

**Univerzita Karlova**

**1. lékařská fakulta**

Autoreferát disertační práce



**UNIVERZITA KARLOVA**  
**1. lékařská fakulta**

**Patofyziologie nádorového mikroprostředí karcinomů slinných žláz**

**Autor**  
**Martin Kuchař**

**Praha 2023**

**Doktorské studijní programy v biomedicině**  
*Univerzita Karlova a Akademie věd České republiky*

Obor: Fyziologie a patofyziologie člověka

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Otomar Kittnar, CSc.

Školicí pracoviště: Klinika ORL a chirurgie hlavy a krku, 1. LF UK a FN v Motole

Školitel: MUDr. Jiří Skřivan, CSc.

|  |    |
|--|----|
| 1 ÚVOD .....   | 6  |
| 1A NÁDOROVÉ MIKROPROSTŘEDÍ .....   | 7  |
| 1B VÝZNAM TIICS PRO PROGNÓZU A TERAPII .....                                     | 7  |
| 1C IMUNOSUPRESIVNÍ NÁDOROVÉ MIKROPROSTŘEDÍ A MECHANISMY ÚNIKU NÁDOROVÉ BUŇKY ... | 8  |
| 1D DETAILNÍ MAPOVÁNÍ BUNĚK NÁDOROVÉHO MIKROPROSTŘEDÍ .....                       | 9  |
| 2 HYPOTÉZA.....  | 11 |
| 3 CÍLE PRÁCE.....  | 11 |
| 4 MATERIÁL A METODY.....   | 12 |
| 5 VÝSLEDKY.....  | 15 |
| 6 DISKUSE .....  | 29 |
| 7 ZÁVĚR .....  | 31 |
| 8 POUŽITÁ LITERATURA.....  | 33 |

## Abstrakt

Možnosti léčby karcinomů slinných žláz (SGC), obzvláště pokročilých, jsou omezené. Revoluci 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 v peritumorální tkáni. Provedli jsme imunohistochemickou analýzu exprese PD-1 a 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 ve středu a na periférii vzorků salivárních karcinomů. Diferenciální hodnocení centra nádoru a periférie 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 SCG. Exprese PD-L1 v periferních nádorových buňkách SGC vykazovaly významnou souvislost se závažností onemocnění. Naše zjištění ukazují, že periférie 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 interakce Fas-FasL na periférii nádorů SGC se 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 odolnosti vůči imunoterapii.

## Abstract

Treatment options for salivary gland carcinomas (SGCs), especially advanced ones, are limited. A revolution in the treatment of malignant tumors was brought about by immunotherapy, especially therapy with immune check-point inhibitors (ICI). The effect and response to ICI immunotherapy is largely controlled by the characteristics of immune cells in the tumor tissue and in the peritumoral tissue. We performed an immunohistochemical analysis of the expression of PD-1 and PD-L1 on the surface of tumor cells and tumor infiltrating immune cells (TIIC) in salivary carcinoma samples separately in their center and on their periphery. In addition to the above, a growing body of evidence suggests that resistance to ICI therapy is modulated by the interaction of Fas receptor (CD95) and Fas ligand (FasL, CD178) between tumor cells and immune cells. We therefore decided to investigate Fas-FasL expression and interaction between tumor cells and tumor-infiltrating immune cells in the center and periphery of salivary carcinoma samples. Differential evaluation of the tumor center and tumor periphery across different histological subtypes of SGC revealed the role of peripheral TIICs and tumor cells in understanding factors that determine disease severity. PD-1 expression in peripheral TIIC SGCs confirmed the potential of immune checkpoint inhibitor immunotherapy in SCG patients. PD-L1 expression in SGC peripheral tumor cells showed a significant association with disease severity. Our findings indicate that the periphery of SGC tumors could represent a suitable biomarker area for evaluating the severity of SGC and a suitable area for studying the mutual interactions between the tumor and the immune system. Furthermore, analysis of Fas receptor and Fas ligand expression show that Fas-FasL interaction at the periphery of SGC tumors offers a useful new predictor of disease severity and response to immunotherapy. The obtained data further indicate that salivary gland carcinoma cells are resistant to apoptosis triggered by the Fas ligand of immune cells, and in addition, in advanced tumors, they can use the Fas ligand to eliminate immune cells, thereby participating in the escape of the tumor's 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 diferenciaci 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 SGCs 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 stádiích onemocnění v jednotlivých nádorech. 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) [15]. 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, 16]. 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 [17, 18]. Spojení FasL s receptorem Fas slouží jako mechanismus indukující apoptózu, který používají jak CD8+ T buňky, tak buňky NK k eliminaci transformovaných neoplastických buněk [19]. Tento mechanismus však byl také úspěšně využit nádorovými buňkami a tumor infiltrujícími myeloidními supresorovými buňkami (MDSCs) k protiútoků na imunitní buňky infiltrující nádor (TIICs) [17]. 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.

## 1A NÁDOROVÉ MIKROPROSTŘEDÍ

Nádorové mikroprostředí je živým systémem, ve kterém spolu některé buňky vzájemně kooperují a jiné naopak vykonávají antagonistické funkce. 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]

## 1B TUMOR INFILTRUJÍCÍ IMUNITNÍ BUŇKY

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). Spektrum infiltrujících imunitních buněk spolu s fenotypickými vzory 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. [20] Mnoho studií se pokusilo popsat interakci nádorových buněk s imunitním systémem ex vivo hodnocením CD8<sup>+</sup> TIICs a korelací zjištění s histopatologickými charakteristikami nádoru. [21, 22] Pro tento přístup je nejběžnější detekční metodou imunohistochemická analýza buněčných subpopulací ve vzorku reprezentativní tkáně. [21] 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, kolorektálního karcinomu a hepatocelulárního karcinomu. [20]

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 nádorem infiltrovaných imunitních buněk 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. imunscore. [23]

Kromě toho nedávné zjištění, že nádorově produkováný Fas ligand z myeloidních supresorových buněk (MDSC myeloid-derived suppressor cells) indukuje apoptózu nádorově specifických CD8<sup>+</sup> 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. [17]

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. [24] 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. [25-27]

Umístění a imunitní profily buněk mohou významně ovlivnit prognózu pacientů a pomoci definovat pacienty, kteří pravděpodobně zareagují na terapie blokuující 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. [25, 26, 28-31]

## 1C 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 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. 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. [32]

## 1D DETAILNÍ MAPOVÁNÍ BUNĚK NÁDOROVÉHO MIKROPROSTŘEDÍ

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, exprese 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. [33]

Protein Fas byl poprvé identifikován pomocí monoklonální protilátky vytvořené imunizací myši buněčnou linií FS-7. Název Fas je tedy odvozen od označení povrchového antigenu spojeného s FS-7 – FS-7 associated surface antigen.[34]

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. [35]

Fakt, že smrt buňky je zprostředkována aktivací Fas receptoru Fas ligandem, dokazuje neutralizace FasL specifickou protilátkou anebo blokáce Fas receptoru. [19] Stav, kdy nádorové buňky získají rezistenci k Fas indukované apoptóze posune rovnováhu v nádorovém prostředí ve prospěch růstu tumoru. [36] Navíc mohou nádorové buňky zneužít tento mechanismus k eliminaci aktivovaných tumor infiltrujících lymfocytů. [17]

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. [37]

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. [38]

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.

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 dřene. Dále se nachází i na neuronech, keratinocytech, na buňkách pankreatu, plic, jater, endotelu. [39] PD-L1 se dále vyskytuje na mnoha typech nádorů, kdy je jeho zvýšená exprese asociována s nepříznivou prognózou a zvýšenou invazivitou. [40] Exprese je indukována transkripčním faktorem STAT3, hyperaktivací PI3K/Akt dráhy a hypoxií. [41] Zpětná signalizace přes PD-L1 slouží jako signál přežití. Redukuje cytotoxicitu zprostředkovanou IFN typu I, díky inhibici fosforylace proteinu STAT3. [42]

## 2 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.

## 3 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 a vzdálených metastáz.

## 4 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 tudiference moru byl stanoven podle histopatologického nálezu a s ohledem na rizikovou stratifikaci malignit slinných žláz stanovenou WHO [43][20].

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 [44]. 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 (%) |
|---|-------------------|--------------|
| <b>Gender</b>                                 |                   |              |
| Female  | 36                | 58.06%       |
| Male  | 26                | 42.94%       |
| <b>Histology</b>                              |                   |              |
| 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%        |
| <b>Grade</b>                                  |                   |              |
| Low (0)                                       | 22                | 35.48%       |
| High (1)                                      | 40                | 64.52%       |
| <b>Primary tumor stage</b>                    |                   |              |
| 1   | 15                | 24.19%       |
| 2   | 9                 | 14.55%       |
| 3   | 6                 | 9.68%        |
| 4   | 31                | 50.00%       |
| Not established                               | 1                 | 1.61%        |
| <b>Metastases</b>                             |                   |              |
| Yes (+)                                       | 19                | 30.65%       |
| No (-)  | 43                | 69.35%       |
| <b>Age</b>                                    |                   |              |
| ≥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).

Expres 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 rozšířená 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.[45]. 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 [46-48]. 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:  $TPS = (\text{počet buněk nádoru obarvených PD-1, PD-L1, Fas, FasL}) / (\text{celkový počet životaschopných nádorových buněk}) \times 100$ ;  $(\text{Počet obarvených PD-1, PD-L1, Fas, nebo FasL imunitních buněk infiltrujících nádor}) / (\text{celkový počet životaschopných imunitních buněk infiltrujících nádor}) \times 100$ . 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 [49-52]. 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

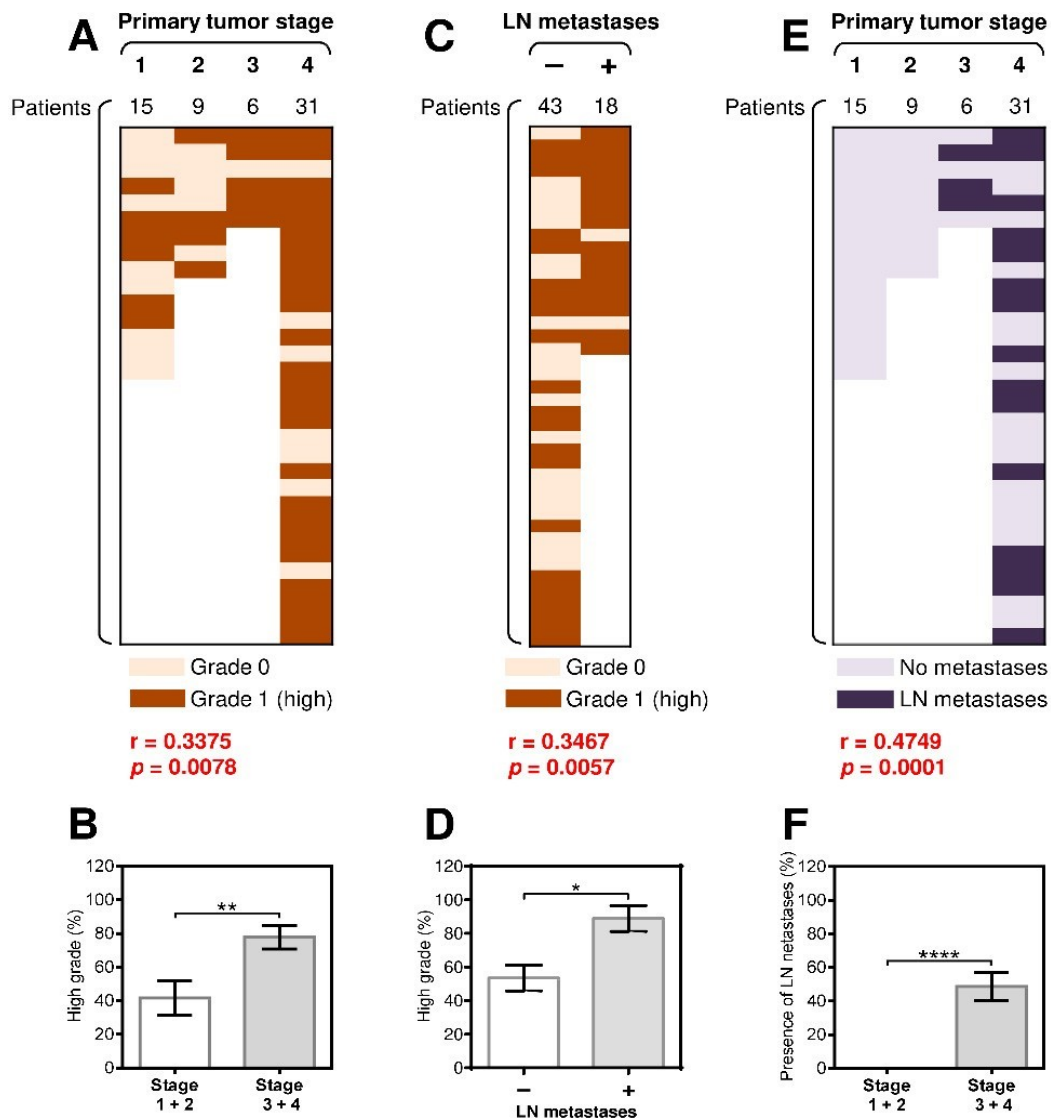
Data jsou prezentována jako průměr  $\pm$  standardní odchylka průměru (SEM), pokud není stanoveno jinak. Vztahy mezi dvěma studovanými proměnnými byly hodnoceny Spearmanovým korelačním koeficientem pořadí. Pro posouzení rozdílů byl proveden Mann-Whitney U test v PD-1 a PD-L1 vyjádření založené na různých 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).

## 5 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 [53, 54], 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.

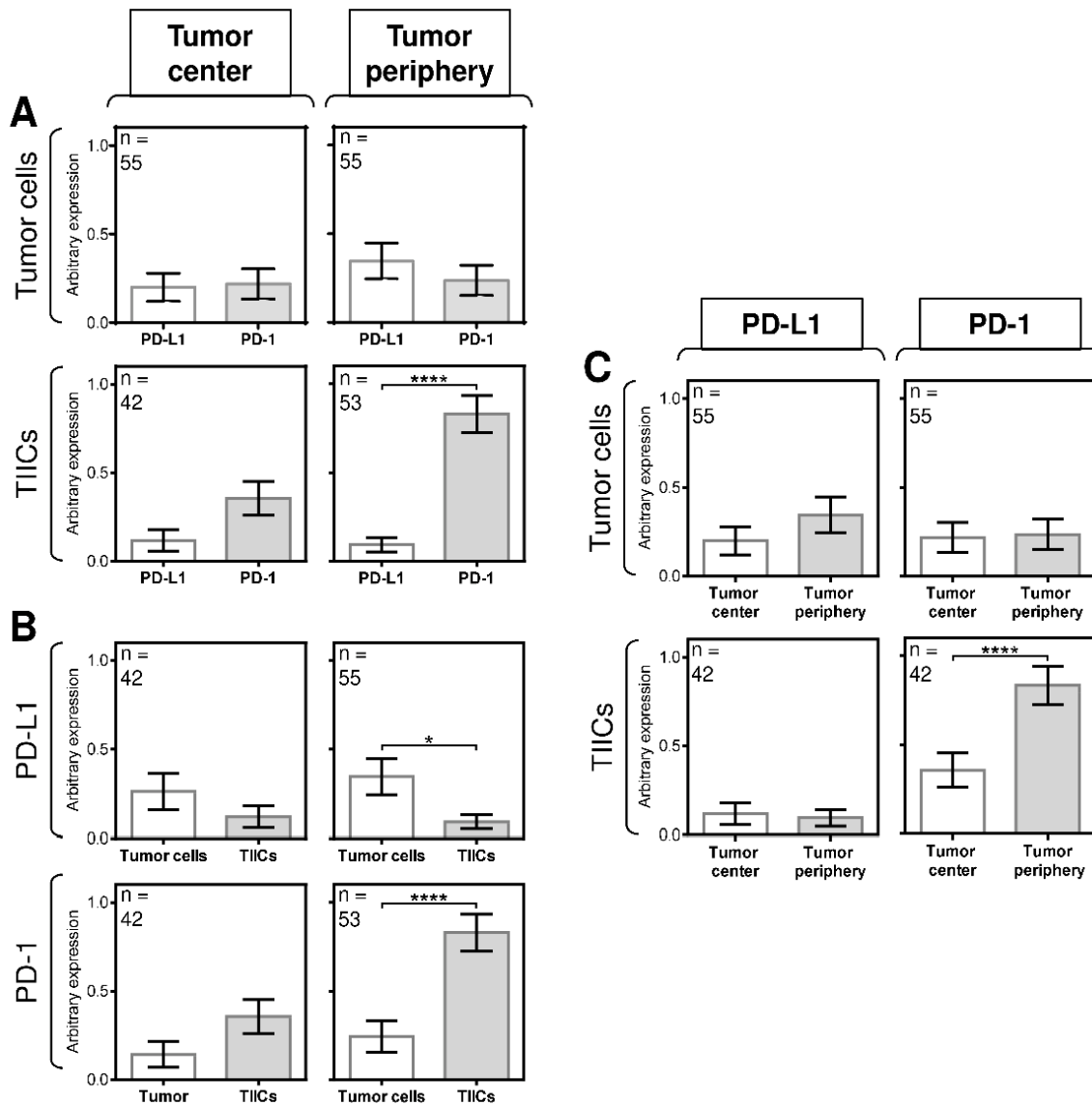


**Obrazek 1.** Přítomnost metastáz v regionálních lymfatických uzlinách (LN) významně koreluje s gradingem nádoru a stadiem nádoru. (A) Kohorta 61 pacientů s karcinomem slinných žláz (SGC) byla rozdělena do 4 skupin podle stadia nádoru a byla stanovena Spearmanova korelace s gradingem nádoru (stupeň 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 [16, 55-57]. Studie také ukázaly, že nádorem indukovaná imunosuprese může být v tkáni nádorů nerovnoměrně rozložena [25, 26]. Proto jsme zkoumali vzorce exprese PD-L1 a PD-1 v buňkách nádorů a TIICs jak v centru nádorů, tak na jejich periférii 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 2A, levé panely) nebo na periférii lokalizovaných buňkách nádorů (Obrázek 2A, horní pravý panel). Avšak exprese PD-1 byla významně vyšší než vyjádření PD-L1 v periferních TIICs (Obrázek 2A, 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 2B, horní levý panel), periferní část nádorů ukázala významně vyšší vyjádření molekuly v buňkách nádorů než v TIICs (Obrázek 2B, horní pravý panel). Podobně nebyl zjištěn žádný významný rozdíl ve vyjádření PD-1 mezi buňkami nádorů a TIICs v centru nádorů (Obrázek 2B, dolní levý panel). Nicméně, navzdory těmto indiciím, další analýzy neukázaly žádné významné rozdíly ve vyjádření PD-L1 mezi periférií nádorů a centrem nádorů (Obrázek 2C, levé panely), ani nebyl rozdíl ve vyjádření PD-1 mezi periférií nádorů a centrem nádorů (Obrázek 2C, pravý horní panel). Byl však zjištěn významný rozdíl v expresi PD-1 mezi TIICs na periférii nádorů a centrem nádorů (Obrázek 2C, dolní pravý panel). Tyto údaje ukazují, že rozdíly ve vyjádření PD-L1 a PD-1 u pacientů s SGC byly seskupené na periférii nádorů.



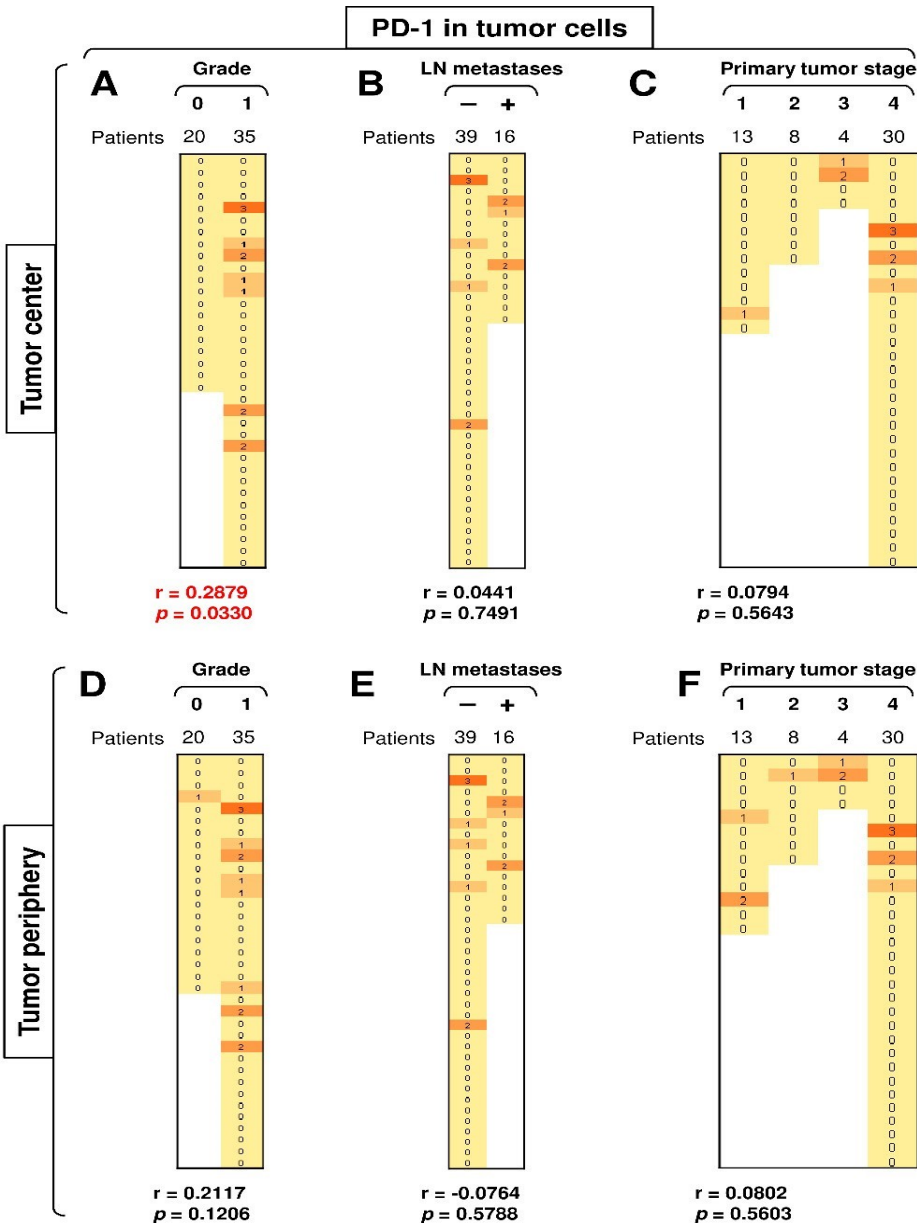
**Obrázek 2.** Rozdíly v expresi PD-L1 a PD-1 mezi nádorovými buňkami a TIICs jsou lokalizovány na periférii nádoru. (A) Expres PD-L1 a PD-1 se liší mezi nádorovými buňkami a TIICs v centru nádoru a na jeho periférii. Počet vyhodnocených pacientů (n) je uveden v levém horním rohu každého panelu. (B) 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 popsáném 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 [58]. Tyto molekuly jsou také důležitými biomarkery pro užití ICI imunoterapie [7, 14, 16]. 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 nálezkoreluje 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 nebo dokonce v ještě významněji exprimovaném PD-1 v periferních TIICs. 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 [59]. Avšak, PD-1 může být také vyjádřeno v nádorových buňkách [60]. Naše analýza ukázala, že část nádorů pacientů s SGC exprimovalo tuto molekulu jak v centrálních, tak v periferních nádorových buňkách (Obrázek 3). Těžkost onemocnění (stupeň diferenciacenádoru, primární stádium nádoru a přítomnost LN metastáz) neměla významnou vazbu na expresi této molekuly v periferních nádorových buňkách (Obrázek 3D-F), stejně tak přítomnost LN metastáz nebo primární stádium nádoru neovlivnilo její expresi v centrálních nádorových buňkách (Obrázek 3B-C). Avšak stupeň diferenciacenádoru 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 3A). Tyto zjištění ukazují, že procento PD-1+ nádorových buněk v centru nádoru by mohlo sloužit jako biomarker biologického chování nádoru.



**Obrázek 3.** 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.

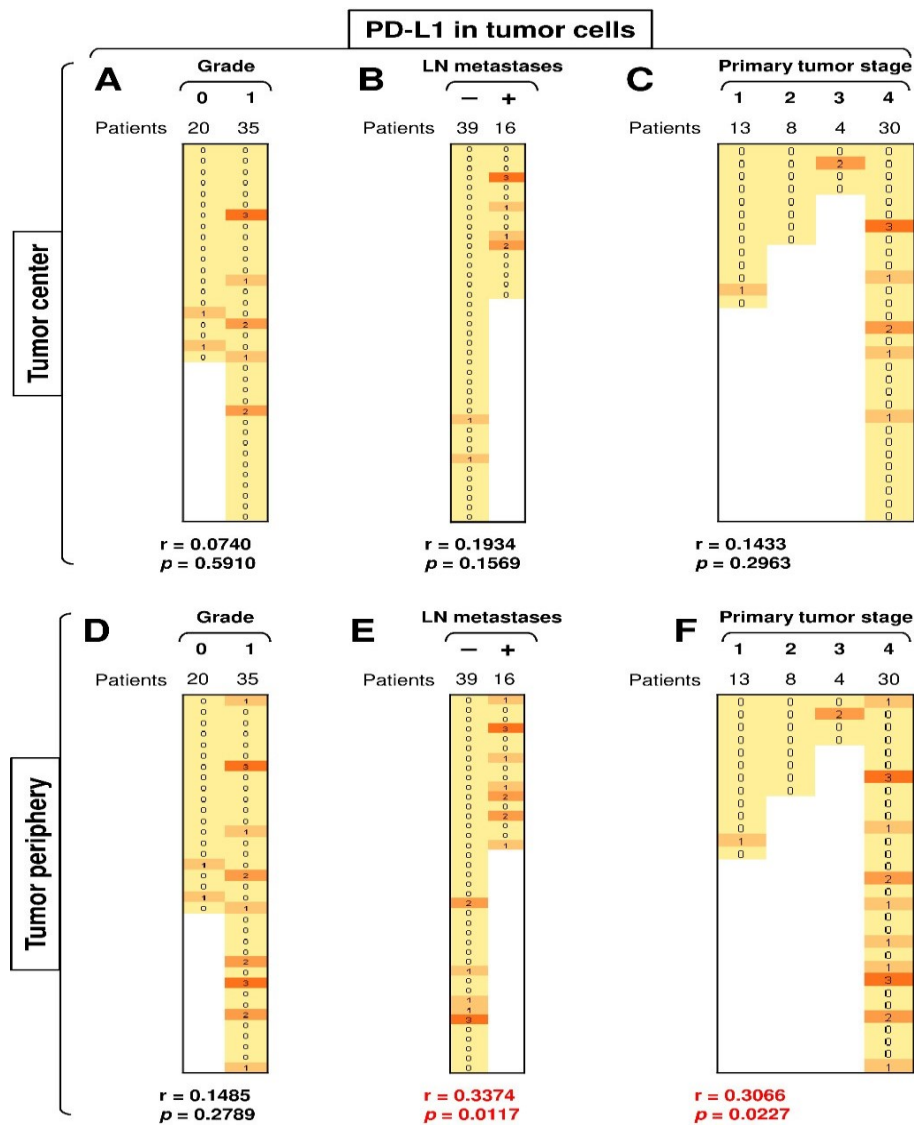
## 8e Přítomnost metastáz LN a stádium nádoru významně koreluje s PD-L1 expresí v buňkách na periférii nádoru

Expresí PD-L1 v buňkách periferního nádoru měla tendenci být vyšší než v centrální nádorových buňkách (obrázek 4C, horní levý panel;  $p = 0,0625$ ). Dále jsme data stratifikovali podle závažnosti onemocnění (stupeň diferenciací nádoru, stádium primárního nádoru a přítomnost LN metastázy) a odhalili, že závažnost onemocnění nekoreluje s expresí PD-L1 v centru nádoru (obr. 4A–C), stejně tak stupeň nádoru významně neovlivňoval významně expresí PD-L1 v periferních nádorových buňkách (obr. 4D). Přítomnost metastáz LN a stádium nádoru však významně korelovalo s expresí PD-L1 v buňkách periferie nádoru (obrázek 4E–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 sdružená na periférii nádoru.

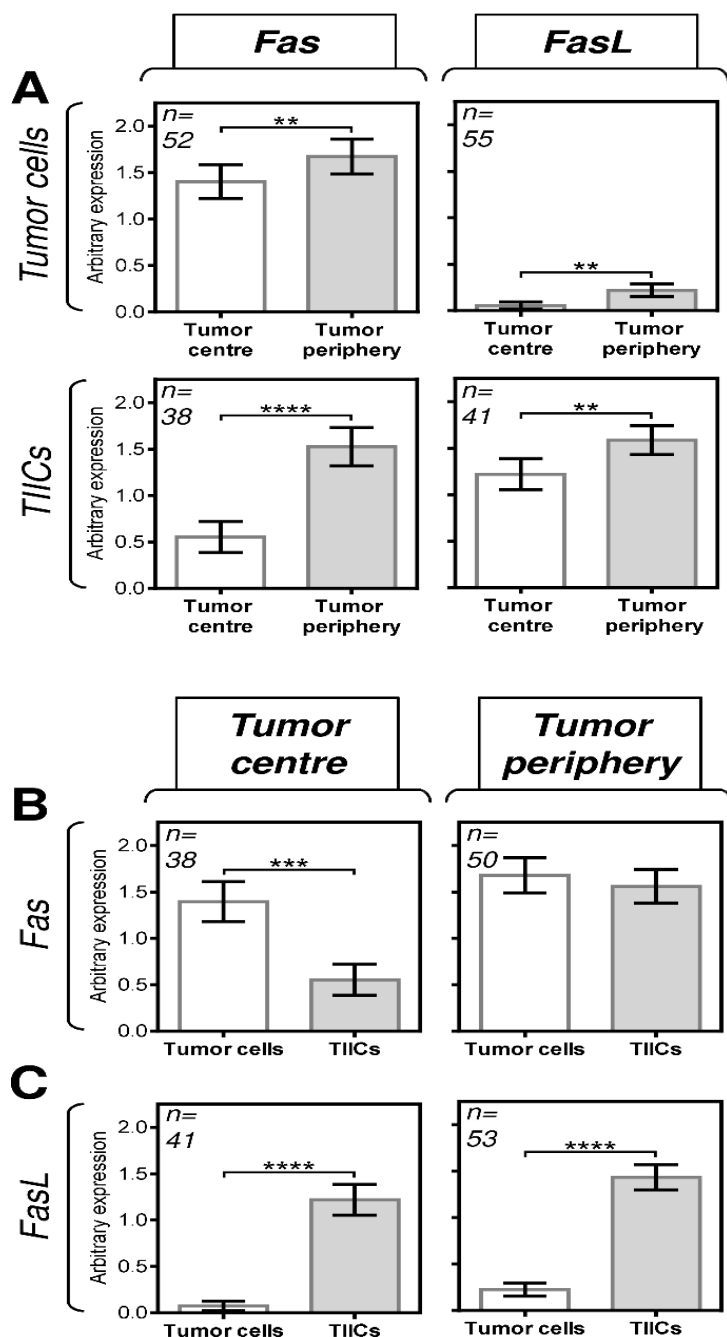
## 8f Rozdíly mezi vyjádřením Fas a FasL u nádorových buněk a TIICs jsou lokalizovány v centru nádorů

Analyzovali jsme 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. 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 5A). 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 5B, pravý panel), ale různé úrovně exprese v centru nádoru (obrázek 5B, 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 5C).



**Obrázek 4.** 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.



**Obrázek 5.** Expres Fas a FasL v nádorových buňkách a TIICs na periferii a v centru nádoru. (A) Expres (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) Expres Fas v nádorových buňkách je vyšší než v TIICs ve středu nádoru, ale srovnatelná na periferii nádoru. (C) Expres 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).

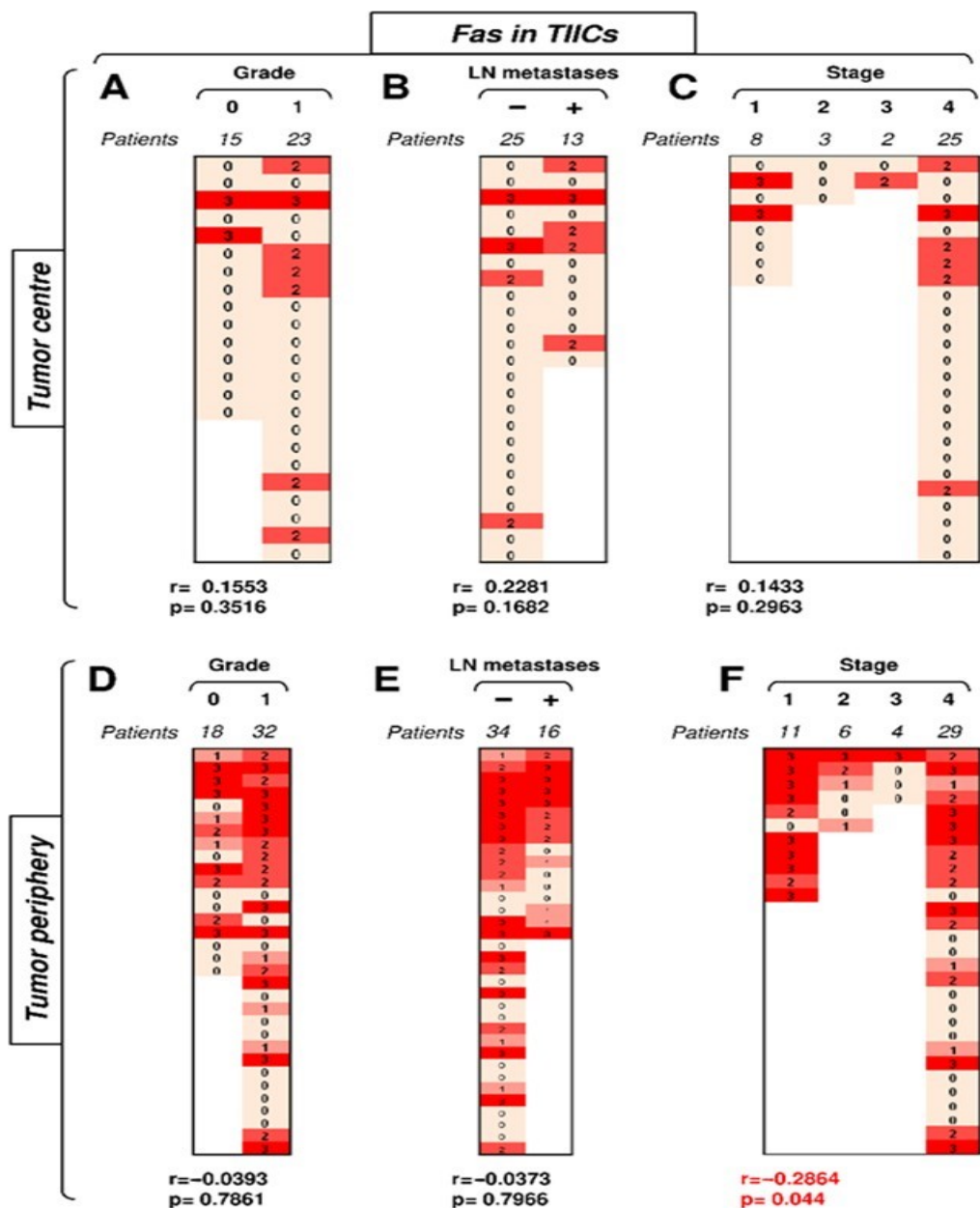
## 8g Expresie Fas v TIIC negativně koreluje se stádiem nádoru na periférii nádoru

Interakce Fas-FasL byla dříve spojována se závažností onemocnění a naznačovala možné mechanismy odolnosti nádorů vůči imunitnímu systému [17, 18, 61-63]. 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 diferenciací: nádory nízkého stupně dediferenciací (stupeň 0), nebo nádory vysokého stupně dediferenciací (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 6). V centru nádorů výskyt Fas v TIICs nekoreloval s žádným z testovaných klinicko-patologických parametrů (Obrázek 6A-C). Nebyly nalezeny žádné korelace mezi výskytem Fas v TIICs v periferní části nádoru a stupněm nádoru nebo přítomností metastáz (obrázek 6D, E). Avšak v periferní části nádoru bylo zjištěno, že stadium nádoru negativně koreluje s výskytem Fas v TIICs (obrázek 6F). Tyto údaje ukazují, že stadium onemocnění je nepřímě úměrné výskytu Fas v TIICs v periferní části nádorů, ale ne v jejich středu.

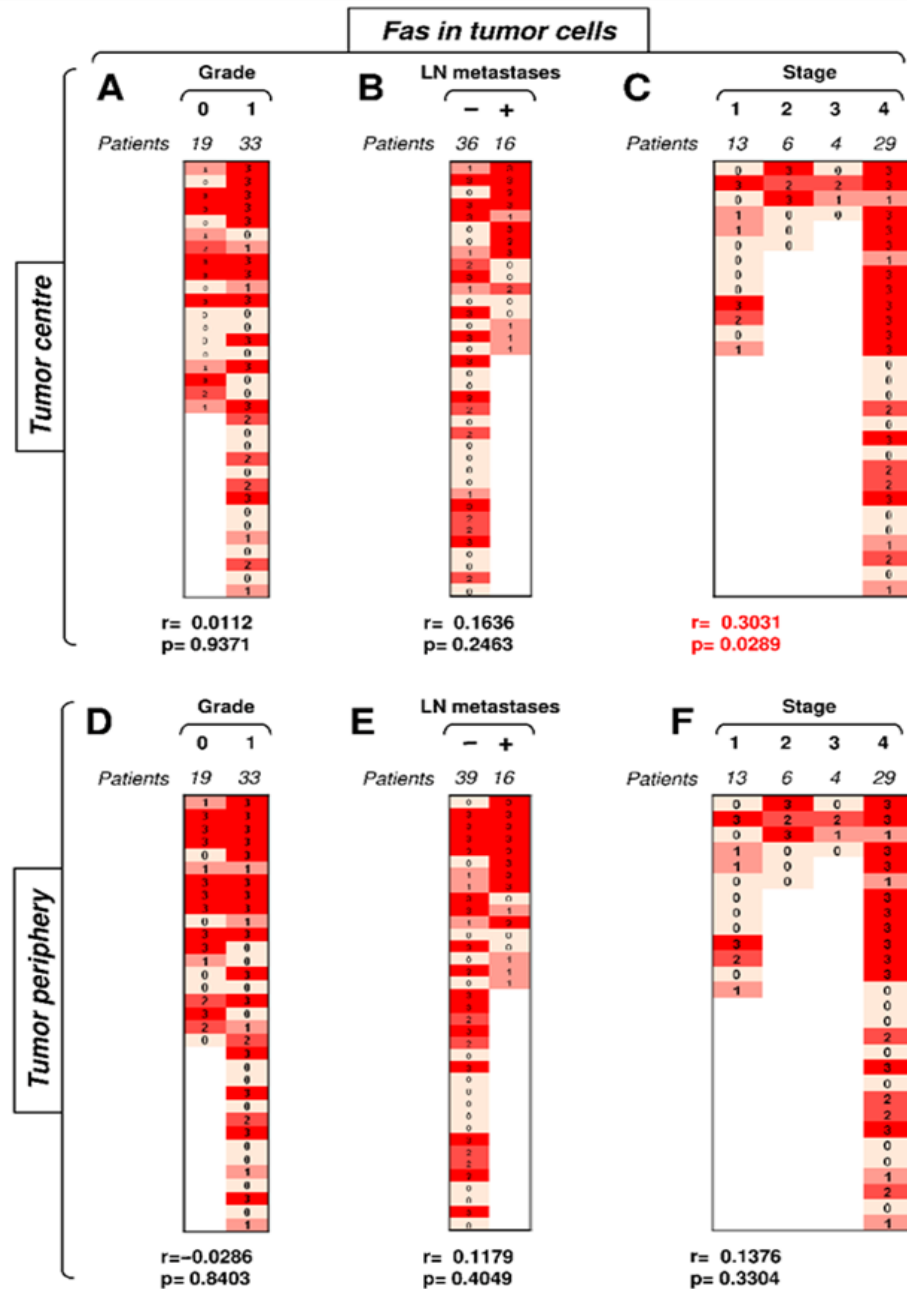
## 8h Expresie Fas v nádorových buňkách pozitivně koreluje se stádiem nádoru v nádorovém centru

Dále jsme analyzovali, zda expresie Fas v nádorových buňkách koreluje se závažností onemocnění. Frekvence a intenzita expresie Fas v buňkách nádoru byly v studovaných oblastech nádoru vysoké (obrázek 7). Kompartmentová analýza neodhalila korelaci expresie Fas v buňkách nádoru na periférii vzorků (obrázek 7D-F). Stupeň malignity a přítomnost metastáz LN nekorelovaly s expresí Fas v buňkách nádoru v centru nádoru (obrázek 7A, 7B). Nicméně stadium nádoru ukázalo korelaci s expresí FAS v buňkách nádoru v centru nádoru (obrázek 7C). Tyto údaje ukazují, že na rozdíl od zjištění u TIIC, stadium onemocnění pozitivně koreluje s expresí FAs v nádorových buňkách v centru nádoru, ale ne na periférii nádorů.





**Obrázek 6.** Expresie Fas v TIICs v periférii 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 periférii nádoru.



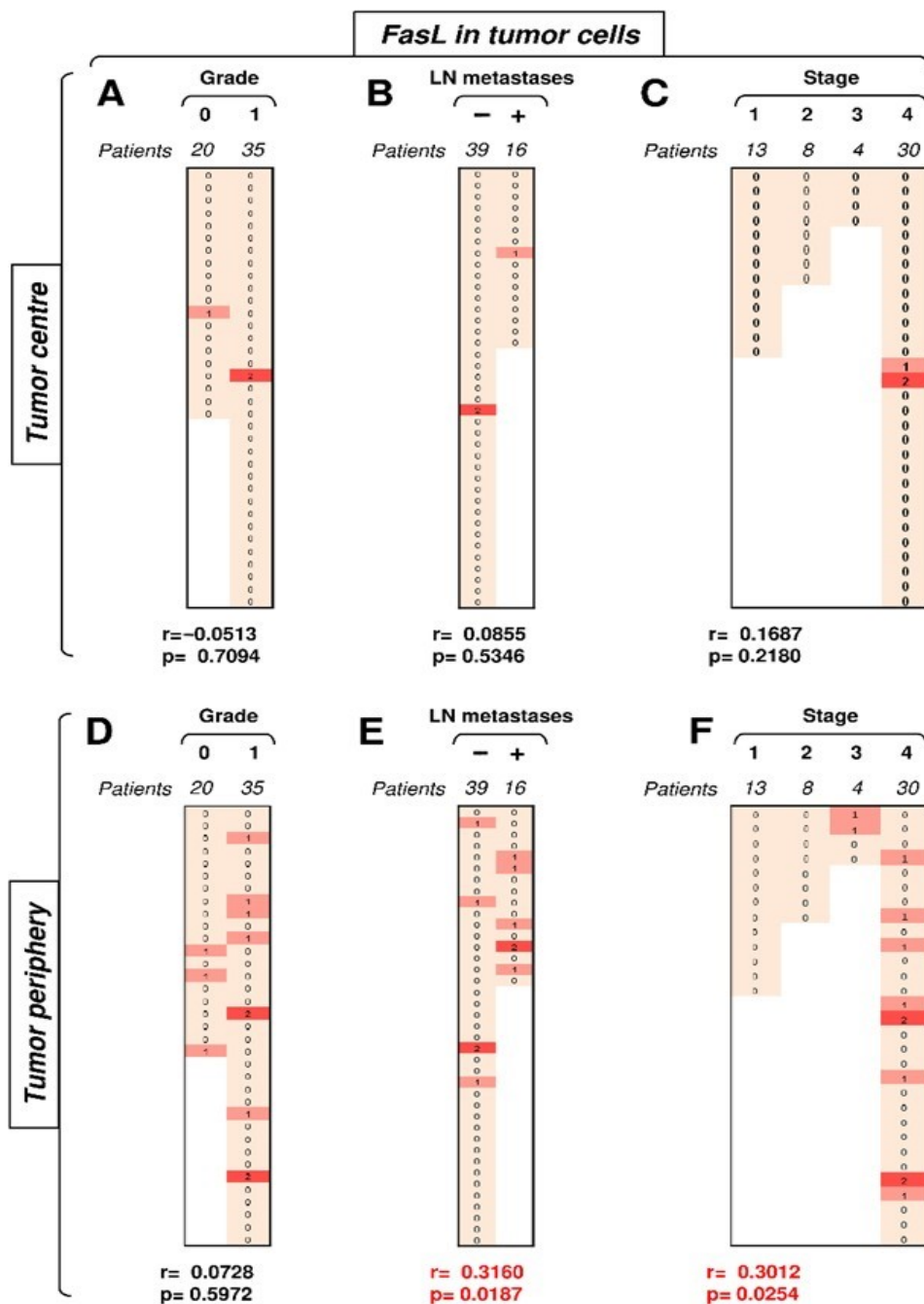
**Obrázek 7.** Expres Fas v nádorových buňkách ve středu nádoru koreluje se stádiem nádoru. (A) Skupina 52 pacientů s SGC byla rozdělena do 2 skupin podle stupně diferenciace nádoru (stupeň 0 a stupeň 1) a byla určena Spearmanova korelace ( $r$ ) podle exprese Fas v nádorových buňkách ve středu nádoru. 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 periférii 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. Bez ohledu na kompartmentální distribuci, stupeň malignity, přítomnost metastáz LN a stádium nádoru nekorelovaly s výskytem faktoru FasL v TIICs. Proto na rozdíl od faktoru Fas, exprese FasL v TIICs neodrážel tíží onemocnění.

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

Data ukázala, že exprese 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 8A-C). Na druhou stranu, výskyt faktoru FasL v buňkách nádoru na periférii nádoru byl častější než v centru nádoru (obrázek 8D-F). A co je důležité, výskyt faktoru FasL v tomto oddílu nádoru souvisel se závažností onemocnění. Zatímco stupeň malignity ukázal jen tendenci (obrázek 8D,  $p = 0.0728$ ), přítomnost metastáz LN nebo stádium nádoru už významně korelovalo s expresí FasL v buňkách nádoru na periférii nádoru (obrázek 8E-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 8F). Tyto údaje ukazují, že buňky nádorů vysokého stupně mohou mobilizovat mechanismus zabíjení Fas-FasL v periférii SGCs.



**Obrazek 8.** Expresie 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.

## 6 DISKUSE

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 [25, 58, 59]. U některých nádorů jsou vysoké hladiny TIICs spojené s příznivou prognózou [22], zatímco u jiných nádorů jsou spojené s špatnou prognózou [22, 24]. Podobné výsledky byly reportovány i v souvislosti s jejich vztahem k odolnosti/citlivosti nádoru na imunoterapii [24]. 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 [64], ale oba patří k nejvíce terapeuticky náročným podtypům SGC [65, 66]. 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 [60]. 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 [60], a buňky nádoru, které exprimují PD-1, blokují cytotoxicitu neutrofilů v nádorové tkáni [67]. 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 [68]. Tato lokální buňkami zprostředkovaná suprese může hrát roli na periférii nádoru v blokování infiltrace nádoru imunitními buňkami cílícími na nádor [25, 26]. 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 [69, 70]. Navíc bylo také prokázáno, že peritumorální aplikace ICI je spojena s lepším přežitím u určitých typů malignit [71]. V souladu s těmito

studiemi naše výsledky také naznačují, že exprese PD-L1 v periferních TIICs pokročilých SGCs by mohla predikovat účinnost léčby ICI [72]. 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 [25, 58]. Byly snahy o hodnocení nejen intra-tumorálních buněčných signatur, ale také vzorců rozmístění, které přesahují samotné nádory [25, 29, 31, 58]. Existuje však také stále více pokusů o hodnocení signatur v jednotlivých lokalitách samotných nádorů [73]. 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 [27, 31], 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 [74] Na druhou stranu ovšem může být tento mechanismus zneužit buňkami nádoru k eliminaci aktivovaných TIICs a zároveň tak zvýšit odolnosti nádoru vůči imunoterapii [17]. 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 [75]. V buňkách nádoru se to však nemusí vždy dít, protože buňky nádoru mohou ztratit sensitivitu k FasL-indukované apoptóze [36, 61, 76, 77]. 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[36, 61, 77], likvidace TIIC prostřednictvím buněk nádorů pomocí FasL může současně efektivně probíhat. [78, 79].

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 vyčerpávat 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 [75, 80-82]. Navíc, apoptóza indukovaná FasL je klíčová pro eliminaci autoreaktivních lymfocytů za fyziologických podmínek a často je zneužívána nádory ke zvýšení jejich imunorezistence [78]. 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. [64] 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 [83, 84] a imunitní buňky s cytotoxicitou takovou, jejíž mechanismus účinku nevyužívá apoptózu indukovanou FasL[85].

## 7 ZÁVĚR

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 bariéra 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 diferenciaci nádoru, zastoupení buněk imunitního systému exprimujících Fas receptor na periférii nádorů SGC se snižuje s rostoucím stupněm diferenciaci nádoru a exprese FasL v nádorových buňkách SGC na periférii nádoru koreluje s gradíngem 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.



## 8 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. 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).
16. 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.
17. Zhu, J., et al., *Resistance to cancer immunotherapy mediated by apoptosis of tumor-infiltrating lymphocytes*. Nat Commun, 2017. **8**(1): p. 1404.
18. 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.
19. Peter, M.E., et al., *The role of CD95 and CD95 ligand in cancer*. Cell Death Differ, 2015. **22**(4): p. 549-59.
20. 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.
21. Robins, H.S., et al., *Digital genomic quantification of tumor-infiltrating lymphocytes*. Sci Transl Med, 2013. **5**(214): p. 214ra169.
22. 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.

23. 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.
24. 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 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.
25. Fridman, W.H., et al., *The immune contexture in cancer prognosis and treatment*. Nat Rev Clin Oncol, 2017. **14**(12): p. 717-734.
26. 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.
27. 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.
28. 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).
29. 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.
30. Sorbye, S.W., et al., *Prognostic impact of peritumoral lymphocyte infiltration in soft tissue sarcomas*. BMC Clin Pathol, 2012. **12**: p. 5.
31. 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.
32. Vinay, D.S., et al., *Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies*. Semin Cancer Biol, 2015. **35 Suppl**: p. S185-S198.
33. 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.
34. Nagata, S., *Early work on the function of CD95, an interview with Shige Nagata*. Cell Death Differ, 2004. **11 Suppl 1**: p. S23-7.
35. Wajant, H., *The Fas signaling pathway: more than a paradigm*. Science, 2002. **296**(5573): p. 1635-6.
36. Sordo-Bahamonde, C., et al., *Mechanisms of Apoptosis Resistance to NK Cell-Mediated Cytotoxicity in Cancer*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(10).
37. Syn, N.L., et al., *De-novo and acquired resistance to immune checkpoint targeting*. Lancet Oncol, 2017. **18**(12): p. e731-e741.
38. 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.
39. Keir, M.E., et al., *PD-1 and its ligands in tolerance and immunity*. Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 677-704.
40. 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.
41. 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.
42. Gato-Canas, M., et al., *PDL1 Signals through Conserved Sequence Motifs to Overcome Interferon-Mediated Cytotoxicity*. Cell Rep, 2017. **20**(8): p. 1818-1829.

43. 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.
44. 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.
45. 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.
46. 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.
47. 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.
48. 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.
49. 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.
50. 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.
51. 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.
52. 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.
53. 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.
54. 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.
55. 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.
56. Kim, S., et al., *The tumor immune microenvironmental analysis of 2,033 transcriptomes across 7 cancer types*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 9536.
57. 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.
58. 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.
59. Sharpe, A.H. and K.E. Pauken, *The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway*. Nat Rev Immunol, 2018. **18**(3): p. 153-167.
60. 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.
61. 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.
62. 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.
63. 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.

64. 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.
65. 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.
66. 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.
67. Yajuk, O., et al., *The PD-L1/PD-1 Axis Blocks Neutrophil Cytotoxicity in Cancer*. Cells, 2021. **10**(6).
68. 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.
69. 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.
70. 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.
71. Lamichhane, P., et al., *Novel Delivery Systems for Checkpoint Inhibitors*. Medicines (Basel), 2019. **6**(3).
72. 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.
73. 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).
74. Peter, M.E., et al., *The role of CD95 and CD95 ligand in cancer*. Cell Death Differ, 2015. **22**(5): p. 885-6.
75. 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.
76. Villa-Morales, M., et al., *FAS system deregulation in T-cell lymphoblastic lymphoma*. Cell Death Dis, 2014. **5**(3): p. e1110.
77. 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.
78. 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.
79. 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.
80. Yamada, A., et al., *Dual Role of Fas/FasL-Mediated Signal in Peripheral Immune Tolerance*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 403.
81. 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.
82. Nagata, S., *Fas-induced apoptosis, and diseases caused by its abnormality*. Genes Cells, 1996. **1**(10): p. 873-9.
83. Tschumi, B.O., et al., *CART cells are prone to Fas- and DR5-mediated cell death*. J Immunother Cancer, 2018. **6**(1): p. 71.
84. 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.
85. 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.

### **Publikace doktoranda ve vztahu k disertační práci:**

The Periphery of Salivary Gland Carcinoma Tumors Reveals a PD-L1/PD-1 Biomarker Niche for the Evaluation of Disease Severity and Tumor-Immune System Interplay.

**Kuchar M**, Strizova Z, Capkova L, Komarc M, Skrivan J, Bartunkova J, Smrz D, Plzak J. *Biomedicines*. 2021 Jan 20;9(2):97. doi: 10.3390/biomedicines9020097. PMID: 33498270; PMCID: PMC7909271.

**IF 4,7** Q2 Medicine, Research & Experimental

Fas-Fas Ligand Interplay in the Periphery of Salivary Gland Carcinomas as a New Checkpoint Predictor for Disease Severity and Immunotherapy Response.

Strizova Z, **Kuchar M**, Capkova L, Komarc M, Skrivan J, Bartunkova J, Plzak J, Smrz D. *Biomedicines*. 2021 Apr 8;9(4):402. doi: 10.3390/biomedicines9040402. PMID: 33917866; PMCID: PMC8068215.

**IF 4,7** Q2 Medicine, Research & Experimental

The expression profiles of CD47 in the tumor microenvironment of salivary gland cancers: a next step in histology-driven immunotherapy.

Votava M, Bartolini R, Capkova L, Smetanova J, Jiri V Jr, **Kuchar M**, Kalfert D, Plzak J, Bartunkova J, Strizova Z. *BMC Cancer*. 2022 Sep 28;22(1):1021. doi: 10.1186/s12885-022-10114-4. PMID: 36171566; PMCID: PMC9520840.

**IF 3,8** Q2 Oncology

### **Publikace doktoranda bez vztahu k disertační práci:**

S IF:

Regulatory T cells and their prognostic value for patients with Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck.

Boucek J, Mrkvan T, Chovanec M, **Kuchar M**, Betka J, Boucek V, Hladikova M, Betka J, Eckschlager T, Rihova B.

*J Cell Mol Med*. 2009 Jan 14. IF 4,608

Immediate revision in patients with bilateral recurrent laryngeal nerve palsy after thyroid and parathyroid surgery. How worthy is it?

Zábrodský M, Bouček J, Kastner J, **Kuchař M**, Chovanec M, Betka J. *Acta Otorhinolaryngol Ital*. 2012 Aug;32(4):222-8. PMID: 23093811; PMCID: PMC3468930. IF 0,427

A new strategy for the surgical management of RLN infiltrated by well-differentiated thyroid carcinoma.

Boucek J, Zabrodsky M, **Kuchar M**, Fanta O, Skrivan J, Betka J. *Biomed Res Int*.

2014;2014:616521. doi: 10.1155/2014/616521. Epub 2014 May 14. PMID: 24955363; PMCID: PMC4052845. IF 2,88

The role of fine-needle aspiration biopsy (FNAB) in Warthin tumour diagnosis and management.

Jechova A, **Kuchar M**, Novak S, Koucky V, Dostalova L, Zabrodsky M, Kalfert D, Plzak J. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2019 Oct;276(10):2941-2946. doi: 10.1007/s00405-019-05566-7. Epub 2019 Jul 18. PMID: 31321502 IF 1,75

The role of fine-needle aspiration biopsy (FNAB) in the diagnostic management of parotid gland masses with emphasis on potential pitfalls.

Dostalova L, Kalfert D, Jechova A, Koucky V, Novak S, **Kuchar M**, Zabrodsky M, Novakova Kodetova D, Ludvikova M, Kholova I, Plzak J. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2020 Feb 27. doi: 10.1007/s00405-020-05868-1. [Epub ahead of print] PMID: 32107613 IF 1,8

Experience with follow-up strategy in selected patients with Warthin tumour diagnosed by ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy (FNAB).

Fíková A, **Kuchař M**, Kalfert D, Dostálová L, Balko J, Zábrodský M, Plzák J. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2022 Apr;279(4):2049-2055. doi: 10.1007/s00405-021-06959-3. Epub 2021 Jul 1. PMID: 34212241. IF 2,5

Utility of fine-needle aspiration biopsy (FNAB) in parotid pleomorphic adenoma diagnosis and management.

Fikova A, Novak S, Kalfert D, **Kuchar M**, Zabrodsky M, Dostalova L, Balko J, Plzak J. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2023 Jul 10. doi: 10.5507/bp.2023.027. Epub ahead of print. PMID: 37431621. IF 1,6

Bez IF:

Krátkodobé a dlouhodobé funkční výsledky stapedoplastik  
Skřivan J., Betka J., **Kuchař M.**, Hroboň M.  
Otorinolaryng. a Foniat. /Prague/, 54, 2005, č. 2, s. 87–90.

Magnetic Resonance Imaging of the Rat Brain after Epileptic Seizures—Preliminary Results  
**Kuchař M.**, Jeřábková P., Brada J., Kašpar J., Skřivan J., Betka J., Langmeier M.  
Prague Medical Report / Vol. 107 (2006) No. 2, p. 242–250