

**Univerzita Karlova**  
**Lékařská fakulta v Plzni**  
**Stomatologická klinika**



**Doktorská disertační práce**

**Pavel Andrlé**

**Klinicko – patologická korelace imunohistochemické a  
molekulární klasifikace salivárního duktálního  
karcinomu**

**Plzeň 2019**

**Obor: Patologie**

**Školitelka: Prof. MUDr. Alena Skálová, CSc.**

# Obsah

Abstrakt	3
Seznam zkratek	5
Poděkování	8
Prohlášení	9
1. Zhoubné nádory slinných žláz – úvod do problematiky	
1.1. Incidence, etiologie – rizikové faktory	10
1.2. Anatomie a histomorfologie slinných žláz	11
1.3. Morfologické dělení nádorů slinných žláz – WHO klasifikace 2017	12
1.4. Staging salivárních maligních nádorů – TNM klasifikace	14
1.5. Grading salivárních karcinomů	15
1.6. Klinická diagnostika – anamnéza, zobrazovací metody, biopsie	17
1.7. Patomorfologie, imunohistochemie, molekulární diagnostika salivárních karcinomů	22
1.8. Léčba karcinomů slinných žláz	26
1.8.1. Chirurgická léčba	26
1.8.2. Onkologická léčba	35
1.9. Prognostické faktory – klinické, histomorfologické, molekulární	37
2. Cíl disertační práce	37
3. Materiály a metodika řešení výzkumu	38
4. Výsledky	44
5. Diskuze, závěr	57
6. Přílohy	62
7. Použitá literatura	65

## Abstrakt

Dizertační práce je zaměřena na korelaci imunohistochemických, molekulárně genetických a klinických parametrů u salivárních duktálních karcinomů slinných žláz. Soubor obsahuje klinická data a výsledky vyšetření 26 pacientů, kteří byli diagnostikováni a léčeni od roku 1987 do roku 2018 ve Fakultní nemocnici v Plzni.

**Klinické výsledky:** Soubor pacientů obsahoval 22 mužů a 4 ženy s věkovým rozpětím 24 – 95 let. Průměrný věk pacientů byl 66 let a median 64 let. U 54 % pacientů bylo diagnostikováno již IV. stadium nádorové choroby. V 54% případech byly zjištěny pozitivní lokoregionální uzliny a 58% pacientů mělo primární nádor T3 nebo T4. Pouze 33% pacientů přežilo více jak 5 let.

**Výsledky imunohistochemické a molekulární analýzy:** Na základě imunoprofilu byly SDC klasifikovány do 5 kategorií (apokrinní typ A (AR+/HER2-/MIB1 nízký) a B (AR+/HER2-/MIB1 vysoký), apokrinní typ s HER2 expresí (AR+/HER2+), HER2 pozitivní variant (AR-/HER2+), a dvojitě negativní typ (AR-/HER2-). V 10 případech byly SDC analyzovány metodou masivního paralelního sekvenování (NGS) za použití Fusion Plex Solid Tumor a Comprehensive Thyroid and Lung kitů (ArcherDX). Patogenní mutace byly nalezeny v 5 případech SDC (*HRAS*: c.182A>G p.Gln61Arg, 2x *HRAS*: c.37G>C p.Gly13Arg, *AKT1*: c.49G>A p.Glu17Lys, *PTEN* c.1003C>T p.Arg335Ter). Homozygotní delece lokusu 9p21 (*CDKN2A*) byla detekována v 1 případě SDC se současnou mutací v *HRAS* genu. V dalším SDC nesoucím mutaci genu *PTEN* byla nalezena amplifikace genu *MDM2*.

**Závěry:** V práci jsme ukázali negativní prognostický význam exprese biomarkerů AR a GATA3. SDC se zvýšenou expresí HER2-neu byly rovněž v našem souboru asociovány s kratším přežitím pacientů. Biologické cílená léčba anti HER2 a AR má na základě výsledků naší studie své opodstatnění v terapii SDC. Práce rovněž potvrdila nezastupitelnost primární léčby, kterou je radikální chirurgická resekce a radioterapie.

## Summary

This thesis is focused on the correlation of immunohistochemical, molecular genetic, and clinical features of salivary duct carcinomas. Clinicopathological and follow-up information of 26 patients originally diagnosed as SDC who were treated at Faculty Hospital in Plzeň from 1987 to 2018, were collected.

**Clinical findings:** The patient group comprised 22 males and 4 females, aged between 24-95 years with a mean age at diagnosis of 66 years and median of 64 years. At stage IV, 54% of patients were diagnosed at cervical metastasis and 58% had tumor T3 or T4. The five-year survival rate was 33%.

**Immunohistochemical and molecular findings:** After analysis of immunohistochemical results, the SDC cases were classified according to the revised classification into five subtypes (Apocrine A (AR+/HER2-/MIB1-low); Apocrine B (AR+/HER2-/MIB1-high); Apocrine HER2 (AR+/HER2+); HER2-enriched (AR-/HER2+); and double negative (AR-/HER2-). Apocrine HER2 and HER2-enriched subtypes were significantly associated with lower OS ( $p < 0.05$ ). NGS analysis revealed one case harboring an *ETV6-NTRK3* fusion, therefore it was reclassified as a high-grade secretory carcinoma. Five likely pathogenic mutations were detected in 5 SDC cases (*HRAS*: c.182A>G p.Gln61Arg, 2x *HRAS*: c.37G>C p.Gly13Arg, *AKT1*: c.49G>A p.Glu17Lys, *PTEN* c.1003C>T p.Arg335Ter). Homozygous deletion of locus 9p21 (*CDKN2A*) was detected in one case harboring a *HRAS* mutation. *MDM2* was amplified in one case harboring a *PTEN* mutation.

**Conclusion:** Herein we demonstrated that AR and GATA3 are potential biomarkers of poor outcome in SDC. Also, SDC apocrine HER2 and HER2-enriched subtypes were related to decreased survival, which indicates that the revised classification system might be a useful predictor of prognosis for some subtypes of SDC. Furthermore, NGS analysis in a small subset of SDC cases revealed mutations in *HRAS*, *AKT1* and *PTEN* genes in five cases. The significance of radical surgical therapy associated with radiotherapy has been confirmed.

### **Seznam používaných zkratk:**

**ACC** – *acinic cell carcinoma*, acinický karcinom

**AdCC** - *adenoid cystic carcinoma*, adenoidně cystický karcinom

**AR** – androgenní receptor

**AWD** – *alive with disease*, žije s onemocněním

**Ca-ex-Pa** - *carcinoma ex pleomorphic adenoma*, karcinom v pleomorfním adenomu

**CAP** – cyklofosfamid, adriamycin, cisplatina

**CB CT** – *cone-beam computed tomography*, cone-beam výpočetní tomografie

**CC1** – EDTA pufr, pH 8.6

**CC2**- citrátový pufr, pH 6

**CGH** - *comparative genomic hybridization*, srovnávací genomová hybridizace

**CK** –cytokeratin

**CRTC1-MAML2** – *regulated transcription coactivator 1-mastermind-like 2* - fuzní onkogen  
uvedených 2 genů

**CT** – *computed tomography*, výpočetní tomografie

**CR** – *complete response*, kompletní remise

**DNA** – *deoxyribonucleic acid*, kyselina deoxyribonukleová

**DOD** – *dead of disease*, smrt v důsledku onemocnění

**EBV** - Epstein-Barrové virus

**EGFR** - receptor epidermálního růstového faktoru

**EMC** - *epithelial-myoepithelial carcinoma*, epiteliálně-myoepiteliální karcinom

**ER** - estrogenní receptor

**18F-FDG** - fluorodeoxyglukosa značená radioaktivním fluorem

**FGFR1** – gen tvořící fibroblastový růstový faktor 1

**FFPE** – *formalin-fixed, paraffin-embedded*, ve formalínu fixovaná a do parafínu zalitá tkáň

**FISH** - fluorescenční in situ hybridizace

**FNAB, FNAC** – (fine-needle aspiration biopsy/ cytology), tenkojehlová punkční biopsie/cytologie

**G** – Gauge, velikost jehly

**HER1, EGFR** - receptor epidermálního růstového faktoru

**HER2 neu** -receptor epidermálního růstového faktoru 2

**HER3** - receptor epidermálního růstového faktoru 3

**HRAS** – gen tvořící transformující protein p21

**CHRT** – chemoradioterapie

**CHT** – chemoterapie

**MC** – *myoepithelial carcinoma*, myoepiteliální karcinom

**MEC** – *mucoepidermoid carcinoma*, mukoepidermoidní karcinom

**MR** – magnetická rezonance

**MYB** - geny kodující transkripční faktor ( *MYBL1*, *MYBL2* )

**MYB – NFIB** – fúzni gen, *MYB* break-apart sonda - *NFIB* break-apart sonda

**ND** – *not done*, není zhotoveno

**NA** – *not analysed*, nelze analyzovat

**N/C poměr** – *nucleo-cytoplasmic*, jaderně- cytoplazmatický poměr

**ND** – *neck dissection*, krční disekce

**NED** – *no evidence of disease*, bez příznaků onemocnění

**NOS** – *not otherwise specified*, blíže neurčený

**PCR** - *polymerase chain reaction*, polymerázová řetězová reakce

**PD** – *progressive disease*, progresivní onemocnění

**PET** – pozitronová emisní tomografie

**PR** – *partial response*, parciální remise

**PRg** - progesteronový receptor

**RNA** – *ribonucleic acid*, kyselina ribonukleová

**RND** – *radical neck dissection*, radikální krční disekce

**RT** – radioterapie

**RTG** – rentgen, skiografie

**RT-PCR** - *reverse transcription polymerase chain reaction*, polymerázová řetězová reakce, kombinace s qPCR je real-time PCR (kvantitativní PCR)

**RTU** - *ready to use*, připraven k použití

**SC** – sekreční karcinom

**SCM** - *musculus sternocleidomastoideus*

**SD** – *stable disease*, stabilizace onemocnění

**SDC** – *salivary duct carcinoma*, salivární duktální karcinom

**SDC ex PA**- *salivary duct carcinoma ex pleomorphic adenoma*, salivární duktální karcinom z pleomorfního adenomu

**Th** – terapie

**USG** - ultrasonografie

**WHO** – *World Health Organization*, Světová zdravotnická organizace

**Poděkování:**

Rád by jsem poděkoval zejména své školitelce prof. MUDr. Aleně Skálové, CSc. za odborné vedení a oponentovi prof. MUDr. Ivo Stárkovi CSc. za cenné připomínky a korektury při vypracování dizertační práce. Celému kolektivu Bioptické laboratoře, s.r.o v Plzni za imunohistochemickou a molekulárně genetickou analýzu karcinomů slinných žláz v souboru pacientů. Thalita Santana Conceição, DDS, Msc., University of Sao Paulo, Brazílie, má můj velký dík za pomoc při zpracování a vyhodnocení údajů imunohistochemického a genetického vyšetření. Dále děkuji všem kolegům z Oddělení ústní čelistní a obličejové chirurgie Stomatologické kliniky Fakultní nemocnice v Plzni, kteří ošetřováním pacientů participovali na sběru dat, tvořící základ této práce.



**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem tuto dizertační práci vypracoval samostatně, uvedl jsem všechny použité prameny a literaturu a že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Plzni 20.5.2019

MUDr. Pavel Andrlé

## **1. Zhoubné nádory slinných žláz – úvod do problematiky**

### **1.1. Incidence a etiologie – rizikové faktory**

Incidence zhoubných maligních nádorů slinných žláz je celosvětově uváděna v rozmezí 0,4 -2,6 na 100 000 obyvatel [1]. Salivární malignity globálně představují maximálně 7 % všech zhoubných nádorů hlavy a krku. Z celkového počtu zhoubných onemocnění tvoří pouze minoritní, ne více než 0,5% část. Podíl maligních nádorů k salivárním neopláziím celkově je nejvyšší v sublinguální žláze (70 -90 %), v malých slinných žlázách jde o 50 %, v submandibulární žláze 41 -45 % a v příušní žláze se jedná o 15 -32 %. Mezi všemi nádory slinných žláz jsou malignity zastoupeny jen asi 10 – 20 % [1]. Velké epidemiologické soubory nevykazují žádné výrazné pohlavní ani geografické rozdíly. Věkově jsou pacienti s nálezem nádoru slinné žlázy v průměrném věku 46-47 let, přičemž u malignit je ve většině souborů uváděno spíše 6. až 7. decenium [1,2].

Z exogenních příčin vzniku je nejčastěji uváděn virus EBV u asijské, resp. inuitské populace při diagnóze lymfoepiteliálního karcinomu [1]. Role transkripčně aktivních HPV 16/18 byla demonstrována v jedné studii mukoepidermoidních karcinomů [3], ale tento nález nebyl nikdy potvrzen v dalších nezávislých studiích. Analýza prováděná v Šiklově ústavu patologie Lékařské fakulty v Plzni a Biopstické laboratoři s.r.o v Plzni na vzorcích 33 zhoubných i nezhoubných nádorů slinných žláz neprokázala příčinnou souvislost mezi HPV infekcí a vznikem salivárních nádorů [4]. Zkoumán byl taktéž kancerogenní vliv radiace na obyvatelstvo, které bylo zasaženo ionizujícím zářením v Nagasaki a Hirošimě. Byl prokázán 11-ti násobný výskyt salivárních malignit, a z nich zejména mukoepidermoidního karcinomu. Jako rizikové je považováno i terapeutické využití záření, a to ve formě teleradioterapie oblasti hlavy a krku nebo aplikací radionuklidu jódu při léčbě malignit štítné žlázy. Studie velkého souboru pacientů s radioterapií oblasti hlavy a krku v anamnéze pro diagnózu Hodgkinova lymfomu popsala sekundárně zvýšený výskyt zhoubných nádorů slinných žláz [5]. Jejich vyšší výskyt byl zjištěn i u pracovníků v kovovýrobě /olovo, nikl / nebo při zpracování azbestu [1].

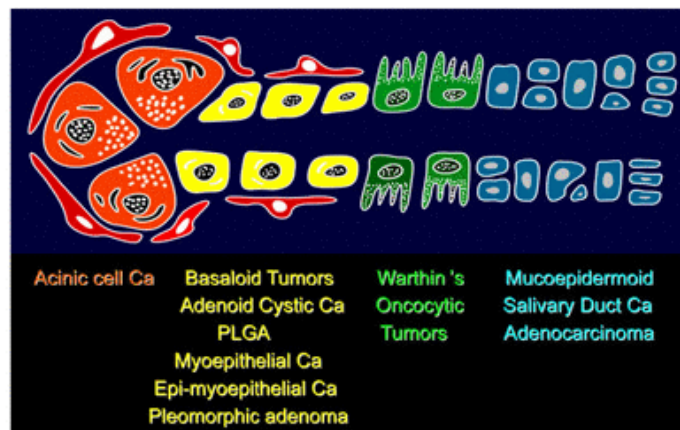
### **1.2. Anatomie a histomorfologie slinných žláz**

Základní anatomické dělení na velké a malé slinné žlázy slouží zároveň i k topografickému dělení nádorů při hodnocení incidence. Mezi velké slinné žlázy, které mají vždy makroskopicky identifikovatelný vývod v dutině ústní, řadíme žlázu příušní, podčelistní a podjazykovou. Malé

slinné žlázy jsou v podslizniční vrstvě rtů, tváři, jazyka a patra. Z chirurgického hlediska je důležité anatomické dělení příušní žlázy. Větvením lícního nervu je tato žláza rozdělena na povrchový a hluboký list. Hlavní kmen se po výstupu z foramen stylomastoideum dělí ve žláze na temporofaciální a cervikofaciální kmen. Tyto 2 kmeny se dělí dále na 5 větví: frontální, zygomatickou, bukální, ramus marginalis mandibulae a cervikální. Z pohledu příp. pooperačních lézí lícního nervu jsou jako nejdůležitější hodnoceny zygomatické a bukální větve. Jejich poškození se projeví lagofthalmem a insuficiencí retního uzávěru v důsledku poškození větviček pro svaly ústního koutku [2].

Převážná většina nádorů slinných žláz se vyskytuje v povrchním laloku příušní žlázy, který tvoří asi 80 % její celé masy. Pro léčbu nádorů slinných žláz je důležitá i anatomie lymfatického systému. Na rozdíl od ostatních velkých slinných žláz má glandula parotis bohatou síť intraglandulárních lymfatických uzlin. Ty jsou uloženy zejména v povrchovém laloku a nedrénují jen samotnou žlázu, ale i frontoparietální oblast. Z tohoto důvodu mohou být intraglandulární uzliny tributární pro oblast zadních partií nosu, epi- a orofaryngu. Intraparenchymatozní uzliny jsou následně s paraglandulárními drénovány do hlubokého krčního lymfatického systému [2].

Z hlediska fyziologické funkce rozdělujeme slinné žlázy na serózní a mucinózní. Serózní aciny jsou tvořeny pyramidovými buňkami a produkují bílkovinný sekret řídké konzistence. Mucinózní aciny tvoří cylindrické buňky secenerující vazký hlen. Mezi sekreční buňky a bazální membránu jsou vloženy myoepitelové buňky, které zajišťují vyprazdňování sekretu do vývodného systému. Ten začíná vsunutými kanálky, na které navazují žíhané vývody patrné na histologických řezech uprostřed lalůček. Intralobulární vývody jsou ve vazivovém intersticiu a ústí v hlavní vývod velké slinné žlázy. Z podrobné histomorfologie slinných žláz vychází např. Batsakisova teorie histogeneze vzniku jejich epiteliálních nádorů. Dle ní má daný karcinom původ buď v distální nebo proximální části vývodného systému [6]. Origo v intralobulárních a hlavních vývodech slinných žláz se předpokládá zejména u mukoepidermoidního, adenokarcinomu NOS a salivárního duktálního karcinomu. Proximálně ve vmezeřených vývodech zřejmě vznikají adenoidně cystický karcinom, intraduktální, basaloidní, a sekreční karcinom. Přímo v acinech má pak původ karcinom acinický (obr. 1.) [7]. Obecně vzato čím distálněji je založen karcinom, tím agresivnější je jeho biologická povaha. Tato teorie byla podpořena studií adenoidně cystického karcinomu, kdy se ztrátou myoepiteliálních buněk přibývá agresivita tumoru, a jedná se většinou o high grade verze tohoto nádoru [8].



Obr. č. 1 Grafické znázornění Batsakisovy teorie histogeneze nádorů slinných žláz

### 1.3. Morfologické dělení nádorů slinných žláz – WHO klasifikace 2017

Nádory slinných žláz se vyznačují velkou morfoloickou rozmanitostí. V současnosti je platná nová WHO klasifikace z roku 2017 (tabulka 1) [9], která rozeznává 21 rozdílných typů maligních nádorů slinných žláz a sialoblastom, jediný typ klasifikovaný jako “nejistého biologického chování” (nejistého maligního potenciálu). Z maligních nádorů jsou nejčastěji zastoupeny acinický, mukoepidermoidní a adenoidně cystický karcinom. Relativní zastoupení každé z uvedených jednotek se pohybuje mezi 10 -15 %. Méně časté jsou polymorfni adenokarcinom, salivární duktální karcinom a karcinom z pleomorfního adenomu.

<b>Karcinomy</b>		<b>Adenomy</b>	
Mukoepidermoidní karcinom	8430/3	Pleomorfní adenom	8940/0
Adenoidně cystický karcinom	8200/3	Myoepiteliom	8982/0
Acinický karcinom	8550/3	Bazocelulární adenom	8147/0
Polymorfní adenokarcinom	8525/3	Warthinův tumor	8561/0
Světlobuněčný karcinom	8310/3	Lymfadenom	8563/0
Bazocelulární adenokarcinom	8147/3	Cystadenomy	8440/0
Intraduktální karcinom	8500/2	Papilární cystadenom	
Adenokarcinom (NOS)	8140/3	Mucinózní cystadenom	
Salivární duktální karcinom	8500/3	Sialadenoma papilliferum	8406/0
Myoepiteliální karcinom	8982/3	Duktální papilom	8503/0
Epiteliálně-myoepiteliální karcinom	8562/3	Sebaceózní adenom	8410/0
Karcinom z pleomorfního adenomu	8941/3	Kanalikulární adenom a další duktální adenomy	8149/0
Sekreční karcinom	8502/3	<b>Nenádorové epiteliální léze</b>	
Sebaceózní adenokarcinom	8410/3	Sklerotizující polycystická adenoza	
Karcinosarkom	8980/3	Nodulární onkocytární hyperplazie	
Špatně diferencovaný karcinom		Lymfoepiteliální sialadenititida	8850/0
Nediferencovaný karcinom	8020/3	Hyperplazie vmezeřených vývodů	8828/0
Velkobuněčný neuroendokrinní karcinom	8013/3	<b>Benigní mesenchymální nádory</b>	
Malobuněčný neuroendokrinní karcinom	8041/3	Hemagiom	9120/0
Lymfoepiteliální karcinom	8082/3	Lipom/sialolipom	8850/0
Dlaždicobuněčný karcinom	8070/3	Nodulární fasciitida	8828/0
Onkocytární karcinom	8290/3		
		<b>Hematolymfoidní nádory</b>	
<b>nejistého biologického potenciálu</b>		MALT lymfom	9699/3
Sialoblastom	8974/1		

**Tabulka 1 - WHO dělení nádorů slinných žláz 2017**

*Zdroj: El-Naggar A.K., Chan J.K.C., Grandis J.R., Takata T., Slootweg P.J. (Eds). WHO Classification of Head and Neck Tumours (4<sup>th</sup> edition). IARC Lyon: 2017 [9].*

#### 1.4. Staging salivárních maligních nádorů – TNM klasifikace

Staging salivárních malignit je aktuálně stanovován dle platné TNM klasifikace zhoubných novotvarů (8. vydání, rok 2017, v české verzi rok 2018) (tabulka 2) [10].

<b>T – Primární nádor</b>	
Tx	primární nádor nelze hodnotit
T0	bez známek primárního nádoru
T1	≤ 2 cm, bez šíření mimo parenchyma
T2	> 2cm ≤ 4 cm, bez šíření mimo parenchyma
T3	> 4cm a/nebo šíření mimo parenchyma
T4a	infiltrace kůže, mandibuly, zevního zvukovodu, n. facialis
T4b	infiltrace baze lebni, ploténky křídlovitého výběžku kosti klínové, a. carotis
<b>N – Regionální mízní uzliny</b>	
Nx	regionální mízní uzliny nelze zhodnotit
N0	v regionálních mízních uzlinách metastázy nepřítomny
N1	stejnostranná jediná ≤ 3 cm, bez šíření mimo uzlinu
N2a	stejnostranná jediná >3cm ≤ 6cm, bez šíření mimo uzlinu
N2b	stejnostranné vícečetné ≤ 6cm, bez šíření mimo uzlinu
N2c	oboustranné, druhostranné ≤ 6cm, bez šíření mimo uzlinu
N3a	> 6 cm, bez šíření mimo uzlinu
N3	uzlina s extranodálním šířením*
<b>M – Vzdálené metastázy</b>	
M0	vzdálené metastázy nepřítomny
M1	vzdálené metastázy přítomny

**Tabulka 2 – TNM klasifikace salivárních maligních nádorů**

**Zdroj:** 8.edice TNM klasifikace, r.2017[10].

*\*za extranodální šíření je považováno i postižení kůže nebo měkkých tkání s hlubokou fixací; uzlina ve střední čáře je stejnostranná*

AJCC (American Joint Committee on Cancer) v roce 2017 ve své 8. edici rozšiřuje NM systém o přepracované hodnocení uzlinových regionálních metastáz [11]. Předpokladem pro zařazení do kategorie N1 - N3a je absence extrakapsulárního šíření. Jinak je nález klasifikován jako N3b. Mízní uzliny ve střední čáře se považují za stejnostranné. Intraparenchymální uzliny průušní žlázy

nejsou považovány za pozitivní regionální uzliny. Šíření mimo parenchym žlázy znamená makroskopické známky invaze do okolních tkání kromě těch, jež jsou uvedeny pod T4a a T4b. Následně mikroskopické známky infiltrace mimo pouzdro již nepředstavují šíření mimo parenchym s ohledem na T klasifikaci. V klinické praxi je stadium III již všeobecně považováno za velmi pokročilé, a ve většině případů je prognosticky již nepříznivé (tabulka 3).

Stadium 0	Tis	N0	M0
Stadium I	T1	N0	M
Stadium II	T2	N0	M0
Stadium III	T3	N0	M0
	T1-T3	N1	M0
Stadium IVa	T4a	N0 N1N2	M0
	T1-T3	N2	M0
Stadium IVb	T4b	jakékoliv N	M0
	jakékoliv T	N3	M0
Stadium IVc	jakékoliv T	jakékoliv N	M1

**Tabulka 3 – Stadia nemoci při diagnóze salivárních malignit (WHO 2017)**

*Zdroj: WHO klasifikace 2017 [9].*

### 1.5. Grading salivárních karcinomů

Histologický grading salivárních karcinomů vyjadřuje stupeň jejich diferenciaci a na rozdíl od slizničních karcinomů dutiny ústní je důležitým prediktivním faktorem. V současné době platí klasifikace dle WHO 2017 [9]. Grading se uplatňuje jen u karcinomu mukoepidermoidního, adenoidně cystického, cystadenokarcinomu a adenokarcinomu NOS. U ostatních jednotek je biologické agresivita nádoru implicitně vyjádřena jejich histopatologickou diagnózou, proto současná WHO klasifikace rozděluje salivární karcinomy na léze s nízkým a vysokým biologickým rizikem (low-risk, resp. high-risk tumory) (tabulka 4). Z retrospektivních studií vyplývá, že 5-ti leté přežití u high-risk karcinomů slinných žláz dosahuje 40 %, u low-risk lézí činí 80-90 % [12]. Obecně lze říci, že grading nádoru není jen prognostický faktor, ale měl by být doporučením pro rozsah nebo modalitu léčby. Konkrétně high grade karcinomy jsou indikovány po resekčním chirurgickém výkonu k adjuvantní radioterapii. Oproti u low grade karcinomů je za

dostačující terapii je považována radikální resekce [13]. Grading nádoru není jediným parametrem míry rizika. Například u karcinomu z pleomorfního adenomu rozhoduje o zařazení do rizikové skupiny rozsah invaze infiltrace přes pouzdro tumoru (tabulka 4). Ukazuje se však, že více než histopatologický grading je pro prognózu důležitější klinické stadium tumoru.

U low - risk nádorů může dojít k HGT transformaci /dediferenciaci/. Tento fenomén byl poprvé popsán u chondrosarkomu již v roce 1971 [14]. Jde o progresi původně nízkce maligního nádoru do vysoce maligní varianty. Později byla high-grade transformace popsána v řadě salivárních low-grade karcinomů [15], např. u acinického karcinomu [16, 17], sekrečního karcinomu [18], epiteliálně-myoepiteliálního karcinomu [19] a dalších.

High grade transformace výrazně zhoršuje prognózu pacienta, protože je spojena se značně vyšším výskytem lokoregionálních i vzdálených metastáz. Histologicky je karcinom tvořen dobře diferencovanou komponentou, která určuje základní diagnózu, a nediferencovanou fokálně nekrotizující komponentou pozůstávající z anaplastických nádorových buněk s výrazně vystupňovanou mitotickou aktivitou.



Low - risk	High – risk
Acinický karcinom	Sebaceózní karcinom a lymfadenokarcinom
Mukoepidermoidní karcinom low – grade	Mukoepidermoidní karcinom high – grade
Epiteliálně-myoepiteliální karcinom	Mucinózní adenokarcinom
Polymorfní low- grade adenokarcinom	Dlaždicobuněčný karcinom
Světlobuněčný karcinom	Malobuněčný karcinom
Bazocelulární karcinom	Velkobuněčný karcinom
Intraduktální karcinom	Metastazující pleomorfní adenom
Myoepiteliální karcinom	Karcinosarkom
Onkocytický karcinom	Adenoidně cystický karcinom
Sialoblastom	Salivární duktální karcinom
Karcinom v pleomorfním adenomu (intrakapsulární/minimálně invazivní nebo low-grade histologie)	Karcinom v pleomorfním adenomu (invazivní nebo high - grade histologie)
Adenokarcinom (blíže nespecifikovaný, NOS), cystadenokarcinom - low – grade	Adenokarcinom NOS, cystadenokarcinom – high –grade
	Lymfoepiteliální karcinom

**Tabulka 4 – Dělení salivárních karcinomů dle jejich biologického rizika**

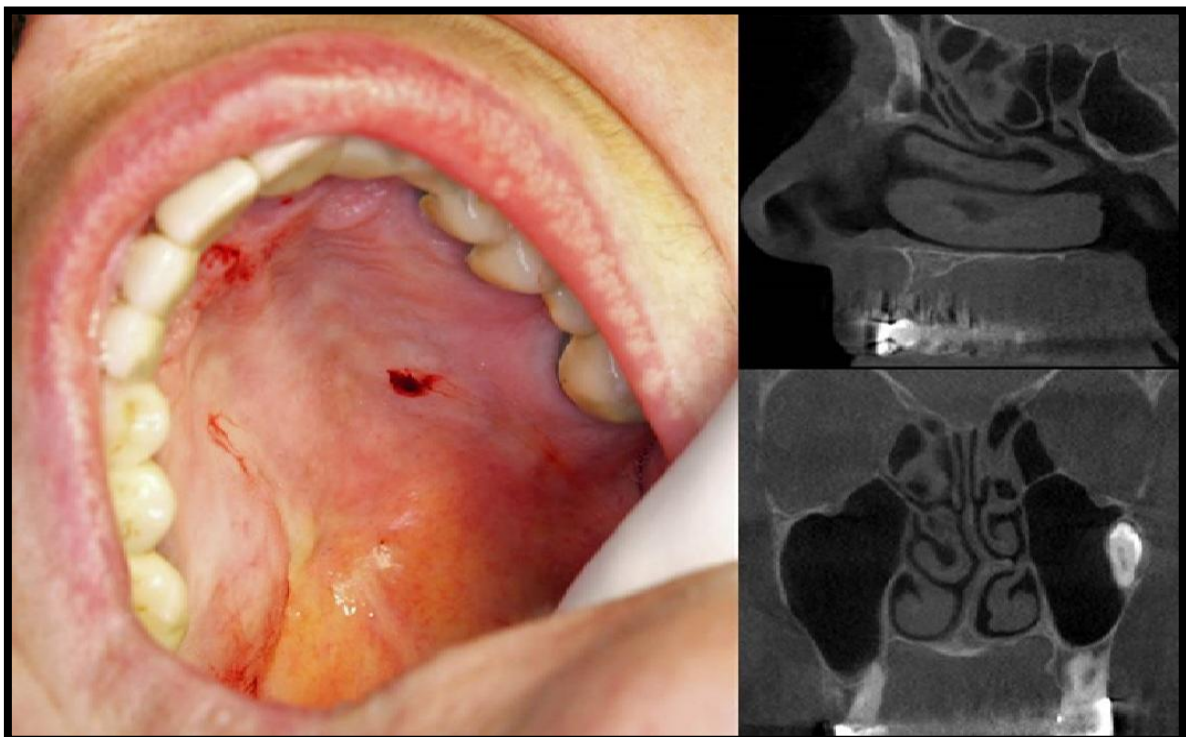
*Zdroj: modifikováno dle Seethala RR. An update on grading of salivary gland carcinomas [20 ]*

#### 1.6. Klinická diagnostika – anamnéza, zobrazovací metody, biopsie

Z anamnestických údajů je v diferenciální diagnostice nádorů slinných žláz důležitá zejména délka trvání nádoru a jeho progresu. Zároveň se většinou jedná o pojem velmi zavádějící, protože validita údaje je velmi zkreslena subjektivním hodnocením pacienta. Z objektivních příznaků jsou pro maligní nádory signifikantní fixace tumoru ke kůži či sliznici s event. exulcerací svědčící pro infiltraci povrchového krytu tumorem (obr.2). U příušní žlázy je typickým příznakem vysoce rizikového karcinomu výskyt předoperační obrny faciálního nervu.



Obr. č. 2 Pacient s karcinomem z pleomorfního adenomem pravé příušní žlázy. Po 10 –ti letech odmítání odstranění tumoru žlázy došlo k náhlé progresi a histologickému ověření diagnózy.



Obr. č. 3 Snímek vlevo se zduřením v oblasti tvrdého patra vpravo – polymorfní low-grade adenokarcinom malé slinné žlázy patra. Na CT snímcích vpravo je vyloučena invaze nádoru do patrové kosti.

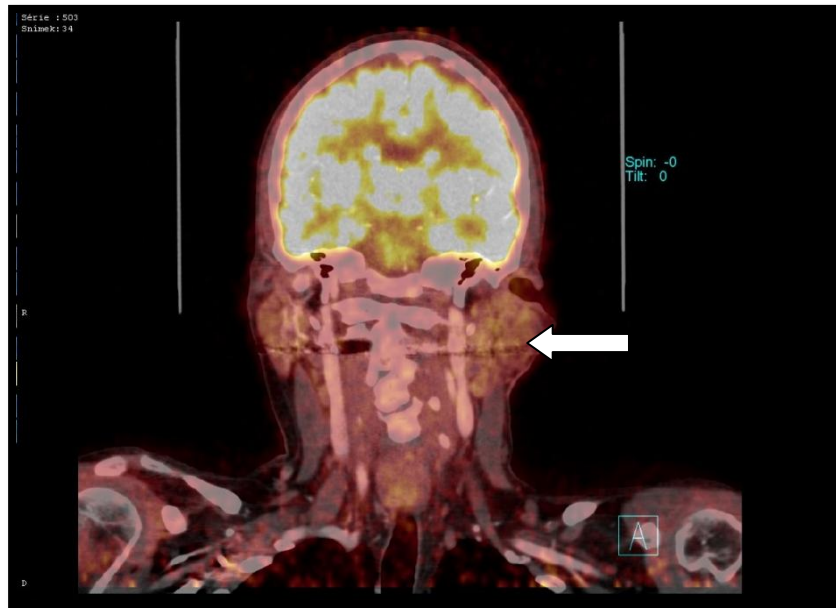
Při vyšetření nádorů slinných žláz mají nezastupitelnou roli zobrazovací metody. Jako primární volíme na našem pracovišti ultrasonografické vyšetření. Používáme přístroj s barevně kódovaným duplexním zobrazovacím B modem a lineární 10 MHz sondou. Přestože se sonografické vyšetření stalo zlatým standardem ve vyšetření slinných žláz, má i tato metoda své anatomické limity. Jde zejména o intraorální vyšetření – např. tumor tvrdého patra a dále o retromandibulární oblast příušní žlázy resp. její hluboký list. Nádory slinných žláz jsou hypoechogenní útvary, v případě vysoce rizikových karcinomů se ztrátou ohraničení a známkami hypervaskularizace parenchymu. Obě markanty mohou být ale zavádějící. Hypervaskularizace se může vyskytnout i u imunosenescence a je proto nutná komparace s klinickým průběhem event. dalším zobrazovacím vyšetřením. CT vyšetření (Computed Tomography) rozlišuje velice přesně změny nejenom měkkých tkání, ale i kostní tkáň. To je nutné i při posouzení příp. infiltrace obličejových kostí – např. u tumorů malé slinné žlázy tvrdého patra (obr. 3). Kromě celotělové zátěže má CT vyšetření obličejové limit v tzv. Hounsfieldském efektu [2]. Jde o zkreslující artefakty vzniklé přítomnými kontrastními materiály – amalgámové výplně, pevné zubní protézy. Pro detailní zobrazení samotného tumoru je nejvýhodnější použití magnetické rezonance (MR). Ta nejlépe zobrazuje parametry nutné k posouzení charakteru a operability léze – vztah k okolním tkáním, vaskularizaci a strukturu nádorové tkáň (obr. 4,5). MR vyšetření slouží vedle detailního zhodnocení charakteristiky nádoru, k detekci lokoregionálních uzlin krku. K celotělovému screeningu při staging maligních karcinomů slinných žláz se dnes používají hybridní metody spojující CT nebo MR zobrazení s funkčním radionuklidovým vyšetřením, tj. PET- CT či PET-MR (obr. 6). Uvedené zobrazovací metody vykazují téměř 100% specificitu, senzitivita je však nižší. Tyto metody neumožňují stanovení histopatologické diagnózy nádoru. Otevřená biopsie nádorů slinných žláz je ve většině případů kontraindikována pro možný tumorózní rozsev, a proto se doporučuje především při podezření na maligní lymfom. Jako méně invazivní metoda se připouští cytologická FNA (fine needle aspiration), která se provádí jehlami o průměru 22-25 G, a nevede k následným recidivám nádorů. Minimální riziko nádorového rozsevu vykazuje i CCB (core cut biopsy), která se provádí jehlami o průměru 14-18 G. Tato metoda vykazuje vysoký stupeň senzitivity při diagnostice benigních nádorů [1, 21]. S výhodou lze pro snadnější navigaci jehlové biopsii využít ultrasonografii či CT (obr.7).



Obr. č. 4. Magnetická rezonance – koronální řez T2: lokální diseminace susp. recidivy pleomorfního adenomu levé parotické žlázy (šipka)  
 Zdroj: Klinika zobrazovacích metod LF UK a FN Plzeň,  
 přednosta: Prof. MUDr. Boris Kreuzberg, CSc.

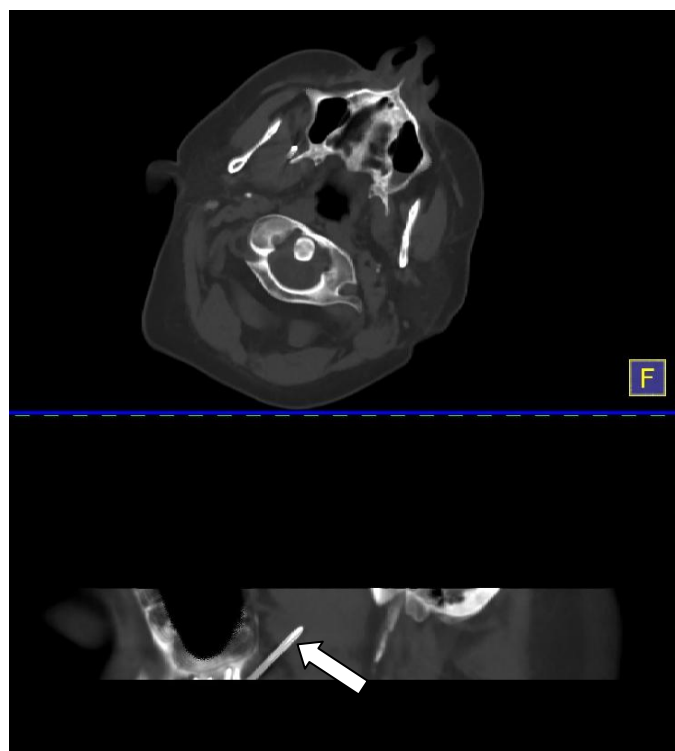


Obr. č. 5. Magnetická rezonance – koronální řez T2: stav po superficiální parotidekomii (šipka) u stejného pacienta jako obr. č.4– histologicky ověřená recidiva pleomorfního adenomu bez malignizace, operovaná oblast bez známek rezidua nádoru  
 Zdroj: Klinika zobrazovacích metod LF UK a FN Plzeň,  
 přednosta: Prof. MUDr. Boris Kreuzberg, CSc.



Obr. č. 6 18F-FDG PET CT předoperační vyšetření identického pacienta (obr. č. 3,4 ) bez kumulace radionuklidu v recidivě tumoru (šipka) a lokoregionálních uzlinách – negativita vyšetření neprokazuje kancerizaci tumoru

Zdroj: Klinika zobrazovacích metod LF UK a FN Plzeň, přednosta: Prof. MUDr. Boris Kreuzberg, CSc.



Obr. č. 7 CT vyšetření maligního lymfomu m.pteryg. med.. Na horním snímku (axiální řez) patrná infiltrace svalu nádorem , na dolním snímku (sagitální řez) je vidět zavedená punkční jehla do tumoru hlubokého listu gl. parotis (šipka)

Zdroj: Klinika zobrazovacích metod LF UK a FN Plzeň, přednosta: Prof. MUDr. Boris Kreuzberg, CSc.

## 1.7. Patomorfologie, imunohistochemie, molekulární genetika salivárních karcinomů

Na základě histomorfologického a imunohistochemického vyšetření můžeme většinu tumorů slinných žláz rozdělit na monofázické či bifázické. Monofázické sialomy jsou tvořeny jedním typem buněk a zahrnují acinický karcinom (AciCC), salivární duktální karcinom (SDC), sekreční karcinom (SC), myoepiteliální karcinom (MC) a další.

Bifázické maligní karcinomy jsou složeny z lumenálních (duktálních) a ablumenálních (bazálních/myoepiteliálních) buněk. Mezi ně patří např. adenoidně cystický karcinom (AdCC), polymorfní adenokarcinom (PAC) a epiteliálně-myoepiteliální karcinom. Lumenální buňky imunohistochemicky exprimují “lumenální cytokeratiny”, CK7, CK8, CK19, epiteliální membránový antigen (EMA) a jsou negativní na vysokomolekulární cytokeratiny CK 5/6, CK14, protein transkripčního faktoru p63, hladkosvalové markery, např. ASMA (alfa-smooth muscle actin) nebo SMA (smooth muscle antigen). Naopak ablumenální/myoepitelové buňky vykazují expresi p63, SMA, ASMA, vimentinu a calponinu. Bazální buňky exprimují p63 protein, p40 a vysokomolekulární cytokeratiny (CK14, CK 5/6). Diferenciálně diagnosticky významným markerem je SOX 10, který je transkripčním faktorem přítomným v buňkách neurální lišty (melanocyty, Schwannovy buňky). Jeho zvýšená exprese je přítomna u acinického, sekrečního, myoepiteliálního karcinomu a AdCC, ale je negativní u SDC a MEC. Velmi dobrým markrem pro acinický karcinom je DOG1, jehož typická membránová exprese jej odlišuje od všech dalších karcinomů především od morfologicky podobného SC. Androgenní receptory a GATA3 mají diagnostický význam pro SDC. Nejdůležitější imunohistochemické markery normální salivární tkáně a některých z ní vycházejících sialomů jsou uvedeny v (tabulky 5,6) [22].

Antigen	b. hlavních a interlobulárních vývodů	b. žíhaných vývodů	b. vmezeřených vývodů	b. acinů	basální b.	myo-epiteliální b.
Calponin SMA/ASMA SMMHc	-	-	-	-	-	+
CK7	+	+	+	+	+/-	+
CK5/6	-	-	-	-	+	+
p63	-	-	-	-	+	+
p40	-	-	-	-	+	+
S100	-	-	+/-	-	-	+
SOX10	-	-	+	+	+	+
vimentin	-	-	-	-	-	+

**Tabulka 5 – Expresie imunohistochemických markerů normálních tkání slinných žláz**

*Zdroj: modifikováno dle Shaobo Z, Scheurch C, Hunt J. Review and Updates of Immunohistochemistry in Selected Salivary Gland and Head and Neck Tumors [22]*

*b- buňka*

Antigen	MEC	ACC	SDC	MC	SC
p63	+	-	-	+	-
calponin/ ASMA/ SMA/SMMHc	-	-	-	+	-
CK7	-	+	+	-/+	+
SOX 10	-	-	-	+	+
AR	-	+	-	+	-
GATA3	-	-	+	-	+
MGA	-	-	-	-	+
S100 protein	-	-	-	+	+
DOG1	-	+	-	-	-

**Tabulka 6 – Expresie imunohistochemických markerů vybraných salivárních karcinomů**

*Zdroj: modifikováno dle Shaobo Z, Scheurch C, Hunt J. Review and Updates of Immunohistochemistry in Selected Salivary Gland and Head and Neck Tumors [22]*

*CK –cytokeratin, SMA – smooth muscle actin, SMMHc – smooth muscle myosin heavy chain- myosinový protein hladkého svalstva, AR – androgenní receptor, MEC – mukopidermoidní karcinom, ACC – acinický karcinom, SDC – salivární duktální karcinom, MC – myoepiteliální karcinom, SC – sekreční karcinom*

Molekulárně cytogenetické metody sloužící k detekci genetických změn zjišťují změny na úrovni DNA a RNA. Nejdéle je používána metoda fluorescenční in situ hybridizace (FISH). Principem je komplementární párování DNA vyšetřované tkáně a fluorescenčně značené sondy. Výhodou této metody je její vysoká specificita a senzitivita. Dle použité sondy je možné zjišťovat změny na chromozomech nebo interfázních jádrech. Další metodou je již izolace samotné nukleové kyseliny (DNA i RNA), jejíž analýzou se stanovují např. fúzní geny. Nejpoužívanější metodou je dnes polymerázová řetězová reakce (PCR), která je založena na replikaci úseku DNA. Podstata této techniky je ve vazbě primeru na oligonukleotidy DNA templátu. K samotnému množení dochází reakcí polymerázy, která se váže na primery a připojuje další nukleotidy. Nejpřesnější metodou k určení genové mutace je dnes přímé sekvenování DNA. Její výsledky jsou ale negativně ovlivněny velkou buněčnou rozmanitostí nádorové tkáně a tím i nízkou senzitivitou [23].

V nádorové cytogenetice je důležité rozlišit sekundární poruchy vzniklé genovou nestabilitou a primární změny, kterou jsou příčinou vzniku nádoru. Primární cytogenetické poruchy jsou dány: inzercí retrovirů do genomu buňky, bodovou mutací, chromozomální aberací, translokací, amplifikací nebo delecí. Tyto poruchy indukují změny regulující buněčné dělení. Geny zodpovědné za tuto regulaci dělíme na onkogeny a tumor supresorové geny. Samotný onkogenní mechanismus je zprostředkován vznikem abnormálního proteinu resp. abnormálním množstvím proteinu normálního. Proteiny fungují jako signální transduktory, geny buněčné diferenciace, transkripční regulační faktory, růstové faktory event. jejich receptory, inhibitory tumor supresorů či apoptózy. Typickým příkladem těchto změn je chromozomální translokace se vznikem fúzovaných genů produkujících abnormální „chimerický“ protein. Taková cytogenetická změna byla poprvé popsána u Filadelfského chromozomu, který je signifikantní pro chronickou myeloidní leukemii [24]. Dosud popsané diagnosticky významné cytogenetické poruchy typické pro salivární karcinomy shrnuje (tabulka 7) [25].



<b>Tumor</b>	<b>Chromozomální alterace</b>	<b>Gen</b>	<b>Prevalence %</b>
Epitheliálně-myoepithelialní karcinom	11p15.5	<i>HRAS</i>	25-85
Bazocelulární adenom/adenokarcinom	11p15.5	<i>CTTNB1</i> mutace	60-70
Membranozní bazocelulární adenom/adenokarcinom	11p15.5	CYLD1 loss of heterozygosity/mutace	75-80
Mukoepidermoidní karcinom	t(11;19)(q21;p13)	<i>CRTC1-MAML2</i>	40-80
	t(11;15)(q21;q26)	<i>CRTC3-MAML2</i>	5
Salivární duktální karcinom	17q21.1	<i>HER-2/neu</i> amplifikace	40
	3q26.32	PIK3CA mutace	20
Adenoidně cystický karcinom	t(6;9)(q22-23;p23-24)	<i>MYBL1-NFIB</i> <i>MYB- NFIB</i>	25-80
Sekreční karcinom	t(12;15)(p13;q25)	<i>ETV6-NTRK3</i>	95-98
	t(10;12)(q11.21;p13.2)	<i>ETV6-RET</i>	2.5
Hyalinizující světlobuněčný karcinom	t(12;15)(p13;q25)	<i>EWSR1-ATF1</i>	80-90
Polymorfní adenokarcinom	14q12	<i>PRKD1</i> mutace	20
Kribriformní adenokarcinom	t(1;14)(p36.11;q12)	<i>ARID1A-PRKD1</i>	24
	t(X;14)(p11.4;q12)	<i>DDX3X-PRKD1</i>	16
		rearanže <i>PRKD2</i> a <i>PRKD3</i>	13

**Tabulka 7 – Genetické alterace vybraných salivárních karcinomů**

*Zdroj : modifikováno dle Seethala RR, Griffith CC. Molecular Pathology Predictive, Prognostic, and Diagnostic Markers in Salivary Gland Tumors. Surgical Pathology Clinics. [25 ]*

## **1.8. Léčba karcinomů slinných žláz**

Chirurgická léčba je stále primární terapeutickou modalitou u všech epiteliálních salivárních nádorů, včetně karcinomů bez ohledu na jejich histologický typ. Pro prognózu je nejdůležitější jejich kompletní chirurgické odstranění. U nádorů malých slinných žláz vycházejících z měkkých nebo kostěných tkání, se provádějí excize resp. resekce. Nádory podčelistních nebo podjazykových žláz jsou indikovány k resekci in toto. Při nádorech parotických je rozsah a radikalita výkonu určena biologickou povahou nádoru a jeho vztahem k lícímu nervu. S těmito výkony je často spojená určitá varianta krční disekce dle předoperačního stagingu.

### **1.8.1 Chirurgická léčba**

#### **Chirurgie příušní žlázy a lícního nervu**

V roce 2016 provedla Evropská asociace pro slinné žlázy (European Salivary Gland Society) revizi klasifikace chirurgických výkonů na příušní slinné žláze [26]. Základem nové nomenklatury se stalo anatomické dělení žlázy na jednotlivé přesně definované segmenty (obr. 8). Nové a starší rozdělení výkonů je shrnuto a porovnáno v tabulce 8. Jednotlivé typy parotidektomií respektují biologickou povahu nádoru a jeho lokální rozsah (TNM staging).

Klasifikace dle ESGS	Klasická klasifikace
parotidektomie I-IV (VII)	radikální parotidektomie
parotidektomie I-IV	totální parotidektomie
parotidektomie I-IV (VII, K, MM)	extendovaná totální parotidektomie s resekcí n.VII, kůže nebo masseteru
parotidektomie I-II	superficiální parotidektomie
parotidektomie III-IV	parotidektomie hlubokého listu
parotidektomie I	parciální superficiální parotidektomie
parotidektomie II	parciální superficiální parotidektomie
parotidektomie I-II-III	superficiální parotidektomie s resekcí dolní části hlubokého listu
parotidektomie V	resekce akcesorní žlázy
ECD I	extrakapsulární disekce tumoru I
ECD II	extrakapsulární disekce tumoru II
ECD V	extrakapsulární disekce tumoru III

**Tabulka 8 - Rozdělení resekčních resp. disekčních výkonů chirurgických výkonů na příušní žláze - ESGS (*Classification of parotidectomies, European Salivary Gland Society*)**

**Zdroj:** *European Salivary Gland Society 2016* [26]

*VII – lící nerv, K – kůže, MM – masseterický sval, ECD – extrakapsulární disekce*

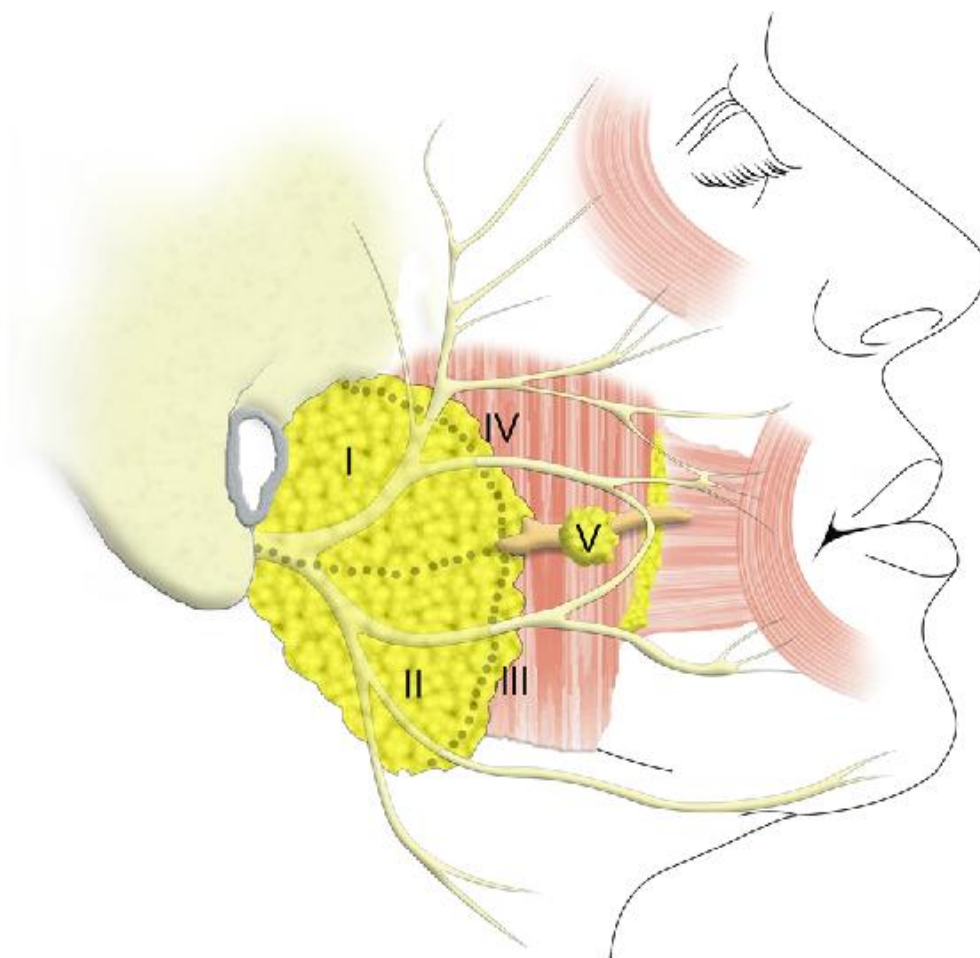
parciální superficiální parotidektomie – exstirpace tumoru povrchového listu s dostatečným lemem zdravého parenchymu žlázy

superficiální parotidektomie – kompletní odstranění povrchového listu příušní žlázy

totální parotidektomie – kompletní odstranění příušní žlázy s ponecháním větví lícího nervu

radikální parotidektomie – kompletní odstranění příušní žlázy včetně lícího nervu

extendovaná radikální parotidektomie – radikální (totální) parotidektomie s resekcí některé infiltrace okolní tkáně – kůže, mandibula, temporální kost, m. masseter



Obr. 8 chirurgicko – anatomické rozdělení příušní žlázy dle European Salivary Gland Society 2016

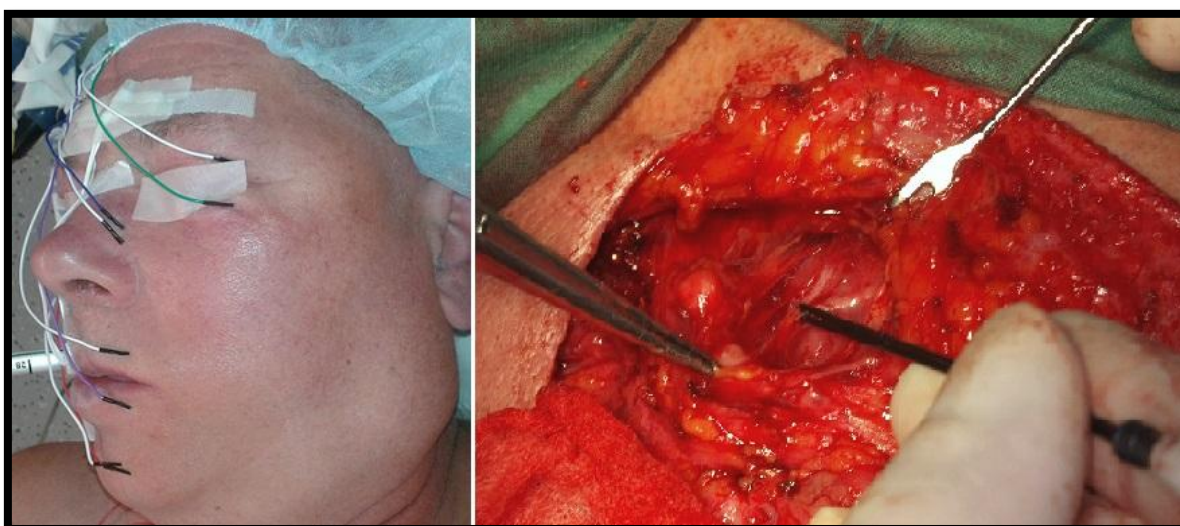
Nejkontraverznější debaty ohledně typu výkonu zůstávají u maligních nádorů velikosti T1 a T2. Tématem diskuzí je rozsah výkonu s ohledem na lící nerv a exstirpaci intraparenchymálních lymfatických uzlin. Většina autorů se shoduje na dostatečnosti indikace superficiální parotidektomie u low grade nádorů velikosti T1 [27, 28]. U afekcí tohoto typu lokalizovaných v dorsální části parotis bývá někdy prováděna tzv. extrakapsulární disekce. Tento výkon nevykazuje větší procento recidiv nežli standardní chirurgie. Protiargumentem limitované parotické chirurgie u low- risk tumorů je možnost ponechání intraparenchymálních lymfatických uzlin v hlubokém listu žlázy. Někteří autoři proto považují za správné indikovat totální parotidektomii u všech tumorů bez ohledu na jejich klinické stadium a grading [29].

U high grade karcinomů byly prokázány lokoregionální metastázy do lymfatických uzlin ve vysokém procentu případů. Klusmann na souborů 142 pacientů prokázal signifikantní rozdíl mezi výskytem těchto metastáz u high - grade a low- grade nádorů příušní slinné žlázy [30]. High

grade karcinomy měly verifikované lokoregionální metastázy u 49 % pacientů oproti 22 % u low grade nádorů. Asi 75 % těchto metastáz bylo lokalizováno intraparenchymálně a pouze 25 % v oblasti krku [30]. U pokročilých nádorů příušní žlázy (stadium III a IV) se většina autorů shoduje na maximální radikalitě ve smyslu totální parotidektomie. Indikace k resekci n. facialis jsou dány jeho vztahem k nádoru, tj. vzdáleností od tumoru a morfoloickými nebo klinickými známkami infiltrace tohoto nervu. Mikroskopická neurální rezidua jsou ponechávána k řešení pro adjuvantní radioterapii [31,32].

Maximální radikalita je doporučována u adenoidně cystického a jiných high-risk karcinomů. Zde je argumentem pro vyšší radikalitu perineurální šíření tumorů. Nádory s invazivitou do okolních tkání – kůže, temporální kosti, mandibuly vykazují při rozsáhlých výkonech až 75 % lokoregionální kontrolu, přesto ale 5–ti leté přežití je uváděno pouze u 22 % pacientů [29].

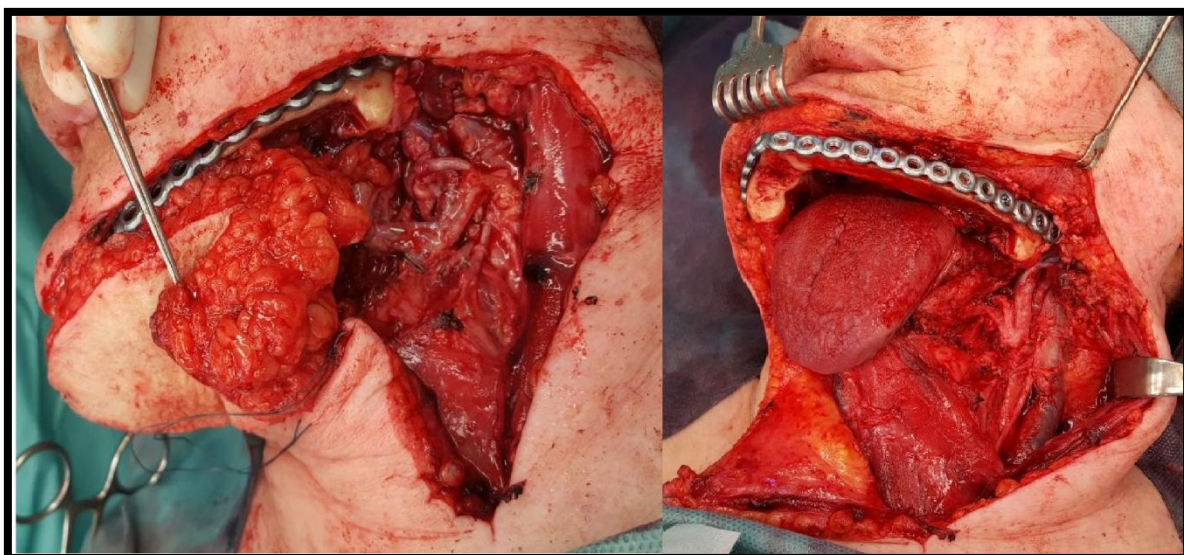
K identifikaci lícního nervu se používá pooperační neuromonitorace tohoto nervu. Jde o modifikovanou elektromyografickou metodu, kdy aktivní sonda stimuluje příslušný nerv proudem o velikosti 0,05mA až 1mA a frekvenci řádově 3-30 Hz. Tento signál je snímán v monitorovaném svalu (m. orbicularis oculi, oris nebo více mimických svalových skupinách) bipolárními sondami a vyhodnocován graficky nebo jen zvukově. V současnosti jde již uživatelsky o jednoduché přístroje, jejichž instalace i ovládání je velice intuitivní, plně v kompetenci operujícího (obr. 9).



Obr. 9 Vlevo je pacient se zavedenými snímacími sondami do m. orbicularis oris a oculi a do m. depressor anguli oris a m. levator labii superior alaeque nasi. Vpravo je aktivní bipolární sonda stimulující větev faciálního nervu.

## Chirurgie nádorů podčelistní slinné žlázy

Za adekvátní výkon se u submandibulárních malignit považuje exenterace prostoru Ib, tzn. včetně tukově-lymfatické tkáně z okolí podčelistní žlázy (obr. 10). U cN0 high-grade karcinomů je indikována i profylaktická elektivní krční disekce v rozsahu I-III [33]. Nejčastější maligní nádor podčelistní žlázy, tj. adenoidně cystický karcinom, vyžaduje mnohdy extenzivnější výkon, tzn. resekci linguálního či hypoglosálního nervu, resekci suprahyoidních svalů nebo resekci segmentu mandibuly [34].



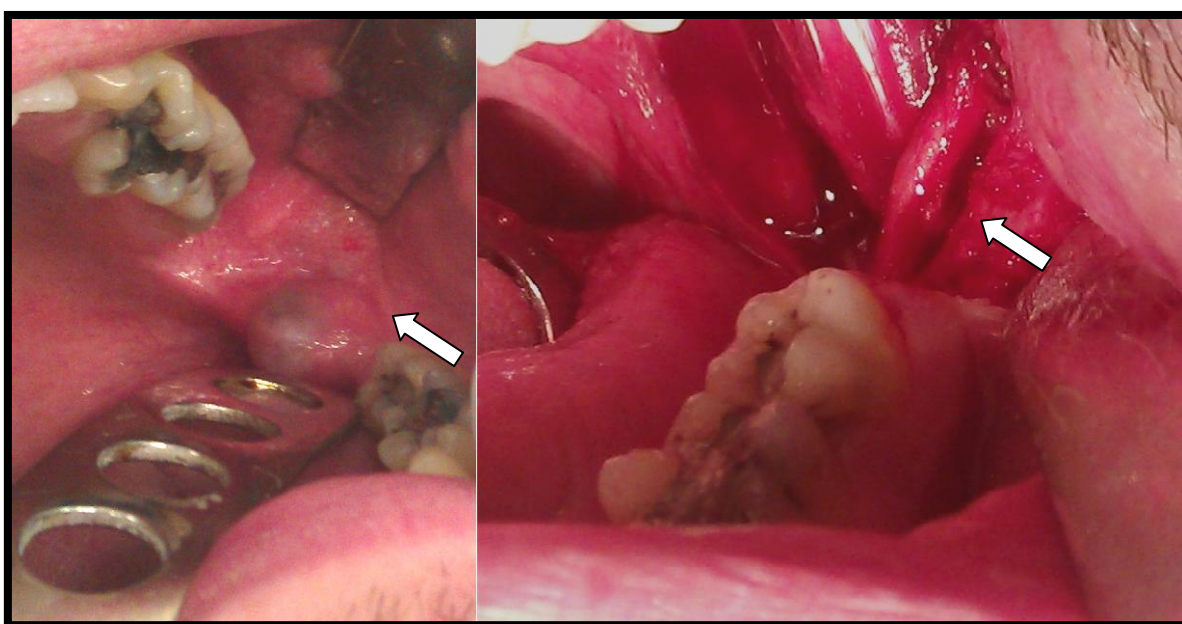
Obr. 10 – Vlevo je resekát submandibulárního lože s recidivou adenoidně cystického karcinomu fixovaného k periostu dolní čelisti. Proto je k resekátu přidána i dolní hrana mandibuly. Vpravo je dolní čelist po marginální resekci dolní hrany zpevněna rekonstrukční dlahou. Na snímku je patrný defekt po disekci prostor Ia, Ib, IIa, IIb a III

## Chirurgie nádorů podjazykové slinné žlázy a drobných slinných žláz

Nádory podjazykové slinné žlázy tvoří pouze 0,5-1 % všech nádorů slinných žláz. Tyto velice raritní nálezy jsou ale v 80-90 % maligní povahy. Malé nádory T1-T2 jsou odstraněny většinou chirurgickou resekci žlázy a dle potřeby rozšířenou na spodinu dutiny ústní. Větší nádory obnášejí často i parciální glossektomii nebo segmentální osteotomii těla mandibuly. Při histomorfologickém nálezu adenoidně cystického karcinomu je doporučována resekce linguálního

nervu jako profylaxe peri-a intraneurálního šíření tumoru mimo jeho makroskopické hranice [35]. Radikální chirurgická léčba je stejně jako u ostatních slinných žláz základem dobré prognózy. Samotná radioterapie vykazuje pouze 14% 5-ti leté přežití [36].

Mezi nádory malých slinných žláz dominuje četností adenoidně cystický karcinom následován mukoepidermoidním karcinomem. V léčbě je první volbou stejně jako u ostatních nádorů slinných žláz radikální resekční výkon s následnou adjuvantní radioterapií. U nádorů vycházejících z nosohltanu a sinonasálního traktu je dosažení negativních resekčních hranic velice iluzorní, proto u nich docází velice často k lokálním recidivám [37].



**Obr. 11** – Snímek vlevo ukazuje mukoepidermoidní low – grade karcinom malé slinné žlázy alveolu dolní čelisti vlevo (šipka). Snímek vpravo ukazuje stav po resekci tumoru s defektem alveolu dolní čelisti.(šipka)

### **Chirurgická specifika léčby adenoidně cystického a mukoepidermoidního karcinomu**

Adenoidně cystický karcinom je nejčastější malignitou všech malých slinných žláz faryngu a dutiny ústní. Studie uvádí 60% až 90 % četnost této nádorové jednotky mezi všemi maligními nádory malých slinných žláz. Oproti tomu studie Kakaraly [38] z let 1988-2005 uvádí jako nejčastější malignitu drobných slinných žláz dutiny ústní mukoepidermoidní karcinom. Již v roce

1998 Lopes ve své práci upozornil na nutnost 2-3 cm okraje makroskopicky zdravé tkáně v okolí resekátu adenoidně cystického karcinomu pro jeho neurotropismus – tzn. peri- a intraneurální šíření [39]. Vzhledem k anatomické blízkosti relevantních hlavových nervových kmenů k velkým slinným žlázám je proto dána tendence k neurálnímu šíření daleko do okolí. Není tedy překvapivé, že pozitivita resekčních okrajů u tohoto typu karcinomu dosahuje až 27 – 64 % [40].

Mukoepidermoidní karcinom (MEC) je na rozdíl od karcinomu adenoidně cystického lokalizován zejména v malých slinných žlázách dutiny ústní. Jeho výskyt v sinonasálním traktu či hrtanu je velmi vzácný. Proto oproti adenoidně cystickému karcinomu je většina těchto nádorů díky své lokalizaci zachycena v časných stádiích. Jen asi v 28 % se tento nádor šíří neurálně [41]. Chirurgická léčba MEC je tak úspěšnější a zároveň vyžaduje menší radikalitu než karcinom adenoidně cystický. Všeobecně je doporučováno zachovat asi 1 cm okraje makroskopicky zdravé tkáně [41]. Velkou roli v léčebné strategii mukoepidermoidního karcinomu hraje jeho grading.

Low-grade nádory vykazují minimální invazivitu do okolních tkání (obr. 11). Studie 18 pacientů s low-grade MEC patra provedená Ordem a Salamou neprokázala ani jednu infiltraci kosti [42]. Intermediate- a low-grade MEC je často spojen s perineurální propagací, ale přesto ani tyto varianty tumorů nemají doporučovány extenzivnější výkony. Pouze u high -grade nádorů a tumorů o velikosti nad 4 cm je indikována adjuvantní radioterapie [43].

### **Chirurgická léčba krčních metastáz maligních nádorů slinných žláz**

Stejně jako ostatní malignity dutiny ústní či obličeje jsou i nádory slinných žláz dle předoperačního stagingu a gradingu indikovány k disekcím lymfatických uzlin (obr. 12).

Krční disekce dělíme na:

*-elektivní* – profylaktické v dané oblasti

*-superselektivní* – odstranění fibrotukové a lymfatické tkáně z 1-2 oblastí

*-selektivní* – odstranění fibrotukové a lymfatické tkáně ze 3-4 oblastí



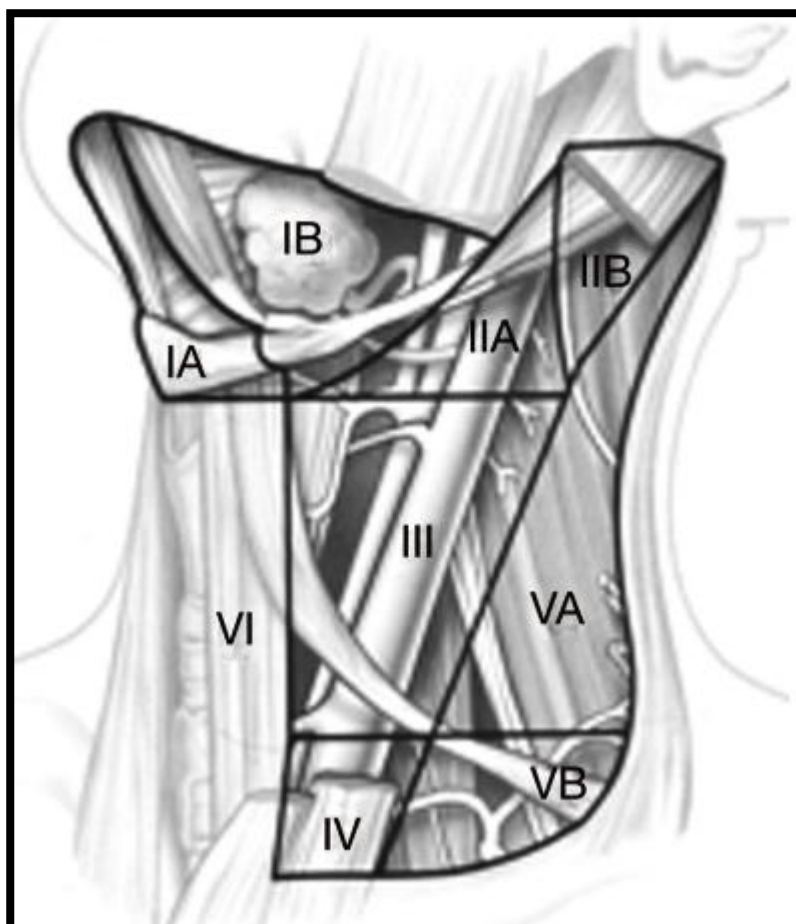
-*radikální modifikované* – odstranění tkání z oblastí I-V s ponecháním některé z anatomických struktur ( nervus accesorius, vena jugularis int, musculus sternocleidomastoideus ), při ponechání všech 3 struktur -funkční krční disekce

-*radikální* – odstranění všech struktur oblasti I-V, včetně výše uvedených 3 struktur

-*extendovaná radikální* - radikální + další anatomické struktury mimo oblast I-V

Na základě závěru předoperačního stagingu jsou krční disekce elektivní nebo terapeutické.

**Profylaktické (elektivní) disekce** jsou prováděny u negativních závěrů předoperačních zobrazovacích vyšetření (cN0). Naopak **terapeutické disekce** jsou indikovány při pozitivních lokoregionálních uzlinách (cN+).



**Obr. 12** schéma krčních oblastí: Ia submentální Ib submandibulární Ila jugulodigastrická Ilb horní část jugulární III střední jugulární IV dolní jugulární Va horní část zadního trojúhelníku Vb dolní část zadního trojúhelníku VI centrální prelaryngeální, pretracheální

U karcinomů příušní žlázy Klussman et al. v souboru 142 pacientů indikoval 52 terapeutických a 90 elektivních krčních disekcí [30]. V celé sestavě bylo 82 pacientů hodnoceno jako pN0 a 55 jako pN+, z toho 36 pacientů mělo pozitivní intraparenchymální uzlinu, ale jen 12 jich mělo zároveň krční metastázu. Z toho vyplývá, že krční metastázu mělo necelých 22 % pacientů. 25 % krčních metastáz bylo lokalizováno v úrovni II, 22 % v úrovni III, 19 % shodně v úrovni IV a V a nejméně 9 % v úrovni I [30]. Také ostatní studie zaměřené na lokalizaci krčních metastáz potvrzují nejčtenější procentuální zastoupení v úrovních II,III,IV. Jednotlivé studie se výrazně rozcházejí v hodnocení četnosti krčních metastáz dle lokalizace primárního karcinomu. Někteří autoři poukazují na výrazně vyšší procento krčních metastáz u nádorů příušní žlázy oproti nádorům vycházejícím z podčelistní žlázy a malých slinných žláz dutiny ústní. Recentní studie však prokazují téměř shodné procento krčních metastáz u různých lokalizací primárních nádorů [44]. Terapeutické krční disekce mají svojí jasnou indikaci v pozitivním předoperačním stagingu na základě zobrazovacího vyšetření.

Indikace k elektivním krčním disekcím stanovil Lombardi následovně [45].

**1. skupina** – minimální riziko okultní metastázy krku (low- risk tumor stadia T1-T2, mladý pacient) - doporučována jen dispenzarizace (“wait and see” postup )

**2. skupina** – vyšší riziko pro okultní metastázu krku (high -risk tumor stadia T1 a T2, vyšší věk pacienta) - doporučována jen elektivní radioterapie krku

**3. skupina** – vysoké riziko okultních metastáz krku (high grade tumor, T3- T4 velikost):

1. elektivní krční disekce – I-III pro submandibulární žlázu, Ib-IV pro příušní žlázu
2. elektivní radioterapie, zejména pokud je plánovaná adjuvantní radioterapie i oblasti primárního nádoru
3. superselektivní I-II nebo selektivní I-III krční disekce při negativním výsledku peroperačního histologického vyšetření suspektní uzliny a při pozitivním výsledku samozřejmě konverze výkonu na terapeutickou krční disekci v rozsahu I-V

### 1.8.2. Onkologická léčba

Stejně jako karcinomy kůže či sliznic vykazují i salivární karcinomy poměrně dobrou radiosenzitivitu, nikoliv však radiokurabilitu. Proto jako primární metodu používáme radioterapii pouze v případě inoperabilních nádorů či u pacientů, u kterých je operační řešení kontraindikováno s ohledem na celkový stav či závažné komorbidity [46 ].

Adjuvantní radioterapie má v určitých indikacích své nezastupitelné místo v léčbě pacientů se salivárními karcinomy v prevenci případné recidivy. Již v roce 1990 Armstrong ve své studii potvrdil výrazné snížení počtu recidiv u pacientů se salivárními malignitami stadia III a IV s provedenou adjuvantní radioterapií [47]. Pětiletá lokální kontrola choroby se u operovaných pacientů s adjuvantní radioterapií zlepšila na 51 % oproti 17 % bez radioterapie a celkové přežití se zvedlo na 51 % oproti 10 % u skupiny léčené pouze chirurgicky [47]. Aktuální guidelines uvádějí následující indikace k adjuvantní radioterapii: high grade tumory, pokročilá stadia (T3, T4 nebo N pozitivní), perineurální, vaskulární či lymfatické šíření, pozitivní resekční okraje, extrakapsulární invaze – infiltrace kůže nebo jiných okolních anatomických struktur. U adenoidně cystického karcinomu jakékoliv lokalizace je doporučována adjuvantní radioterapie i u nádorů T2.

Chemoterapie je v současné době v léčbě salivárních maligních nádorů používána zejména s paliativním záměrem. To znamená, že tato modalita léčby je indikována u vzdálených metastáz či lokoregálních recidiv neřešitelných revizní chirurgií či radioterapií. Z různých chemoterapeutik je nejvíce vyzkoušena kombinace CAP – cyklofosfamid, adriamycin, cisplatina event. ještě s 5-fluorouracilem. Studie zahrnující pacienty s adenoidně cystickým karcinomem a adenokarcinomem NOS vykazovaly až v 80 % alespoň parciální odpověď na léčbu [48]. Ostatní chemoterapeutika byla podávána malému počtu pacientů nebo procentuální odpověď na léčbu byla téměř minimální. Jako adjuvantní léčba cisplatinou nebo výše uvedenou kombinací CAP je chemoterapie používána v konkomitanci s radioterapií. Výrazným limitem této léčby je její toxicita [49].

Další možností léčby je cílená terapie. Její použití plyne z rozvoje molekulární genetiky. Ve studiích zejména v rámci paliativní léčby je zkoušeno velké množství cílených protilátek. V této práci proto zmiňují pouze ty, které přinesly alespoň parciální odpovědi v léčbě.

**Imatinib** – 90 % adenoidně cystických karcinomů vykazuje overexpresi c-kit tyrosine kinase receptor, protilátka v léčbě vykazovala objektivní odpovědi [50].

**Cetuximab** – monoklonální protilátka anti-EGFR, při léčbě adenoidně cystického karcinomu se dosahuje jen minimální odpovědi [51].

**Trastuzumab** – anti HER2 monoklonální protilátka. Amplifikace HER2/neu genu a overexprese stejnojmenného receptoru byla prokázány pouze u salivárního duktálního karcinomu [52, 53, 54, 55]. Při této léčbě byly pozorovány parciální odpovědi, zkoušena je i kombinace s chemoterapií.

V souvislosti s pozitivitou androgenních receptorů u SDC je využívána i antiandrogenní deprivace léčba. Studie Boona z roku 2017 uvádí soubor 34 pacientů léčených touto antihormonální terapií. Šest pacientů (tj. 18 %) mělo po léčbě parciální remisi, u 11 (32 %) došlo ke stabilizaci onemocnění. Střední hodnota doby bez progresu byla u léčby 4 měsíce a median trvání klinického přínosu byl 11 měsíců. Medián celkového přežití byl 17 měsíců oproti 5 měsícům u 43 pacientů léčených nejlepší podpůrnou léčbou. [56, 57, 58].

### **1.9. Prognostické faktory- klinické, histomorfologické a molekulární**

Nádory velkých slinných žláz mají všeobecně lepší prognózu než nádory malých slinných žláz. Stejně tak je to mezi příušní žlázou a žlázou podčelistní a podjazykovou.

K negativním klinickým a patomorfologickým prognostickým faktorům salivárních karcinomů patří lokální pokročilé stadium nádoru (T3, T4), předoperační léze lícního nebo jiného hlavového nervu, pozitivita krčních uzlin, vysoký věk pacienta, perineurální šíření, pozitivní chirurgický okraj a high- grade morfolgie. [59, 60]

Prognózu salivárních karcinomů výrazně zhoršuje jejich vysoká mitotická aktivita. Imunohistochemické vyšetření protilátkou MIB1 proti nukleárnímu antigenu Ki-67 lze využít k zpřesnění gradingu a k odhadu prognózy u acinického [61] a mukoepidermoidního karcinomu [62].

## **2. Cíl disertační práce**

Aktuálním problémem v terapii karcinomů slinných žláz je špatná prognóza jejich biologicky vysoce rizikových forem. K nim patří i salivární duktální karcinom, který je ve skupině maligních nádorů slinných žláz zastoupen jen asi 10 %. Typická lokalita je pro něj příušní žláza, s nejčastějším výskytem u starších mužů. V malých slinných žlázách se objevuje minimálně, asi v 30 % bývá lokalizován v submandibulární žláze. Salivární duktální karcinom vzniká buď de novo nebo sekundárně jako karcinom z pleomorfního adenoma (asi ve 20 %). Histomorfologicky je podobný invazivnímu duktálnímu karcinomu prsu. Stejně jako jeho mamární analog je tvořen

uzly, pozůstávajícími z kribriformních solidních, cystických nebo papilárních struktur. Vzácněji se objevuje desmoplastická forma, popsány jsou i nekrózy či kalcifikace. SDC je vysoce agresivní maligní nádor. Velice rychle progreduje, je pro něj typická perineurální a lymfovaskulární invaze a extrakapsulární infiltrace [63]. Díky těmto vlastnostem je nádor podchycen často až v pokročilém stadiu IV nejen s lokoregionálními, ale i vzdálenými metastázami, lokalizovanými většinou v kostech nebo plicích. Pětileté přežívání se pohybuje asi okolo 50 %. viz tabulka č.11. Klasifikace této nádorové entity se postupně vyvíjela zejména na základě průkazu HER2 neu markeru [64,65]. Takase klasifikoval tento karcinom do 5 skupin dle jeho imunohistochemických parametrů a prokázal, že tato klasifikace má prognostický význam [66].

Cílem předkládané práce bylo:

1. Zjistit prognostický význam vybraných klinických a imunohistochemických parametrů u pacientů s SDC.
2. Zjistit expresi vybraných imunohistochemických a genetických markerů a stanovit jejich význam v histopatologické diferenciální diagnóze salivárních karcinomů.
3. Ověřit prognostický význam Takaseho imunohistochemické klasifikace salivárního duktálního karcinomu.

Práce by měla být přínosná pro objasnění onkogenetických mechanismů vzniku tohoto nádoru. Tato informace by pak mohla otevřít cestu k jejich cílené biologické léčbě.

### **3. Materiály a metodika vlastního výzkumu**

Pomocí klinických informačních systémů PC DENT (CompuGroup Medical Česká republika s.r.o., verze 3.1.1, revise 6), WinMedicalc (Medicalc software s.r.o., Česká republika, verze 2.10.8.46) a WinZis (Prodata Praha s.r. o., Česká Republika) jsme vyhledali pacienty s diagnózou salivárního duktálního karcinomu, kteří byli léčeni ve Fakultní nemocnici v Plzni (Stomatologická a ORL klinika) od ledna 1987 do června 2018. Zaznamenávali jsme tyto klinické parametry: věk, pohlaví, lokalizace nádoru, klinické stadium v době diagnózy, přítomnost regionálních a vzdálených metastáz, léčba a následné přežití. Klinické stadium v době diagnózy bylo stanoveno dle 8. vydání TNM klasifikace [10].

Do souboru bylo původně zařazeno 29 případů salivárního duktálního karcinomu, tři případy pak byly při histopatologické revizi reklasifikovány, celkově tak sestava čítá 26 pacientů. Tkáňové vzorky byly získány z Registru nádorů slinných žláz Šiklova ústavu patologie Lékařské fakulty v Plzni a Biopstické laboratoře, s.r.o v Plzni. Pro účely konvenční mikroskopii byly excidované tkáně fixovány formalínem, rutinně zpracovány a zality do parafínu. Z bloků byly ukrojeny řezy o síle 4  $\mu\text{m}$  a barveny rutinně hematoxylinem-eosinem (HE).

Pro účely imunohistochemického (IHC) vyšetření byly z bloků ukrojeny řezy o síle 2  $\mu\text{m}$  a přeneseny na pozitivně nabitá skla (TOMO, Matsunami Glass IND, Japan). Řezy byly deparafinizovány xylenem a zavodněny v sestupné řadě etanolu. Demaskování antigenních epitopů bylo provedeno ponořením do CC1 roztoku (EDTA pufr) o pH 8,6 a zahřátím na teplotu 95°C po dobu 64 minut. Endogenní aktivita peroxidázy byla zablokována ponořením řezů do 3 % roztoku peroxidu vodíku v absolutním methanolu na dobu 5 minut. Následně byly přidány primární protilátky uvedené v tabulce 9 a inkubovány v autosteineru Ventana BenchMark ULTRA (Ventana Mediclas System, Tucson, AZ, USA) při teplotě 37°C na dobu 40 minut. Pro vizualizaci primárních protilátek byla použita alkalická fosfatáza (Ventana Medical Systems). Řezy byly nakonec dobarveny Mayerovým hematoxylinem. Pro každé vyšetření byly použity vhodné pozitivní vnější kontroly.

Název protilátky	Klon	Ředění	Identifikace protilátky/čas	Zdroj
S-100 protein	Polyclonal	RTU	CC1/20 min	Ventana
CK7	OV-TL 12/30	0,18056	CC1/36 min	Dako Cytomation
P63	4A4	RTU	CC1/64 min	Ventana
DOG-1	SP31	RTU	CC1/52 min	Cell Marque
GATA-3	L50-823	0,18056	CC2/56 min	BioCare Medical
SOX 10	Polyclonal	0,11111	CC1/64 min	Cell Marque
MIB1	30-9	RTU	CC1/64 min	Ventana
AR	SP107	RTU	CC1/64 min	Cell Marque
CK 14	SP53	RTU	CC1/64 min	Cell Marque
EGFR	5B7	RTU	CC1/52 min	Ventana
c-kit	Polyclonal	0,59722	CC1/64 min	Ventana
P40	Polyclonal	RTU	CC1/52 min	Biocare Medical
CK5/6	D5/16B4	1:50	CC1/36 min	Dako Cytomation
PLAG1	3B7	1:50	CC1/64 min	Sigma-Aldrich

**Tabulka 9 – Imunohistochemické markery použité pro diagnostiku HG salivárních karcinomů**

*RTU - ready to use, připraveno k použití, CC1 – EDTA pufr, pH 8.6, CC2-citrátový pufr, pH 6*

### **Kriteria pro hodnocení histologických a imunohistochemických vyšetření**

Všechny vzorky byly revidovány nezávisle dvěma patologi se specializací na nádory hlavy a krku (AS a TS). Diagnóza SDC byla stanovena podle současně platné WHO klasifikace 2017 [63].

Za HER2/neu pozitivní byly dle kritérií ASCO/CAP (American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists) považovány nádory jevící membránovou pozitivitu ve více než 10 % nádorových buněk. [64]. Pouze jaderná exprese byla hodnocena u AR a

GATA3, za S100 pozitivitu bylo považováno silné jaderné i cytoplazmatické barvení. Kritériem positivity cytokeratinů CK5/6 byla střední až silná cytoplazmatická reakce v neoplastických buňkách. Pro MIB1 (Ki-67) byla jako pozitivní hodnocena jaderná reakce, jejíž úroveň byla vyjádřena v procentech (proliferačním indexem). Případy s hodnotou nižší než 40 % byly považovány za karcinomy s nízkou proliferační aktivitou. Případy s proliferačním indexem vyšším než 40% jako nádory vysoce proliferující. IHC vyšetření detekující všechny ostatní antigeny byla hodnocena jako pozitivní, pokud více než 10 % nádorových buněk vykazovalo imunoexpresi hodnoceného markeru.

Prognostický význam u většiny imunohistochemických marker byl hodnocen u každého zvlášť. AR, HER2/neu a MIB byly použity společně v recentní klasifikaci dle Takaseho, která tento nádor rozděluje do 5 kategorií. [66].

- a. Apokrinní typ A (AR+/HER2-/ MIB1-low)
- b. Apokrinní typ B (AR+/HER2-/ MIB1-high)
- c. Apokrinní typ HER2 (AR+/HER2+)
- d. HER-2 obohacený typ (AR-/HER2+)
- e. Dvojitě negativní typ (AR-/HER2-)

#### ***Metodika fluorescenční in situ hybridizace (FISH)***

Na průkaz amplifikace genu *HER2/neu* metodou FISH byly z parafinového bloku ukrojeny 4 µm silné řezy na pozitivně nabitá podložní skla. Řezy byly deparafinizovány ve dvou lázních xylenu po pěti minutách, dvou lázních 96 % etanolu po dvou minutách a vloženy do destilované vody po dobu pěti minut. Řezy byly poté inkubovány v roztoku Target Retrieval Solution pH 6 (DAKO, Glostrup, Dánsko) při 95 °C po dobu 40 minut, následně 20 minut chlazeny v témže roztoku a promyty destilovanou vodou na 5 minut. Poté byly řezy natráveny při 37 °C po dobu 45-60 minut (dle stavu tkáně) v roztoku v 0,01M HCl s 0,5 mg/ml pepsinu (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) a poté promyty v destilované vodě po 5 minut. Odvodnění bylo provedeno vzestupnou řadou etanolů (70%, 85% a 96%) po dvou minutách a řezy byly dosušeny na vzduchu.



Pro detekci amplifikace *HER-2* byla použita sonda PathVysion *HER-2* DNA Probe Kit (Vysis/Abbott Molecular, Illinois, USA), popř. sonda *ZytoLight*® SPEC ERBB2/D17S122 Dual Color Probe (ZytoVision GmbH, Bremerhaven, Německo).

Dle velikosti preparátů bylo odpovídající množství sondy naneseno na preparáty, které byly překryty krycími skly, uzavřeny rubber cementem a inkubovány v přístroji ThermoBrite (StatSpin/Iris Sample Processing, Westwood, MA, USA). Kodenaturace probíhala při 85 °C po dobu 8 minut a hybridizace při 37 °C po dobu 16 hodin. Po vyjmutí z ThermoBrite přístroje byly řezy, po odstranění rubber cementu a krycího sklíčka, promyty v posthybridizačním roztoku 2xSSC/0,3% NP-40 (VYSIS/Abbott) při 72 °C po dobu 2 minut. Skla byla po oschnutí ve tmě obarvena DAPI I (VYSIS/Abbott), překryta krycím sklem a okamžitě odečítána.

Pro interpretaci výsledků byl použit fluorescenční mikroskop Olympus BX51 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) při 100x zvětšení s použitím filtrů Triple Band Pass (DAPI/SpectrumGreen/SpectrumOrange), Dual Band Pass (FITC/Texas Red) a Single Band Pass (SpectrumGreen or SpectrumOrange). Preparáty byly hodnoceny dle instrukcí od výrobců a dle ASCO/CAP doporučení pro hodnocení *HER2/neu* [59].

### ***Metodika masivního paralelního sekvenování, NGS (Next-generation sequencing)***

#### **Příprava vzorku pro NGS**

Z parafinového bloku byly ukrojeny 2 až 3 řezy o tloušťce 10 µm, a z nich byla makrodisekcí odebrána do mikroskopu příslušná oblast nádoru. Ze vzorků byly extrahovány nukleové kyseliny (DNA i RNA) s použitím Agencourt FormaPure Kitu (Beckman Coulter, Brea, CA) dle standardizovaného protokolu. Lýza probíhala přes noc a byla přidána inkubace při 80°C po dobu 1 hodiny dle modifikace protokolu firmy ArcherDX (ArcherDX Inc., Boulder, CO). Nukleové kyseliny byly kvantifikovány s použitím Qubit Broad Range RNA Kitu (Thermo Fisher Scientific).

#### **Hodnocení integrity RNA a příprava sekvenační knihovny**

Pro přípravu knihovny bylo použito 250ng RNA. Aby byla generována míra pro integritu RNA, kontrola kvality RNA byla provedena pomocí PreSeq RNA QC Assay použitím iTaq Universal SYBR Green Supermix (Biorad, Hercules, CA) u všech vyšetřovaných vzorků. Integrita se měří

ve formě prahové hodnoty cyklu (Ct value) a nejnižší povolená hodnota Ct byla stanovena na 30 cyklů. Příprava knihovny a kontrola kvality RNA byla provedena podle Archer Fusion Plex protokolu pro platformu Illumina (ArcherDX Inc.). Finální knihovna byla zředěna v poměru 1:100 000 a kvantifikována v 10  $\mu$ L směsi podle protokolu Library Quantification pro Illumina knihovny, kdy byla předpokládána délka fragmentů 200 párů bází (KAPA, Wilmington, MA). Koncentrace finální knihovny by se měla pohybovat kolem 200 nM. Limit minimální koncentrace, při které může být sekvenování úspěšně provedeno byl stanoven na 50 nM.

### **NGS sekvenování a analýza**

Knihovny byly sekvenovány na sekvenátoru Nextseq 500 (Illumina, San Diego, CA). Knihovny byly ředěny na 4 nM a stejné množství všech knihoven bylo smícháno a vloženo do jednoho sekvenačního běhu. Doporučené minimální množství klastrů na jeden vzorek bylo stanoveno na 500 000. Sekvenační knihovna byla poté ředěna na 1,8 pM a byly přidány 2% kontrolní knihovny PhiX a směs byla naložena do sekvenační cartridge. Analýza výsledků sekvenace byla provedena pomocí Archer Analysis softwaru (v5; ArcherDX Inc.). Parametry pro vyhodnocení validní pozitivivity detekce fúzního produktu byly nastaveny na minimálně na 5 čtení s fúzním transkriptem s minimálně 3 různými počátečními místy.

## 4. Výsledky

Do retrospektivní studie bylo zařazeno 26 pacientů (22 mužů a 4 ženy) s primární histopatologickou diagnózou salivárního duktálního karcinomu. Všichni byli vyšetřeni, léčeni a sledováni od roku 1987 do srpna 2018 ve FN Plzeň. Stáří nemocných se pohybovalo od 24 do 95 roků, průměrný věk činil 66 ( $\pm 12$ ), median 65 let. Šestnáct pacientů mělo primární nádor lokalizovaný v příušní žláze, 10 případů bylo lokalizovaných v podčelistní žláze. Čtrnáct pacientů v našem souboru (54 %) bylo diagnostikováno v pokročilém stadiu choroby IV. Přítomnost větších nádorů velikosti T3 a T4 byla zjištěna u 15 pacientů (58 %) pacientů, N+ nález na lokoregionálních uzlinách byl u 14 (54 %) pacientů. Veškeré údaje ohledně stagingu, léčby a průběhu nemoci jsou shrnuty v tabulce 18 (na konci oddílu výsledky). Shrnutí základních klinických charakteristik všech pacientů je uvedeno v tabulce 10.

Tři případy z původního souboru byly reklasifikovány jako sekreční karcinom, anaplastický karcinom a adenokarcinom NOS. Recidivující HG karcinom rtu u 78-leté muže (případ 7) byl reklasifikován jako HG sekreční karcinom (SC) na základě nálezů *ETV6-NTRK3* fúze metodou NGS. Další případ HG karcinomu parotis u 76-letého muže (případ 11) vykazoval pro SDC neobvyklý imunoprofil s expresí cytokeratinů CK5, CK14, markerů P63, MIA a EGFR; zatímco cytokeratin CK7, S100, calponin, c-kit, *HER-2/neu* a AR byly negativní. Karcinom byl proto reklasifikován jako HG anaplastický karcinom. Konečně poslední případ, který se vymykal diagnostickým kritériím pro SDC, byl HG karcinom parotis u 54-letého muže (případ 13). Nádor obsahoval zbytky pleomorfního adenomu. Nádorové buňky byly kompletně negativní na průkaz p63, S100, AR a *HER-2/neu*, a karcinom byl proto finálně hodnocen jako hodnocen jako HG karcinom ex PA nespecifického typu (NOS). Soubor pacientů s diagnózou SDC se proto dale týkal pouze 26 případů.

Čtyři pacienti (15 %) z tohoto souboru žijí bez známek choroby (NED), 6 (26 %) pacientů žije s chorobou (AWD), 12 (46 %) pacientů umřelo na následky základní diagnózy SDC (DOD), 3 (12 %) pacienti umřeli v důsledku jiné komorbiditity (DOC) a u jednoho pacienta nebylo možné zjistit další data ohledně follow up.

<b>Parametr</b>	<b>Počet pacientů s HG SC No - 29</b>	<b>Počet pacientů s SDC No - 26</b>
<b>Věk</b>		66 (24-95)
<b>Pohlaví</b>		
Muž	25	22
Žena	4	4
<b>Lokalizace</b>		
Příušní žláza	18	16
Submandibulární žláza	10	10
Malé slinné žlázy	1	0
<b>velikost nádoru</b>		
T1	5	5
T2	6	6
T3	9	9
T4	9	6
<b>lokoregionální meta</b>		
N0	14	12
N1	3	3
N2	12	11
N3	0	0
<b>vzdálené meta</b>		
M0	23	21
M1	6	5
<b>stadium choroby</b>		
I	3	3
II	3	3
III	6	6
IV	17	14

**Tabulka 10. Klinická charakteristika původního souboru 29 pacientů s high grade karcinomy slinných žláz a vlastního souboru 26 pacientů s SDC**

Publikované studie uvádějí, že salivární duktální karcinom je spojen s vysokým výskytem (55-74 %) uzlinových metastáz. Údaje o vzniku lokální a regionální recidivě výrazně kolísají mezi 11-48 %, resp. 8-26 %. Oproti tomu údaje o vzdálených metastázách a pěti-letém přežití jsou poměrně vyrovnané, pohybují se mezi 38-63 %, resp. 41-59 %. Z údajů o terapii je zřejmé, že u většiny nemocných byla součástí chirurgické léčby bloková disekce krční (tabulka 11).

Autor	počet případů	N+	Léčba			lokální recidiva	regionální recidiva	vzdálené meta	5-leté přežití %
			chirurgie, ND-krční blok	RT					
Jaehne 2005 [67]	50	56%	49 /ND 38	36	48%	8%	48%	44%	
Weon 2012 [68]	20	55%	17 /ND 12	13	30%	25%	47%	58%	
Kim 2012 [69]	35	74%	35/ ND 31	35	11%	26%	38%	55%	
Salovaara 2013 [70]	25	60%	25 /ND 21	25	28%	16%	48%	41%	
Shinoto 2013 [71]	35	74%	35 /ND 31	35	11%	26%	38%	55%	
Roh 2014 [72]	56	71%	52??	47	13%	16%	63%	42%	

**Tabulka 11. Přehled klinických dat několika prací publikovaných od roku 2005**

**Zdroj :** Johnston ML, et al. Salivary duct carcinoma: Treatment, outcomes, and patterns of failure. Head & Neck 2016 [73]

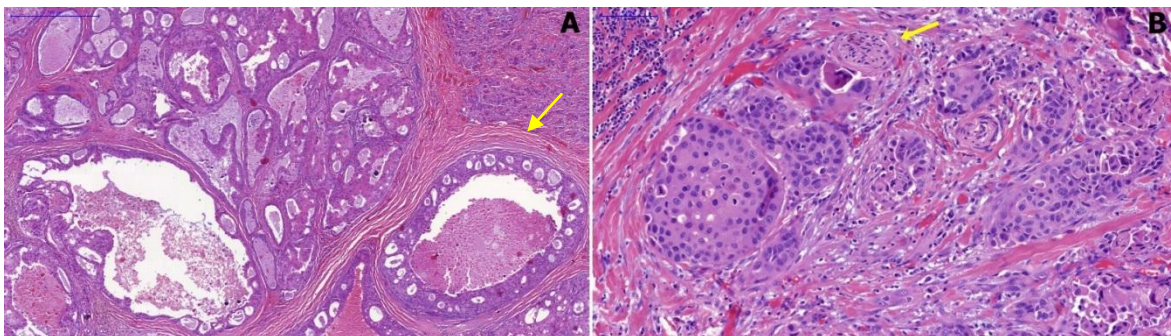
Ve srovnání s těmito údaji je zřejmé, že v našem souboru jsme provedli relativně méně krčních disekcí (tabulka 12). Bylo to dáno tím, že pouze 14 pacientů bylo cN+ a jen u poloviny z nich byla provedena kurativní bloková disekce jako součást chirurgické léčby. Ostatní byli pro generalizaci tumoru či nebo špatný celkový stav léčeni pouze paliativně či symptomatologicky. Elektivní disekci u našich 12 pacientů s cN0 nálezem jsme neprovedli, neboť u 6 z nich bylo stanoveno stádium T1/2, které podle názorů Lombardiho [45] není k tomuto výkonu indikováno. Dalších 6 pacientů s uvedeným výkonem nesouhlasilo.

Autor	počet případů	N+	chir.léčba	RT	lokální recidiva	regionální recidiva	vzdálené meta	5-leté přežití %
Andrle 2019	26	54% N+ 50% IV.st.	23 ND 7	19	27%	31%	38%	33%

**Tabulka 12 – vyhodnocení klinických parametrů naší studie jako srovnání z výše zmíněnými studiemi v Tabulce 11.**

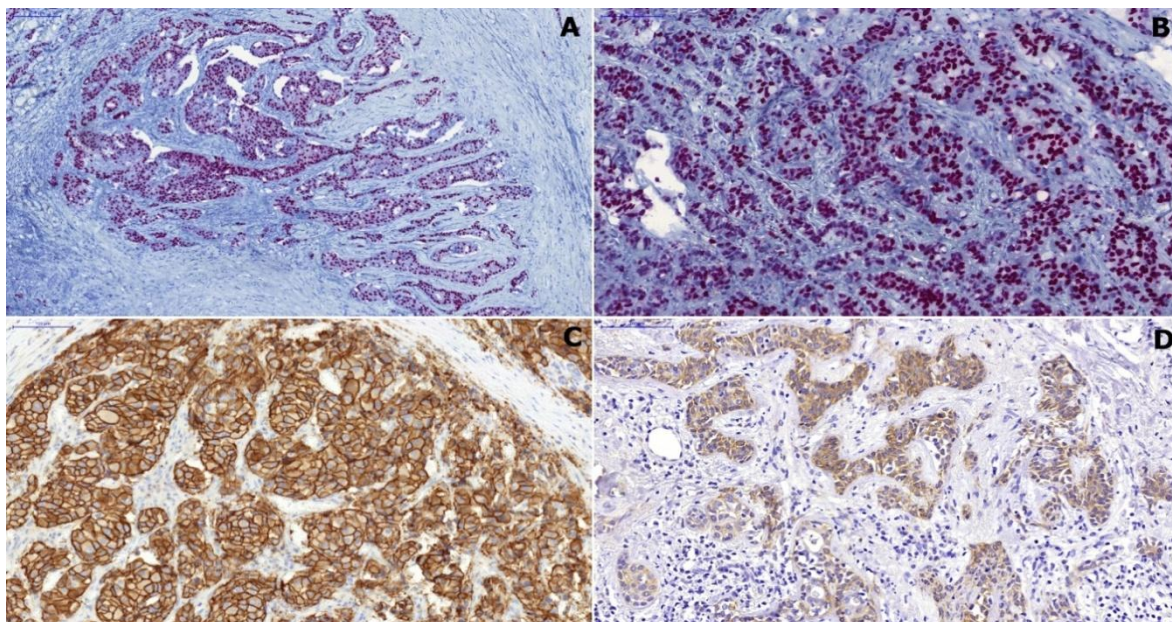
### **Histologická klasifikace a imunoprofil studovaného souboru SDC**

Histologicky se jednalo o *de novo* vzniklý salivární duktální karcinom (SDC) u 13 pacientů (50%) u zbylé poloviny vznikl karcinom z pleomorfního adenomu. Histomorfologicky byly SDC charakterizovány nádorovými buňkami uspořádanými do hnízd, tubulů či v agregátech tvaru kanálku. Neoplastické buňky vykazovaly apokrinní diferenciaci, pleomorfismus, hyperchromasii a časté mitózy. Nádorové stroma bylo desmoplastické, epitel obsahoval četné komedonekrózy (obr. 13).



**Obr. 13** Typický histomorfologický obraz SDC. (A) SDC s dilatovanými dukty v hyalizovaném stroma a komedonekrozami v epitelu (šipka ). (B) buňky SDC s velkými pleomorfními jádry a eosinofilní cytoplasmou. Šipkou je označena perineurální invaze.

Imunohistochemicky byly studované případy SDC pozitivní na průkaz cytokeratinů CK5/6, *HER-2/neu*, AR, GATA3 a negativní pro S100 a p63. Imunohistochemické nálezy v jednotlivých studovaných karcinomech a jeho stratifikaci dle typu uvádí tabulka 13. Příklady typických pozitivních imunohistochemických reakcí v SDC jsou ukázány na obr. 14.



**Obr. 14** obrázky pozitivních imunohistochemických reakcí (A) Androgenní receptor –difuzní jaderné barvení (B) GATA3 – difuzní jaderné barvení (C) HER2/neu –difuzní, silné membranozní barvení (D) CK5/6 – cytoplasmatická exprese

	počet pacientů	%
<b>SDC klasifikace</b>		
1. apokrinní A	3	11,54%
2. apokrinní B	4	15,38%
3. apokrinní HER2+	16	61,54%
4. HER2 +	1	3,85%
5. double negativní (AR-, HER2-)	2	7,69%
Celkem	26	100%
<b>AR exprese</b>		
Negativní	3	12%
Pozitivní	23	88%
Celkem	26	100%
<b>HER2/neu exprese</b>		
Negativní	9	34,62%
Pozitivní	17	65,38%
Celkem	26	100%
<b>GATA3 exprese</b>		
Negativní	7	26,92%
Pozitivní	19	76,08%
Celkem	26	
<b>CK5/6 exprese</b>		
Negativní	4	29,5%
Pozitivní	12	70,5%
Celkem	17	
<b>MIB1 exprese</b>		
nízká<40%	5	20%
vysoká>40%	20	80%
Celkem*	25	100%
<b>HER2/neu amplifikace</b>		
Negativní	8	54%
Pozitivní	7	46%
Celkem	15	100%

**Tabulka 13 – Revidovaná klasifikace SDC na základě exprese biomarkerů: Souhrn výsledků imunohistochemického vyšetření \* V 1případě nebyl MIB1 index hodnocen**



Klinické charakteristiky, výsledky vyšetření imunohistochemických a onkogenetických markerů u jednotlivých pacientů se SDC jsou sumarizovány v tabulce 15.

Pětileté přežití bylo hodnoceno pouze u 21 pacientů, protože 5 dosud žijících nemocných v době dokončení sběru dat nedosáhlo požadované hranice 5-ti let od stanovení diagnózy. Pět let přežilo 33 % (tj. 7 z 21) pacientů. Průměrný věk byl 64 let ( $\sigma \pm 15$  let, Me 63,5 let) 22 mužů a 4 ženy. Z nich 2 byli v klinickém stádiu T1/2, ostatních 5 ve stádiích pokročilejších (T3/4) (tabulka 14). Všichni probandi z této skupiny měli pozitivní AR receptor a vysoký (pozitivní) proliferační index MIB. U 5 pacientů byl pozitivní HER2 marker imunohistochemicky, ale exprese genu HER2 u genu byla v této skupině provedena pouze u 3 pacientů. AR pozitivita a vysoká exprese MIB indexu byla v této skupině 100%, oproti 80 % (AR) resp. 85 % (MIB) u skupiny 14 pacientů, kteří měli přežití méně než 5 let. Exprese HER2/ neu receptoru byla téměř totožná. Ve skupině s 5-ti letým přežitím bylo 72 % pacientů pozitivních, ve druhé skupině bylo pozitivních 79 % vyšetřovaných. Z těchto čísel není zřejmý žádný signifikantní rozdíl v imunohistochemickém vyšetření obou skupin. Vzhledem k malé velikosti souboru pacientů s 5-ti letým přežitím a minimálním procentuálním rozdílem exprese markerů nebyla tato data dále statisticky zpracována. Rozdíl, který je ale v klinických datech zřejmý, je počet pacientů s uzlinovými metastázami. V souboru s 5-ti letým přežitím byl pouze 1 pacient s N+, ze 14 nemocných s kratší dobou přežití jich bylo 9 N+. Z těchto čísel lze usuzovat, že N+ je negativní prognostický faktor.

	lokalita	TNM/st.	Léčba	AR	MIB/G	HER2 /IHC	HER2/FISH
1	submand.	T2N2M0/ IVa	CH+ CHRT	+	60%	2+	-
2	parotis	T2N0M0/ II	CH+RT	+	70%	1+	-
3	parotis	T30M0/ III	CH+CHT	+	40%	3+	+
4	parotis	T3N0M0/ III	CH+RT	+	40%	2+	NA
5	parotis	TxN2M0/ IVa	CH+CHRT	+	40%	-	NA
6	parotis	T3N0M0/ III	CH+RT	+	40%	-	NA
7	submand.	T1N0M0/ I	CH+RT	+	60%	3+	NA

**Tabulka 14 – Korelace klinických a imunohistochemických údajů u pacientů se SDC s 5-ti letým přežitím**

CH- chirurgická léčba, CHT – chemoterapie, RT – radioterapie, CHRT – konkomitantní chemoradioterapie

Případ	Pohlaví	Věk	Diagnoza	Lokalita	AR	MIB 1	HER2	HER2/neu amplifikace (FISH)	GATA 3	CK5/6	TNM	Klasifikace	Follow up
1	M	60	SDC	Submandibulární žl.	+	60%	2+	-	+	+	T2N2bM0	AR+/HER+	9let NED
2	M	79	SDC	Submandibulární žl.	+	40%	2+	-	+	+	T3N1M0	AR+/HER+	25 měs. DOD
3	M	77	SDC	Parotis	+	60%	3+	+	-	ND	T4N2Mx	AR+/HER+	3 měs. DOD
4	M	63	SDC ex PA	Parotis	-	70%	-	-	+	+	T2N0M0	d.neg	7 let DOD
5	F	49	SDC ex PA	Submandibulární žl.	+	80%	2+	-	-	+	T1N0M0	AR+/HER+	30 měs. DOD
6	M	59	SDC ex PA	Parotis	+	50%	-	NA	+	-	T2N0M0	Ap.B	17měs. DOD
7	M	83	SDC ex PA	Parotid	+	40%	3+	+	ND	ND	T3N0M0	AR+/HER+	5let DOC NED
8	F	55	SDC ex PA	Parotis	+	40%	2+	ND	-	+	T3N0M0	AR+/HER+	5 let NED
9	M	52	SDC	Submandibulární žl.	+	40%	3+	+	+	-	T3N0M1	AR+/HER+	51 měs. DOD
10	F	85	SDC ex PA	Parotis	-	70%	1+	ND	-	+	T3N2bM1	HER+	5 měs. DOD
11	M	69	SDC ex PA	Parotis	+	40%	-	NA	-	+	TxN2M0	Ap.B	60 měs. DOC NED
12	M	86	SDC	Parotis	+	40%	3+	+	+	ND	T4N0Mx	AR+/HER+	15 měs. DOC WD
13	M	60	SDC	Submandibulární žl.	+	80%	-	-	+	-	T2N0Mx	Ap.B	30 měs. DOD
14	F	54	SDC	Submandibulární žl.	+	40%	3+	+	+	+	T1N2Bm1	AR+/HER+	36 měs. DOD
15	M	53	SDC ex PA	Parotis	+	30%	3+	ND	+	ND	T4N2aM0	AR+/HER+	1 měs. DOD
16	M	66	SDC	Parotis	-	40%	-	ND	+	+	T3N0Mx	d.neg	5 let AWD

17	M	60	SDC ex PA	Parotis	+	ND	3+	ND	+	ND	T3N0Mx	AR+/HER+	NA
18	M	95	SDC	Submandibulární žl.	+	25%	2+	-	+	ND	T4aN2bM1	AR+/HER+	2 měs. DOD
19	M	24	SDC	Submandibulární žl.	+	55%	3+	ND	+	ND	T3N1M0	AR+/HER+	3 roky AWD
20	M	61	SDC ex PA	Submandibulární žl.	+	45%	-	-	-	+	T4aN2bM1	Ap.B	24 měs. NED
21	M	64	SDC ex PA	Parotis	+	15%	-	ND	+	ND	T1N0M0	Ap.A	12 měs. NMED
22	M	89	SDC ex PA	Parotis	+	35%	-	ND	+	ND	T4aN1M0	Ap.A	3 roky AWD
23	M	63	SDC	Parotis	+	30%	-	-	-	+	T3N2bM1	Ap.A	NED Th
24	M	65	SDC	Parotid	+	50%	3+	+	+	+	T2N2bM1	AR+/HER+	NED Th
25	M	73	SDC	Parotis	+	40%	3+	+	+	ND	T2N2bM1	AR+/HER+	3 roky DOD
26	M	70	SDC ex PA	Submandibulární žl.	+	60%	3+	ND	+	-	T1N0M0	AR+/HER+	5 let AWD

**Tabulka 15 – Detailní klinickopatologické, imunohistochemické charakteristiky 26 pacientů s SDC**

**Do tabulky nebyly záměrně použity výsledky S100 a p63, protože byly všechny negativní.**

ND – není zhotoveno, NA – nelze analyzovat, AWD – Alive with disease (žije s chorobou), DOD – Died of diseases (umřel v důsledku choroby), DOC – Died of other causes(umřel z jiné příčiny), NED – No evidence of disease (žije bez choroby), Th – probíhající léčba

Ap.A – apokrinní typ A, Ap.B – apokrinní typ B, AR+/HER+ - apokrinní typ s expresí AR i HER, HER + - overexpre pouze HER 2 (AR-/HER+ ), d.neg. – AR i HER 2 negativní

## **Klasifikace SDC založená na profilování imunomarkerů**

Po analýze imunohistochemických výsledků bylo 26 případů klasických SDC rozděleno dle publikovaných kritérií do 5-ti subtypů, [65, 66, 74]. Následující kategorie SDC byly identifikovány: a. Apokrinní typ A (AR+/HER2-/ MIB1-low) b. Apokrinní typ B (AR+/HER2-/ MIB1+high) c. Apokrinní typ HER-2 (AR+/HER2+) d. HER2 bohatý typ (AR-/HER2+) e. Dvojitě negativní typ (AR-/HER2-). Počty případů SDC jednotlivých kategorií a korelace s klinickým průběhem jsou v detailu uvedeny v tabuce 16.

**Apokrinní typ A** (AR+/HER2-/ MIB1-low) značí karcinomy, které vykazují silnou difúzní jadernou expresi androgenních receptorů. Nádory jsou negativní na průkaz membránové exprese HER2 a většinou mají nízkou proliferační aktivitu (méně než 40%) [75].

**Apokrinní typ B** (AR+/HER2-/ MIB1+high) jsou karcinomy s buňkami difúzně pozitivními na androgenní receptory, ale na rozdíl od apokrinního typu A mají vysokou proliferační aktivitu (MIB1 index větší než 40%).

**Apokrinní typ s expresí HER2/neu** (AR+/HER2+) jsou karcinomy “double pozitivní”, vykazující jak jadernou expresi AR, tak membránovou expresi HER-2/neu.

**Typ s HER2/neu overexpresí** (AR-/HER2+) jsou salivární karcinomy negativní na průkaz AR, které vykazují silnou membránovou expresi HER-2/neu (skóre 3+) nebo/a amplifikaci stejnojmenného genu *HER2/neu*.

**Dvojitě negativní typ** (AR-/HER2-) je vágně definován absencí exprese oou charakteristických biomarkerů (AR a HER2) při typické histomorfologii.

Jednotlivé podtypy jsme vyhodnotili s ohledem na celkovou dobu přežití a dobu remise choroby. Z tabulky 16 je zřejmé, že statisticky významná odchylka je u typů apokrinní s expresí HER2/neu a HER2/neu s overexpresí. U těchto podtypů je prognóza pacienta výrazně horší. V našem souboru šlo o 17 pacientů. ( 65%). Deset nemocných (59 %) z této skupiny pacientů měli SDC vzniklý primárně, zbylých 7 (7 %) bylo z SDC z pleomorfního karcinomu.

Pokud vyhodnotíme jednotlivé podtypy u pacientů s 5-ti letým přežitím, 5 pacientů patří do podtypu apokrinního s expresí HER2/neu, 1 apokrinního B a 1 do dvojité negativního. I z pohledu tohoto hodnocení lze hledat těžko jako u hodnocení klinických údajů a jednotlivých markerů korelaci s prognózou pacienta. Skutečnost může být dána velice malým souborem pacientů.

SDC klasifikace	Počet případů (%)	OS	p	DFS	P
		HR + 95% CI		HR + 95% CI	
Apokrinní A	3 (11.5%)	1 [ -- ]	--	1 [ -- ]	--
Apokrinní B	4 (15.4%)	1.78 [0.22 – 14.32]	0.59	1.52 [0.18 – 12.27]	0.69
Apokrinní HER2	16 (61.5%)	21.92 [1.05 – 457.46]	<b>0.04</b> *	12.81 [0.65 – 228.53]	0.09
HER2 overexprese	1 (3.8%)	12.86 [0.95 – 174.85]	<b>0.05</b> *	7.89 [0.63 – 98.25]	0.10
Dvojitě negativní	2 (7.7%)	4.98 [0.29 – 85.57]	0.26	5.01 [0.29 – 85.07]	0.26

\* statisticky signifikantní; HR = poměr rizik; CI = interval spolehlivosti, *p*-value - signifikance

Tabulka 16 – Výsledky statistické analýzy přežití pacientů s SDC v závislosti na revidované klasifikaci

### **Molekulárně genetická analýza SDC**

V 10 případech byly SDC analyzovány metodou masivního paralelního sekvenování (NGS) za použití Fusion Plex Solid Tumor a Comprehensive Thyroid and Lung kitů (ArcherDX). Patogenní mutace byly nalezeny v 5 případech SDC ((*HRAS*: c.182A>G p.Gln61Arg, 2x*HRAS*: c.37G>C p.Gly13Arg, *AKT1*: c.49G>A p.Glu17Lys, *PTEN* c.1003C>T p.Arg335Ter). Homozygotní delece lokusu 9p21 (*CDKN2A*) byla detekována v 1 případě SDC se současnou mutací v *HRAS* genu. V dalším SDC nesoucím mutaci genu *PTEN* byla nalezena amplifikace genu *MDM2*. Molekulární genetická analýza odhalila 1 nádor s fúzí *ETV6-NTRK3*, proto byl překlasifikován na sekreční karcinom s HG transformací. Výsledky NGS a FISH analýz ve vybraných případech SDC jsou shrnuty v tabulce 17.

Případ	NGS fusion Solid Tumor	NGS Comprehensive Thyroid and Lung description	NGS VariantPlex Solid Tumor Kit		FISH									
			V	VST 1.p.	HER 2/neu <sup>e</sup>	ET V6 <sup>b</sup>	MD M2 <sup>e</sup>	MY BL1 <sup>b</sup>	MYB L1-NF <sup>f</sup>	MYB-NFIB <sup>f</sup>	NF IB <sup>b</sup>	NT RK3 <sup>b</sup>	R E T <sup>b</sup>	CDK N2A <sup>e</sup>
1	-	CTL 1.p.	N		-	NA	-	NA	-	-	NA	-	-	-
2	-	HRAS c.37G>C, p.Gly13Arg, AF:25%	N		-	NA	-	-	-	-	NA	-	-	NA
6	NA		N		NA	NA	-	NA	NA	NA	NA	-	-	NA
7	+	ETV6/NTRK3	A		ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	N	ND
16	-		+	TERT 1,295,250 (C250T) c.-146, AF:50%	-	NA	-	-	-	-	NA	-	-	-
17	-		+	PTEN c.1003C>T, p.Arg335Ter, AF:90%	+	NA	+	NA	-	-	NA	-	-	-
23	-	AKT1: c.49G>A p.Glu17Lys, freq: 60%	N		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	-	HRAS: c.182A>G p.Gln61Arg, freq: 55%	+	HRAS, PIK3CA, PTEN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
27	-	HRAS: c.37G>C p.Gly13Arg, freq: 62%	+	HRAS, PIK3CA, PTEN, TP53	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	-		+	CDKN2A, HRAS, TP53	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabulka 17 – Výsledky NGS a FISH analýz ve vybraných případech SDC

ND – není zhotoveno, NA – nelze analyzovat, FISH<sup>b</sup> – break apart probe; FISH<sup>e</sup> – enumeration; FISH<sup>f</sup> – fusion probe

## 5. Diskuze

Salivární duktální karcinom patří mezi karcinomy vysokého biologického rizika. V literatuře uváděné 5-ti leté přežití kolísá mezi 41-58 %. V našem souboru přežívalo po dobu 5 let jen 33 % nemocných. Vysvětlením tohoto nízkého přežívání může být skutečnost, že 7 pacientů (27 %) bylo léčeno pouze symptomatologicky nebo paliativně, a 12 cN0 pacientům nebyla provedena elektivní bloková disekce. Příčinou pochmurné prognózy pacientů s SDC je skutečnost, že velké procento nemocných je diagnostikováno v pokročilém stadiu choroby. Podle Takaseho bylo 46 % z jeho souboru 151 pacientů primárně diagnostikováno s nádorem T4, 53 % s N+ a 6 % s M1 [66]. Výsledky této studie potvrzují i naše výsledky, kdy 50 % nemocných bylo diagnostikováno ve IV.stadiu, 58 % mělo nádor T3 nebo T4, 54 % vykazovalo pozitivitu lymfatických uzliny a 19 % pacientů vzdálené metastázy. Tato čísla potvrzují vysokou agresivitu nádoru, rychlou progresi s perineurální a lymfovaskulární invazí

Z imunohistochemických markerů jsme u SDC vyšetřili a hodnotili expresi receptoru epidermálního růstového faktoru (HER2), androgenního receptoru (AR ), proteinu Ki-67, CK 5/6, S 100, p 63 a GATA 3.

HER2 patří do rodiny tyrozin – kinázových receptorů. V současné době jsou známy 4 proteiny, které jsou značeny HER1-4. Nejdéle a nejčastěji jsou vyšetřovány HER1 a HER2/neu. Jejich úloha v tkáni je buněčná proliferace a inhibice apoptózy cestou Ras-Raf- MAPK cestou. Overexprese HER2/neu je popisována u nádorů prsu, ovarií, močového měchýře a nemalobuněčného karcinomu plic. K inhibitorům HER2/neu patří trastuzumab.

Expres HER2/neu byla potvrzena u 65 % námi vyšetřených SDC. Takase popsal tuto expresi u 42 % tohoto nádoru. Tento autor používal stejně jako my za kritérium positivity více než 10 % buněk reagujících buněk. Dříve publikované studie prokazují expresi HER 2/neu kolísající v rozmezí 15 – 44 % [65,74,76,77]. Rozdílné výsledky lze vysvětlit (vedle biologické diversity nádoru) skutečností , že tito autoři použili jako kritérium positivity více než 30 % reaktivních buněk. V našem souboru byli pouze 2 pacienti (8 % ) HER2/neu negativní. Tito pacienti neměli pozitivní krční metastázy a přežívali 5, resp. 7 let. Tato čísla naznačují, že HER2 negativita je spojena s nižší agresivitou SDC. Rozsáhlejší studie



ukazují, že exprese HER2/neu nemá prognostickou relevanci [76,77,78]. U 8 z 15 námi vyšetřených pacientů nebyla při expresi HER2 neu potvrzena amplifikace tohoto genu. Můžeme se tedy domnívat, že za produkci tohoto faktoru je zodpovědný i jiný gen.

Protein Ki-67 (MIB1) je kodován genem *MKI67* a je nutný pro buněčnou proliferaci jako transkripční faktor ribozomální RNA. Inaktivace Ki-67 rezultuje v inhibici syntézy ribozomální RNA. Ki-67 patří k velice přesným proliferačním faktorům determinujícím růstový potenciál nádorové buněčné populace [17,18]. U 20 nemocných v naší skupině byla MIB1 aktivita vyšší než 40 %. Z této podskupiny přežívá více než 5 let 7 pacientů. MIB1 index nižší než 40 % mělo pouze 5 pacientů (20 %). Ve této skupině pacientů s nízkou expresí byli dva nemocní diagnostikováni již v terminálním stadiu choroby, tzn. pouze s několika měsíčním přežíváním. Další 2 pacienti přežívají rok po léčbě, jeden bez známek choroby a druhý s parciální remisí choroby. Poslední pacient je ve fázi nedokončené léčby. Nízký počet pacientů zahrnutý do naší studie nedovoluje statistickou korelaci MIB 1 proliferační aktivity s prognózou. Studie s větším počtem pacientů ale potvrzují korelaci mezi vyšší expresí MIB1 a horší prognózou. Takase a Masabuchi potvrdili souvislost vyšší exprese MIB1 s kratším intervalem přežití (OS) a intervalem bez známek choroby (DFS) [66, 78].

Positivní exprese AR byla v našem souboru u 88 % nemocných. U 3 pacientů (12 %) nejevil jejich nádor AR pozitivitu. Z toho 2 zemřeli do jednoho roku, třetí přežíval 5 let po stanovení diagnózy. Obdobně Takase ve svém souboru popisuje 78% pozitivitu markeru AR u SDC. Takase, Williams a Masabuchi prokázali, že negativita tohoto markeru vždy spojena s kratší dobou přežití i kratším intervalem bez choroby [66,76,78].

Biomarker GATA3 je zatím relativně málo studovaným v souborech SDC nádorů. GATA 3 je transkripční faktor zodpovědný za embryonální vývoj tkání řídicích zánětlivou a humorální odpověď a správný vývoj endotelu cév. Dosud byl vyšetřován zejména u low risk lumenálních karcinomů prsu [79]. V roce 2103 Swartz provedl studii 180 nádorů slinných žláz, jež zahrnovala i 25 salivárních duktálních karcinomů. Všech 25 vyšetřených SDC bylo imunohistochemicky pozitivní, a GATA 3 doporučil jako dobrý diferenciálně diagnostický marker [80]. Tyto závěry rozporuje Miettinen, který GATA 3 reakci prokázal jen u 4 ze 16 případů studovaných případů tohoto typu [81]. Žádná z provedených studií se

nevyjadruje k prognostickému významu GATA 3 u SDC. My jsme vyšetřili všech 26 případů, a z toho 19 tj. 76 % jich bylo pozitivních. Ze 7 pacientů s negativní reakcí přežil pouze 1 pacient 5 let. Prognostický význam GATA 3 bude ovšem nutné potvrdit rozsáhlejšími klinicko-patologickými korelacemi. GATA 3 jsme vyšetřili také u všech 3 překlasifikovaných high grade salivárních karcinomů z původního souboru (viz výše kapitola výsledky). Všechny měli GATA3 negativní expresi a zároveň AR negativitu. Proto lze tyto parametry brát jako důležitý při diferenciální diagnostice SDC, kde naopak je AR i GATA3 pozitivita velmi vysoká.

Positivita markerů CK5/6 byla v našem vzorku vysoká – 12 pozitivních ze 16 vyšetřovaných (76 %). Expresie těchto markerů byla spojena s vyšším stadiem choroby – z 12 pacientů s expresí CK 5/6 bylo 9 v III. nebo IV. stadiu choroby, 3 nemocní ze 4 negativních byli v nižším stadiu.. Prognostický význam tohoto markeru se nepodařilo prokázat. Tyto závěry jsou v rozporu s Takaseho studií, který prokázal pouze 30 % CK5/6 pozitivních pacientů. Tato pozitivita měla signifikantně vliv na kratší interval DFS, ale neovlivnila délku OS.

V našem souboru jsme prokázali 100% negativitu markerů reakce S100 a p63. Tyto markery jsou exprimovány myoepiteliálními buňkami, které se účastní na stavbě některých salivárních nádorů. Podle Nagaa ale nemá pro nízkou specificitou význam v histopatologické diferenciální diagnostice salivárních tumorů [82]. Chybění této reakce může být tedy přínosem při stanovení diagnózy SDC.

Nový klasifikační systém je založen na kombinaci markerů AR, HER2 neu a MIB 1. Naše práce potvrdila, že typ apokrinní HER2+ (AR+/HER2+) a typ HER2 obohacený (AR-/HER2+) znamenají horší prognózu (tabulka 16). Naše závěry jednoznačně potvrzují výsledky Takaseho studie. Současná exprese AR a HER2 u SDC otevírá možnosti cílené biologické léčby. Zároveň zejména pro typ apokrinní HER2+ ratifikují cílenou antiandrogenní či anti HER2 léčbu – viz kapitola onkologická léčba [52,53,54,55,56,57].

Deset případů z původního souboru 29 pacientů s SDC bylo vyšetřováno na translokaci ETV6-NTRK3. Devět bylo negativních, jediný pozitivní případ byl následně

reklasifikován jako sekreční karcinom (MASC). Negativita této translokace má diferenciálně diagnostický význam.

U 10 pacientů byla provedena genová analýza metodou masivního paralelního sekvenování (NGS) za použití Fusion Plex Solid Tumor a Comprehensive Thyroid and Lung kitů (ArcherDX). U 3 pacientů byla prokázána mutace HRAS a po jenom pacientovi v genech PTEN a AKT1. Recentní studie publikované v posledních letech prokázaly rozmanité mutace v genech SDC [75,83,84]. Chiosea prokázal ve svém souboru TP53 mutace (15/27, 56%), PTEN ztrátu (11/29, 38%), PIK3CA mutaci (10/30, 33%), HRAS mutaci (10/29; 34%) [75]. Na souboru 15 pacientů s SDC Dalin vyšetřil 410 genů a zjistil, že tento nádor obsahuje vyšší mutační zátěž než mnoho jiných slinných karcinomů (1,7 mutací / Mb). Nejčastějšími genetickými změnami byly mutace v TP53 (55 %), HRAS (23 %), PIK3CA (23 %) a amplifikace ERBB2 (35 %). Většina (74 %) nádorů měla změny v genech MAPK (BRAF / HRAS / NF1) nebo ERBB2 [84]. Nejčastěji byly prokázány mutace v genu TP53 a to v rozmezí 37,5 % -68 % [84,85]. My jsme tyto mutace v našem souboru pacientů nenalezli. Důvodem je možná vzorek pouze 10 vyšetřovaných případů.

HRAS mutace, které jsme naopak prokázali u 3 z 10 případů, jsou zastoupeny v jiných studiích v 13 % - 56 % [77,84,85]. HRAS mutace je vysoce relevantní nález z prognostického a terapeutického hlediska, protože je známo, že tato mutace je odpovědná za terapeutickou rezistenci při anti HER2 neu léčbě [77,85]. Současný výskyt HRAS mutace u HER2 neu pozitivních SDC, kterou jsme prokázali v jednom případě, se tak jeví kontraindikací k uvedené biologické léčbě. Za její neúspěch jsou odpovědny mutace v genech PTEN a AKT1, kterou potvrdili i další autoři [77,83,84,85]. Shimura zjistil, že přítomnost mutace genu PTEN koreluje s pokročilým stadiem choroby a s nízkou expresí AR [86].

Nové zjištění v naší studii byl zlom v genu MYB u 2 případů SDC. Mutace genu u tohoto transkripčního faktoru důležitého při proliferaci, apoptóze a diferenciaci buňky byla nedávno zjištěna u adenoidně cystického karcinomu. Konkrétně jde o fúzi genu MYB-NFIB, která ale nemá u AdCC žádný prognostický význam [87,88,89].

V jednom případě mutace genu PTEN jsme objevili amplifikaci genu MDM2. Z recentních studií se jedná o vzácný jev, který Grünwald pozoroval ve 3 případech z 51

a Chiosea 1 z 37 případů [75,90]. Tyto studie zároveň pozorovali amplifikaci MDM2 s mutací p53. To nabízí možnost cílené terapie, protože amplifikace MDM2 může být alternativní mechanismus vedoucí k dysregulaci buněčného cyklu.

### **Závěr**

Salivární duktální karcinom exprimuje AR receptor (88 %), GATA 3 (76 %), CK 5/6 (76 %) a HER2 (65 %). U 80 % SDC byla zjištěna vysoká MIB 1 proliferační aktivita. Kombinace AR+ s HER2 + (apokrinní HER2+ ) a AR- s HER2 + ( HER2 obohacený ) mají signifikantně horší prognózu. Nejdůležitějším zjištěním byl výskyt HRAS, PTEN a AKT 1 mutace, které způsobují rezistenci tohoto nádoru vůči biologické léčbě blokadou thyrozinkinázových receptorů nádorů.

## 6.Přílohy

Případ	Věk/ pohlaví	Diagnoza	Lokalizace prim. nádoru	Staging v době stanovení diagnózy	Léčba chirurgická	Léčba onkologická	Další klinický průběh	Follow-up
1	60/M	SDC onkocytární	gl. submand. l. dx	T2N2bM0, IV. St.	2/09 exstirpace gl submand. l. dx, 3/09 radikální krční disekce l. dx	5/09 CHT+RT	meta po 14 měsících	<b>NED 9 let</b>
					05/10 resekce meta sterna	06/10 RT sterna	meta uzlin po 45 měsících	
					12/12 exstirpace meta uzliny nadklíčku	12/12 paliativní CHT		
2	79/M	SDC	gl. submand l. sin	T3N1M0, III.st.	1/2007 exstirpace gl. submand + supraomohyoidní krční disekce	05/2007 RT	meta plic po 24 měsících	<b>DOD 25 měsíců</b>
						02/2009 exitus		
3	77/M	SDC	gl. parotis l. sin	T4N2Mx IV.st.	4/2004 výkon na ORL	paliativní RT	po 3 měsících exitus 7/04 exitus	<b>DOD 3 měsíce</b>
4	63/M	SDC ex PA	gl. parotis l. dx	T2N0M0, II. St.	12/2003 radikální parotidectomie	3/2004 RT	po 66 měsících LR recidiva + meta uzlin oboustranně	<b>DOD 84 měsíců</b>
						6-12 2009 paliativní CHT + léčba bisfosfonáty	po 80 měsících generalizace do skeletu	
5	49/F	SDC ex PA	gl. submand. l. sin	T1N0M0, I. St.	6/2002 exstirpace gl. submand	7-9/2004 RT+CHT	po 24 měsících meta do uzlin	<b>DOD 30 měsíců</b>
				9734/02	6/2004 radikální krční disekce		po 30 měsících exitus	
6	59/M	SDC ex PA	gl.parotis l. sin.	T2 N0 M0 II.st.	09/10 parotidectomie	12/10 RT	po 3 měsících meta uzlin i meta skeletu	<b>DOD 17 měsíců</b>
						10-12/11 paliat. CHT	po 17 měsících exitus	
7	78/M	MASC-HGT	gl.saliv. minor r. labii	T4aN0M0	11/09 dg excize	01-03/10 RT	03/10 po RT CR ZN	<b>DOD 20 měsíců</b>
				17569/09	05/11 excize		po 12 měsících meta plic	

8	83/M	SDC ex PA oncocytární	gl. parotis l. dx	T3N0M0, III. st	9/87 radikální parotidectomie	CHT	3/89 posl. kontrola CR ZN	<b>DOC NED</b>
9	55/F	SDC ex PA	gl.parotis l. sin.	T3N0M0 III.st.	07/03 tot. parotidectomie	09/03 adj. RT	10/08 poslední kontrola CR ZN	<b>NED</b>
10	52/M	SDC	gl. submand. l. sin.	T3 N0 M1, IV. St	12/08 exstirpace submand. žl.  meta plic	2-5/09 paliat. CHT	po 43 měsících meta mozku  po 51 měsících exitus	<b>DOD 53 měsíců</b>
11	76/M	HG dlaždicobuněčný Ca	gl.parotis l.sin	T4N2bMx IV.st.	02/09 parotidectomie et disectio colli	05-06/09 RT + CHT	po 6 měsících meta páněv + exitus	<b>DOD 6 měsíců</b>
12	85/F	SDC ex PA	gl.parotis dx.	T3N2bM1 IV.st.	02/10 probatorní excize	04/10 RT	po 5 měsících exitus	<b>DOD 5 měsíců</b>
13	54/M	HG adenokarcinom NOS ex PA	gl.parotis. dx.	T4N0M1 IV.st	10.4 excisio diagnostica	11/04 paliativní RT +CHT	po 6 měsících exitus	<b>DOD 6 měsíců</b>
14	69/M	SDC ex PA oncocytární	gl. parotis l. dx.	TxN2M0	05/96 disectio colli <b>sine resectio tu !!</b>	06/96 RT + CHT	po 60 měsících exitus - duplicita MM	<b>DOC WD 60 měsíců</b>
15	86/M	SDC	gl. parotis l. sin.	T4N0MX IV.st.	11/2011 dg. excize	03-04/12 RT	po RT PR  po 15 měsících exitus	<b>DOC WD 15 měsíců</b>
16	60/M	SDC	gl.submandi. l. sin.	T2N0Mx  T3N2bM0	12/12 exstirpace tumoru  03/13 resekce recidivy tumoru / neradikální /+ krční disekce	06/13 RT+CHT  08/13 paliativní CHT	po 4 měsících LR recidiva – chirurgie + onko léčba  po onko léčbě pouze PR s další časnou progresí LR	<b>DOD 30 měsíců</b>
17	54/F	SDC	gl.submand. l. dx.	T1N2bM1 IV.st.	10/12 diagnostická excize  01/13 resekce tumoru + krční blok + resekce meta plic  07/13 exstirpace LR recidivy	2-5/13 CHT  12/13 RT	po 6 měsících LR recidiva + recidiva meta plic  10/15LR recidiva s generalizací	<b>DOD 3ž měsíců</b>
18	53/M	SDC ex PA	gl.parotis l. dx.	T4N2aM0 IV.st.	04/13 diagnostická excize	06/13 paliativní CHT	diagnostika v preterminálním stadiu, po měsíci exitus	<b>DOD 1 měsíc</b>

19	66/M	SDC	gl.parotis.l. sin.	T3N0Mx III.st	06/13 parotidektomie  06/15 krční disekce	12/13 RT  07/15 paliativní CHT	po 6 měsících meta uzlin	<b>AWD 5 let</b>
20	60/M	SDC ex rec. PA	gl. parotis l.sin	T3N0Mx III.st	10/14parotidektomie	02/15 radioterpaie	N/A	<b>N/A</b>
21	95/M	SDC	gl. submand. l.sin	T4aN2bM1 IVC st.	sine 02/15	sine 02/15	DOD 2 měsíce po diagnostice	<b>DOD 2 měsíce</b>
22	24/M	SDC	gl.submand. l.sin	T3N1M0 III.st	submandibulární exenterace +krční disekce 06/15	konkomitance CHT+RT antiresorptivní léčba kostních meta	vzdálené kostní meta po 12 měsících	<b>AWD 3 roky</b>
23	61/M	SDC ex PA	gl.submand. l. dx.	T4aN2bM1 IVA st.	submandibulární exenterace + krční disekce 03/16	konkomitance CHT+RT 05/16	CR	<b>NED 24 měsíců</b>
24	64/M	Ca ex PA	gl. parotis l.sin	T1NoMO I.st.	superficiální parotidektomie 05/17	Sine	CR	<b>NED 12 měsíců</b>
25	89/M	Ca ex PA	gl. parotis l.dx	T4aN1M0 IVA st. <b>SDC</b>	sine 02/15	02/18 radioterapie	PR	<b>AWD</b>
26	63/M	SDC	gl. parotis l.dx	T3N2bM0 IVA st.	totální parotidektomie 03/18	zatím bez RT	nedokončená léčba	<b>AWD</b>
27	65/M	SDC	gl. parotis l. dx	T2N2bM1 IVC st.	totální parotidektomie 04/18	zatím bez léčby	nedokončená léčba	<b>AWD 2 měsíce</b>
28	73/M	SDC	gl.parotis l. dx.	T2N2bM1 IV.st.	11/12dg.excize tu parotis	symptomatická léčba	LR i generalizovaná progrese	<b>DOD po 3 letech</b>
29	70/M	SDC ex PA	gl. submand. l.sin.	T1N0M0 I.st.	04/12 exstirpace tu	radioterapie 07/12	genralizace 04/18	<b>AWD</b>

**Tab. č. 18 - klinické údaje celého souboru pacientů**

## 7. Použitá literatura

1. Barnes, L., Eveson, J.W., Reichart, P., Sidransky, D. (Eds.): *World Health Organisation Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*. In: Chapter 5. IARC Press: Lyon 2005.
2. Stárek, I., Simpson, Roderick W., Černý, L., Skálová, A. *Choroby slinných žláz*. 1. vyd. Praha: Grada, 2000. ISBN 80-7169-966-7.
3. Isayeva, T., Said-Al-Naief, R. Z. et al. Salivary Mucoepidermoid Carcinoma: Demonstration of Transcriptionally Active Human Papillomavirus. *Head and neck Pathology*. 2013, 7(2): 135-148.
4. Skálová, A., Kašpírková, J., Andrlé, P., Hostička, L., Vaněček, T. Human papillomaviruses are not involved in the etiopathogenesis of salivary gland tumors. *Česk. Patol.* 2013, 49: 72–75.
5. Chowdhry, AK., McHugh, C., Fung, C. et al. Second primary head and neck cancer after Hodgkin lymphoma: A population-based study of 44,879 survivors of Hodgkin lymphoma. *Cancer* . 2015, 121(9): 1436-1445.
6. Batsakis, JG., Regezi, JA. Histogenesis of salivary gland neoplasm. *Otolaryngol Clin North Am.* 1977, 10(2): 297-307.
7. Bell, D., Hanna, EY. Salivary gland cancers: biology and molecular targets for therapy. *Curr Oncol Rep.* 2012 ,14(2):166-74.
8. Fordice, J., Kershaw, C., El-Naggar, A., Goepfert, H. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck: predictors of morbidity and mortality. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1999 ,125(2): 149-52.
9. El-Naggar , A.K., Chan, J.K.C., Grandis, J.R., Takata, T., Slootweg, P.J. (Eds). *WHO Classification of Head and Neck Tumours (4<sup>th</sup> edition )*. IARC Lyon 2017
10. *TNM klasifikace zhoubných novotvarů*, UICC, Willey-Blacwell, UK, 8. vydání, rok 2017, v české verzi rok 2018.
11. *AJCC Cancer Staging Manual*, 8<sup>th</sup> edition, AJCC(American Joint Committee on Cancer) 2017 Springer.
12. Lima, RA., Tavares, MR., Dias, FL. et al. Clinical prognostic factors in malignant parotid gland tumors. *Otolaryngology - Head and Neck Surgery* . 2005, 133(5): 702-708.



13. Myers, EN., Ferris, RL. *Salivary gland disorders*. New York: Springer, c2007. ISBN 3540470700.
14. Dahlin, D.C., Beabout J.W. Dedifferentiation of Low-Grade Chondrosarcomas. *Cancer*. 1971, 28 (2): 461-466.
15. Nagao T. Dedifferentiation and High-Grade Transformation in Salivary Gland Carcinomas. *Head and Neck Pathology*. 2013, 7: 37-47.
16. Stanley, RJ., Weiland, LH., Olsen, KD., Pearson, BW. Dedifferentiated acinic cell (acinous) carcinoma of the parotid gland. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1988, 98(2): 155-61.
17. Skálova, A., Sima, R., Vanecek, T., et al. Acinic cell carcinoma with high-grade transformation. *Am J Surg Pathol*. 2009, 33: 1137–1145.
18. Skálova, A., Vaneček, T., Majewska, H. et al. Mammary Analogue Secretory Carcinoma of Salivary Glands with high –grade transformation. *Am J Surg Pathol*. 2014, 38(1): 23-33.
19. Roy, P., Bullock, MJ., Perez-Ordoñez, B., Dardick, I., Weinreb I. Epithelial-myoepithelial carcinoma with high grade transformation. *Am J Surg Pathol*. 2010, 34(9): 1258-65.
20. Seethala, RR. An update on grading of salivary gland carcinomas. *Head Neck Pathol*. 2009, 3(1):69–77.
21. Marx, RE., Stern, D. *Oral and Maxillofacial Pathology In A Rationale for Diagnosis and Treatment*. 2nd edition, Quintessence Pub Co, 2012: 547 – 598.
22. Shaobo, Z., Scheurch, C., Hunt, J. Review and Updates of Immunohistochemistry in Selected Salivary Gland and Head and Neck Tumors. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2015, 139(1): 55-66.
23. Foretová , L., Svoboda, M., Slabý O. *Molekulární genetiká v onkologii*. Praha: Mladá fronta - Medical Services, 2014. Aeskulap. ISBN 978-80-204-3236-0.
24. Kolář, Z. *Molekulární patologie nádorů*. Olomouc: Epava, 2003. ISBN 80-86297-15-2.
25. Seethala, RR., Griffith. CC. Molecular Pathology Predictive, Prognostic, and Diagnostic Markers in Salivary Gland Tumors. *Surgical Pathology Clinics*. 2016, 9(3): 339-352.

26. Quer, M., Guntinas-Lichius, O., Marchal, F. et al. Classification of parotidectomies: a proposal of the European Salivary Gland Society. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. 2016, 273(10): 3307-3312.
27. Lim, YCh., Lee, SY., Kim, K., Lee, JS. et al. Conservative parotidectomy for the treatment of parotid cancers. *Oral Oncology*. 2005, 41(10): 1021-1027.
28. McGurk, M., Combes, J. *Controversies in the management of salivary gland disease*. 2nd ed. Oxford: Oxford University Press, 2013. ISBN 978-0-19-957820-7.
29. Olsen, KD., Moore, EJ. Deep lobe parotidectomy: clinical rationale in the management of primary and metastatic cancer. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. 2014, 271(5): 1181-1185.
30. Klussmann, J.P., Ponert, T., Mueller ,RP., Dienes, HP., Guntinas-Lichius, O. Patterns of lymph node spread and its influence on outcome in resectable parotid cancer. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*. 2008, 34(8): 932-937.
31. Deschler, DG., Bradley, PJ., Eisele, DW. *Surgery for Primary Malignant Parotid Neoplasms*. ed. Salivary Gland Neoplasms [online]. S. Karger, 2016, 83-94.
32. Cracchiolo, JR., Shaha, AR. Parotidectomy for Parotid Cancer. *Otolaryngologic Clinics of North America*. 2016, 49(2): 415-424.
33. Rinaldo, A., Ferlito, A., Pellitteri, PK. et al. Management of malignant submandibular gland tumors. *Acta Otolaryngol*. 2003 Oct, 123(8): 896-904.
34. Vander Poorten, VL., Balm, AJ., Hilgers. FJ. et al. Prognostic factors for long term results of the treatment of patients with malignant submandibular gland tumors. *Cancer*. 1999, 85(9): 2057-67.
35. Spiro, RH. Treating tumors of the sublingual glands, including a useful technique for repair of the floor of the mouth after resection. *The American Journal of Surgery*. 1995, 170(5): 457-460.
36. Gallo, O., Meccarielo, G., Renehan, A. Factors predicting distant metastasis and subsequent management. In : McGurk M, Combes J. editotrs, *Controversis in the managment of salivary gland*. Oxford Univ Press, 2013, 178-93.
37. Loh, KS., Barker, E., Bruch, G. et al. Prognostic factors in malignancy of the minor salivary glands. *Head & Neck*. 2009, 31(1): 58-63.
38. Kakarala, K., Bhattacharyya, N. Survival in oral cavity minor salivary gland carcinoma. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. 2010, 143(1): 122-126.

39. Lopes, MA., Santos, GC., Kowalski, P. Multivariate survival analysis of 128 cases of oral cavity minor salivary gland carcinomas. *Head Neck*. 1998, 20(8):699-706.
40. DeAngelis, AF., Tsui, A., Wiesenfeld, D., Chandu A. Outcomes of patients with adenoid cystic carcinoma of the minor salivary glands. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2011, 40(7): 710-714.
41. McHugh, CH., Roberts, DB., El-Naggar, AK et al. Prognostic factors in mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands. *Cancer*. 2012, 118(16): 3928-3936.
42. Ord, RA, Salama, AR. Is it necessary to resect bone for low-grade mucoepidermoid carcinoma of the palate. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2012, 50(8): 712-4.
43. Guevara-Canales, J., Morales-Vadillo, R., Guzman-Arias, G. et al. Mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands. A retrospective study of 51 cases and review of the literature. *Acta Odontol Latinoam*. 2016, 29(3): 230 - 238.
44. Ettl, T., Gosau, M., Brockhoff, G. et al. Predictors of cervical lymph node metastasis in salivary gland cancer. *Head & Neck*. 2014, 36(4): 517-523.
45. Lombardi, D., McGurk , M.,Vander Poorten, V.et al. Surgical treatment of salivary malignant tumors. *Oral Oncology*. 2017, 65: 102-113.
46. Chen, AM., Bucci, MK., Quivey, JM. Long-term outcome of patients treated by radiation therapy alone for salivary gland carcinomas. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*. 2006, 66(4): 1044-1050.
47. Armstrong, JG., Harrison, LB., Spiro, RH., Fass, DE., Strong, EW., Fuks ZY. 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): 290-3.
48. Debaere, D., Vander Poorten, V., Nuyts, S. Cyclophosphamide, doxorubicin, and cisplatin in advanced salivary gland cancer. *B-ENT*. 2011, 7(1): 1-6.
49. Pederson, AW., Salama, JK., Haraf, DJ. Adjuvant chemoradiotherapy for locoregionally advanced and high-risk salivary gland malignancies. *Head & Neck*. 2011, 3(1): 31.
50. Laurie, SA., Ho, AL., Fury, MG., Sherman, E., Pfister, DG. Systemic therapy in the management of metastatic or locally recurrent adenoid cystic carcinoma of the salivary glands: a systematic review. *Lancet Oncol*. 2011, 12(8):815.

51. Locati, LD., Bossi, P., Perrone, F. et al. Cetuximab in recurrent and/or metastatic salivary gland carcinomas: A phase II study. *Oral Oncol.* 2009, 45(7): 574-8.
52. Skálová, A., Stárek, I., Vaněček, T. et al. Expression of HER-2/neu gene and protein in salivary duct carcinoma of parotid gland as revealed by fluorescence in-situ hybridization and immunohistochemistry. *Histopathology* 2003, 42: 348-356.
53. Kaidar-Person, O., Billan, S., Kuten, A. Targeted therapy with trastuzumab for advanced salivary ductal carcinoma: case report and literature review. *Med Oncol.* 2012, 29(2): 704-6
54. Nabili, V., Tan, JW., Bhuta, S., Sercarz, JA., Head, CS. Salivary duct carcinoma : a clinical and histologic review with implications for trastuzumab Vishad. *Head Neck.* 2007, 29: 907-912.
55. Lee, JS., Kwon, OJ., Park, JJ., Seo, JH. Salivary duct carcinoma of the parotid gland: Is adjuvant HER-2-targeted therapy required? *J Oral Maxillofac Surg.* 2014, 72(5): 1023-1031.
56. Boon, E., van Boxtel, W., Buter, J. et al. Androgen deprivation therapy for androgen receptor-positive advanced salivary duct carcinoma: A nationwide case series of 35 patients in The Netherlands. *Head Neck.* 2018 , 40(3): 605–613
57. Locati, LD., Perrone, F., Cortelazzi, B., et al. Clinical activity of androgen deprivation therapy in patients with metastatic/relapsed AR- positive salivary gland cancers. *Head Neck.* 2016, 38(5): 724-731.
58. Jaspers, H., Verbist, B., Schoffelen, R., et al. Androgen Receptor – Positive Salivary Duct Carcinoma : A Disease Entity With Promising. *J Clin Oncol.* 2011,29(16): 473-476.
59. Hocwald, E., Korkmaz, H., Yoo, GH. et al. Prognostic Factors in Major Salivary Gland Cancer. *The Laryngoscope.* 2001, 111(8): 1434-1439.
60. Scott, AL., Bradley, S. et al. Malignant salivary gland tumors: Treatment of recurrent and metastatic disease, *UpToDate.* 301 Moved Permanently [online]. Dostupné z: <https://www.uptodate.com/contents/malignant-salivary-gland-tumors-treatment-of-recurrent-and-metastatic-disease>
- 61.

62. Skálova, A., Leivo, I., Von Boguslawsky, K., Saksela, E. Cell proliferation correlates with prognosis in acinic cell carcinomas of salivary gland origin. Immunohistochemical study of 30 cases using the MIB 1 antibody in formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol.* 1994, 173(1): 13-21.
63. Skálova, A., Lehtonen, H., von Boguslawsky, K., Leivo, I. Prognostic significance of cell proliferation in mucoepidermoid carcinomas of the salivary gland: clinicopathological study using MIB 1 antibody in paraffin sections. *Hum Pathol.* 1994, 25(9):929-935.
64. Nagao, T., Licitra, L., Loening, T. et al. Salivary duct carcinoma. In: El-Naggar A, Chan JKC. et al. eds. *World Health Organization (WHO) Classification of Head and Neck Tumours*, 4th ed. Lyon, France: IARC Press, 2017: 173–174.
65. Wolff, AC., Hammond, MEH., Allison, KH. et al. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. *Arch Pathol Lab Med.* 2018, 142: 1364–1382.
66. Di Palma, S., Simpson, RHW., Marchió, C. et al. Salivary duct carcinomas can be classified into luminal androgen receptor-positive, HER2 and basal-like phenotypes. *Histopathology.* 2012, 61(4): 629-643.
67. Takase, S., Kano, S., Tada, Y., Kawakita, D. et al. Biomarker immunoprofile in salivary duct carcinomas: clinicopathological and prognostic implications with evaluation of the revised classification. *Oncotarget.* 2017, 8(35): 59023-59035
68. Jaehne, M., Roeser, K., Jaekel, T. et al. Clinical and Immunohistologic Typing of Salivary Duct Carcinoma. A Report of 50 Cases. *Cancer.* 2005 ,103(12): 2526-33.
69. Weon, YC., Park, SW., Kim, HJ. et al. Salivary duct carcinomas: clinical and CT and MR imaging features in 20 patients. *Neuroradiology.* 2012,54(6):631-40.
70. Kim , JY., Lee, S., Cho, KJ. et al. Treatment results of post-operative radiotherapy in patients with salivary duct carcinoma of the major salivary glands. *Br J Radiol.* 2012, 85(1018): 947-52.
71. Salovaara, E., Hakala, O., Bäck, L. et al Management and outcome of salivary duct carcinoma in major salivary glands. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2013, 270(1): 281-5.
72. Shinoto, M., Shioyama, Y., Nakamura, K. et al Postoperative radiotherapy in patients with salivary duct carcinoma: clinical outcomes and prognostic factors. *J Radiat Res.* 2013, 54(5): 925-30.

73. Roh, JL., Lee, JI., Choi, SH. et al. Prognostic factors and oncologic outcomes of 56 salivary duct carcinoma patients in a single institution: high rate of systemic failure warrants targeted therapy. *Oral Oncol.* 2014, 50(11): 64-6.
74. Johnston , ML., Huang, SH., Waldron, JN. et al. Salivary duct carcinoma: Treatment, outcomes, and patterns of failure. *Head & Neck.* 2016, 38(S1): 820-826.
75. Simpson, RHW. Salivary Duct Carcinoma: New developments- Morphological variants including pure in situ high grade lesions; proposed molecular classification. *Head Neck Pathol.* 2013,7(Suppl 1): 48-58.
76. Chiosea, SI., Williams, L., Griffith, CC. et al. Molecular characterization of apocrine salivary duct carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2015, 39(6): 744-52.
77. Williams, MD., Roberts, DB., Kies, MS. et al. Genetic and expression analysis of HER-2 and EGFR genes in salivary duct carcinoma: Empirical and therapeutic significance. *Clin Cancer Res.* 2010; 16(8): 2266-2274.
78. Luk, PP., Weston, JD., Yu, B. et al. Salivary duct carcinoma: Clinicopathologic features, morphologic spectrum, and somatic mutations . *Head Neck.* 2016, 31: 1838-1847.
79. Masubuchi, T., Tada, Y., Maruya, S. et al. Clinicopathological significance of androgen receptor, HER2, Ki-67 and EGFR expressions in salivary duct carcinoma. *Int J Clin Oncol.* 2015, 20(1): 35-44.
80. Dydensborg, AB., Rose, AA., Wilson,, BJ. et al. GATA3 inhibits breast cancer growth and pulmonary breast cancer metastasis. *Oncogene.* 2009, 28 (29): 2634–42.
81. Schwartz, LE., Begum, S., Westra, WH., Bishop, JA. GATA3 immunohistochemical expression in salivary gland neoplasms. *Head Neck Pathol.* 2013, 7(4): 311-5.
82. Miettinen, M., Mccue, A., Sarlomo-Rikala, M. et al. GATA3. *The American Journal of Surgical Pathology.* 2014, 38(1): 13-22.
83. Nagao, T., Sato, IR. et al. Immunohistochemical Analysis of Salivary Gland Tumors: Application for Surgical Pathology Practice. *Acta histochemica et cytochemica.* 2012, 45(5): 269-282.
84. Williams, MD., Roberts, D., Blumenschein, GR. et al. Differential expression of hormonal and growth factor receptors in salivary duct carcinomas: Biologic significance and potential role in therapeutic stratification of patients. *Am J Surg Pathol.* 2007, 31(11): 1645-1652.

85. Dalin, MG., Desrichard, A., Katabi, N., et al. Comprehensive molecular characterization of salivary duct carcinoma reveals actionable targets and similarity to apocrine breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2016, 22(18): 4623-4633.
86. Wang, K., Russell, JS., McDermott, JD. et al. Profiling of 149 salivary duct carcinomas, carcinoma ex pleomorphic adenomas, and adenocarcinomas, not otherwise specified reveals actionable genomic alterations. *Clin Cancer Res.* 2016, 22(24): 6061-6068.
87. Shimura, T., Tada, Y., Hirai, H., et al. Prognostic and histogenetic roles of gene alteration and the expression of key potentially actionable targets in salivary duct carcinomas. *Oncotarget.* 2018, 9(2): 1852-1867.
88. Grünewald, I., Vollbrecht, C., Meinrath, J. et al. Targeted next generation sequencing of parotid gland cancer uncovers genetic heterogeneity. *Oncotarget.* 2015, 6(20): 18224-18237.
89. Persson, M., Andren, Y., Mark, J. et al. Recurrent fusion of MYB and NFIB transcription factor genes in carcinomas of the breast and head and neck. *Proc Natl Acad Sci.* 2009, 106(44): 18740-18744.
90. Šteiner, P., Andreasen, S., Grossmann, P., et al. Prognostic significance of 1p36 locus deletion in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. *Virchows Arch.* 2018, 473(4): 471-480.
91. Grünewald, I., Trautmann, M., Busch, A. et al. MDM2 and CDK4 amplifications are rare events in salivary duct carcinomas. *Oncotarget.* 2016; 7(46): 75261-75272.