*. Acta Oncol, 2010. **49**(1): p. 57-62.
124. Tabibi, A., et al., *Correlation between size of renal cell carcinoma and its grade, stage, and histological subtype*. Urol J, 2007. **4**(1): p. 10-3.
125. Murciano-Goroff, Y.R., A.B. Warner, and J.D. Wolchok, *The future of cancer immunotherapy: microenvironment-targeting combinations*. Cell Res, 2020. **30**(6): p. 507-519.
126. Kim, S., et al., *The tumor immune microenvironmental analysis of 2,033 transcriptomes across 7 cancer types*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 9536.
127. Huo, M., et al., *Tumor microenvironment characterization in head and neck cancer identifies prognostic and immunotherapeutically relevant gene signatures*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 11163.

128. Davis, A.A. and V.G. Patel, *The role of PD-L1 expression as a predictive biomarker: an analysis of all US Food and Drug Administration (FDA) approvals of immune checkpoint inhibitors*. J Immunother Cancer, 2019. **7**(1): p. 278.
129. Sharpe, A.H. and K.E. Pauken, *The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway*. Nat Rev Immunol, 2018. **18**(3): p. 153-167.
130. Wang, X., et al., *Tumor cell-intrinsic PD-1 receptor is a tumor suppressor and mediates resistance to PD-1 blockade therapy*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2020. **117**: p. 201921445.
131. Xiao, W., et al., *Loss of Fas Expression and Function Is Coupled with Colon Cancer Resistance to Immune Checkpoint Inhibitor Immunotherapy*. Mol Cancer Res, 2019. **17**(2): p. 420-430.
132. Zietz, C., et al., *Inverse relation of Fas-ligand and tumor-infiltrating lymphocytes in angiosarcoma: indications of apoptotic tumor counterattack*. Am J Pathol, 2001. **159**(3): p. 963-70.
133. Blok, E.J., et al., *Combined evaluation of the FAS cell surface death receptor and CD8+ tumor infiltrating lymphocytes as a prognostic biomarker in breast cancer*. Oncotarget, 2017. **8**(9): p. 15610-15620.
134. Linxweiler, M., et al., *The Immune Microenvironment and Neoantigen Landscape of Aggressive Salivary Gland Carcinomas Differ by Subtype*. Clin Cancer Res, 2020. **26**(12): p. 2859-2870.
135. Belulescu, I.C., et al., *Adenoid Cystic Carcinoma of Salivary Gland: A Ten-Year Single Institute Experience*. Curr Health Sci J, 2020. **46**(1): p. 56-65.
136. Schmitt, N.C., H. Kang, and A. Sharma, *Salivary duct carcinoma: An aggressive salivary gland malignancy with opportunities for targeted therapy*. Oral Oncol, 2017. **74**: p. 40-48.
137. Yajuk, O., et al., *The PD-L1/PD-1 Axis Blocks Neutrophil Cytotoxicity in Cancer*. Cells, 2021. **10**(6).
138. Furuse, M., et al., *PD-L1 and PD-L2 expression in the tumor microenvironment including peritumoral tissue in primary central nervous system lymphoma*. BMC Cancer, 2020. **20**(1): p. 277.
139. Heinhuis, K.M., et al., *Enhancing antitumor response by combining immune checkpoint inhibitors with chemotherapy in solid tumors*. Ann Oncol, 2019. **30**(2): p. 219-235.
140. Lamichhane, P., et al., *Novel Delivery Systems for Checkpoint Inhibitors*. Medicines (Basel), 2019. **6**(3).
141. Havel, J.J., D. Chowell, and T.A. Chan, *The evolving landscape of biomarkers for checkpoint inhibitor immunotherapy*. Nat Rev Cancer, 2019. **19**(3): p. 133-150.
142. Schnell, A., et al., *The Peripheral and Intratumoral Immune Cell Landscape in Cancer Patients: A Proxy for Tumor Biology and a Tool for Outcome Prediction*. Biomedicines, 2018. **6**(1).
143. Peter, M.E., et al., *The role of CD95 and CD95 ligand in cancer*. Cell Death Differ, 2015. **22**(5): p. 885-6.
144. Siegel, R.M., et al., *The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity*. Nat Immunol, 2000. **1**(6): p. 469-74.
145. Villa-Morales, M., et al., *FAS system deregulation in T-cell lymphoblastic lymphoma*. Cell Death Dis, 2014. **5**(3): p. e1110.
146. Tauzin, S., et al., *CD95-mediated cell signaling in cancer: mutations and post-translational modulations*. Cell Mol Life Sci, 2012. **69**(8): p. 1261-77.
147. Zhu, J., P.F. Petit, and B.J. Van den Eynde, *Apoptosis of tumor-infiltrating T lymphocytes: a new immune checkpoint mechanism*. Cancer Immunol Immunother, 2019. **68**(5): p. 835-847.
148. Bennett, M.W., et al., *The Fas counterattack in vivo: apoptotic depletion of tumor-infiltrating lymphocytes associated with Fas ligand expression by human esophageal carcinoma*. J Immunol, 1998. **160**(11): p. 5669-75.

149. Yamada, A., et al., *Dual Role of Fas/FasL-Mediated Signal in Peripheral Immune Tolerance*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 403.
150. Waring, P. and A. Mullbacher, *Cell death induced by the Fas/Fas ligand pathway and its role in pathology*. Immunol Cell Biol, 1999. **77**(4): p. 312-7.
151. Nagata, S., *Fas-induced apoptosis, and diseases caused by its abnormality*. Genes Cells, 1996. **1**(10): p. 873-9.
152. Tschumi, B.O., et al., *CART cells are prone to Fas- and DR5-mediated cell death*. J Immunother Cancer, 2018. **6**(1): p. 71.
153. Kuenzi, P., P. Schneider, and D.A. Dobbelaere, *Theileria parva-transformed T cells show enhanced resistance to Fas/Fas ligand-induced apoptosis*. J Immunol, 2003. **171**(3): p. 1224-31.
154. Yasukawa, M., et al., *Granule exocytosis, and not the fas/fas ligand system, is the main pathway of cytotoxicity mediated by alloantigen-specific CD4(+) as well as CD8(+) cytotoxic T lymphocytes in humans*. Blood, 2000. **95**(7): p. 2352-5.
155. Eveson, J.W.; Auclair, P.; Gnepp, D.R.; El-Naggar, A.K. Tumours of the salivary glands. In World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours; Barnes, L., Eveson, J.W., Reichart, P., Sidransky, D., Eds.; IARC Press: Lyon, France, 2005; pp. 209–281.