

Dizertační práce byla vypracována na Otolaryngologické klinice Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci v rámci kombinovaného postgraduálního studia

Přednosta: prof. MUDr. Ivo Stárek, CSc. do 6/2017, MUDr. Richard Salzman, PhD. od 7/2017

Lymfangiogeneza u karcinomů slinných žláz

Práce byla podpořena grantem: Registrační číslo: NT13701-4/2012

Název projektu: Exprese vaskulárního endoteliálního růstového faktoru VEGF-C/D a její význam pro lymfangiogenezu, uzlinové metastázování a prognózu karcinomů slinných žláz.

Uchazeč:

MUDr. Jiří Hoza

Otolaryngologická klinika FN Olomouc

Školitel:

Prof. MUDr. Ivo Stárek, CSc

Otolaryngologická klinika FN Olomouc

Prohlášení

Prohlašuji, že přeložená práce je původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně. Veškerou literaturu a další zdroje, ze kterých jsem čerpal, v práci řádně cituji, a jsou uvedeny v seznamu literatury.

Souhlasím s půjčováním disertační práce všem zájemcům o řešenou problematiku.

V Olomouci dne, 20. dubna 2018

MUDr. Jiří Hoza

Obsah:

1. Úvod	4
1.1 Epidemiologické a etiopatogenetické aspekty nádorů slinných žláz	4
1.2. Klinicko-patologické aspekty nádorů slinných žláz	6
1.3. Lymfogenní metastázy u karcinomů slinných žláz	9
1.4. Možnosti prognózování karcinomů slinných žláz	11
1.4.1. Význam histopatologického gradingu pro prognózu salivárních karcinomů	11
1.4.2. Vliv klinického stagingu na prognózu salivárních karcinomů	11
1.4.3. Prognostický význam genových abnormalit u salivárních karcinomů	13
1.5. Adenoidně cystický karcinom slinných žláz.....	14
1.6. Význam vaskulárních endoteliálních růstových faktorů pro růst a šíření nádorů.....	16
1.7. Význam vaskulárních endoteliálních růstových faktorů pro růst a šíření salivárních nádorů.	18
2. Cíle práce.....	18
3. Materiál a metodika	19
4. Výsledky.....	20
5. Diskuze.....	29
6. Závěr	32
7. Seznam literatury	35
8. Obrazová příloha	42
9. Seznam publikovaných prací	48
10. Seznam přednášek	49
11. Poděkování.....	50

1. Úvod

1.1. Epidemiologické a etiopatogenetické aspekty nádorů slinných žláz.

Nádory slinných žláz jsou poměrně vzácná onemocnění, na všech tumorech hlavy a krku se podílejí ne více než 5 %. Jejich anatomická distribuce je velmi nevyrovnaná: nejčastěji (v 70 – 80 %) postihují příušní žlázu, na gl. submandibularis připadá necelých 20 % případů, nejmenší část tumorů vychází ze žlázy podjazykové a malých slinných žláz. Obecně je velikost žlázy v opačném, dosud však neobjasněném vztahu k relativnímu zastoupení z ní vycházejících karcinomů. Ty v gl. parotis představují jen asi 20 %, v gl. submandibularis 50 %, v gl. sublingualis více než 90 % všech neoplazmat.

Incidence parotického karcinomu dle údajů ÚZIS v posledních hodnocených 15 letech (2000-2014) se v celé populaci ČR pohybovala mezi 0,42 až 0,54/100 tisíc obyvatel, přičemž byla o něco vyšší u mužů nežli u žen (0,4 až 0,8 vs. 0,21 až 0,5). Úmrtnost dle stejného zdroje ve stejném období činila celkově 0,14 až 0,23, u mužů byla větší než u žen (0,2 až 0,45 vs. 0,08 až 0,2). Incidence ani mortalita této nádorové skupiny však nemá dlouhodobě vzestupnou tendenci. Z téhož pramene pak vyplývá, že za stejný časový interval nebyl rozdíl mezi incidencí časných (I+II) a pozdních (III+IV) klinických stádií (0,13 až 0,30 vs. 0,10 až 0,25), tato se však lišila mortalitou (0,01 až 0,07 vs. 0,11 až 0,25). Dále je zřejmé, že incidence a mortalita stoupá s věkem, nejvyšší je u nemocných nad 65 let. Tyto údaje potvrzují výsledky klinických studií, podle kterých je tento parametr prognostickým činitelem (6, 15, 16).

Etiologie salivárních nádorů není dosud přesně známa. Jednoznačně byl prokázán vliv ionizujícího záření. V některých geografických oblastech je karcinom příušní žlázy dáván do příčinného vztahu k infekci virem Epstein-Barrové. Tumorigenní vliv jiných látek, jako např. barev na vlasy, je spekulativní.

V současné době se pozornost zaměřuje na genetické alterace, jež jsou zodpovědné za vznik některých histopatologických jednotek. Jde většinou o chromozomální translokace (viz tab. č. 1). Stanovení těchto genetických změn má u některých tumorů vedle diferenciálně-diagnostického i význam prognostický (např. u karcinomu mukoepidermoidního).

Tab. č. 1: Genetické alterace u tumorů slinných žláz

tumor	typ chromozomální aberace	gen
pleomorfní adenom	8q12 translokace 12q13-15 translokace	<i>PLAG1</i> fúze <i>HMG2</i> fúze
karcinom z pleomorfního adenomu	8q12 translokace 12q13-15 translokace 12q15 amplifikace	<i>PLAG1</i> fúze <i>HMG2</i> fúze <i>MDM2</i> <i>TP53</i> mutace
epiteliálně myoepiteliální karcinom		<i>HRAS</i> mutace
tubulotrabeulární bazocelulární adenokarcinom		<i>CTTNB1</i> mutace
membranózní bazocelulární adenokarcinom	16q12-13 delece	<i>CYLD</i> LOH/mutace
mukoepidermoidní karcinom	t(11;19)(q21;p13) t(11;15)(q21;q26) 9p21.3	<i>CRTC1-MAML2</i> <i>CRTC3-MAML2</i> <i>CDKN2A</i> delece
salivární duktální karcinom	17q21.1 3q26 Xq12	<i>TP53</i> mutace <i>ERBB2</i> amplifikace <i>PIK3CA</i> mutace <i>AR</i> copy gain
adenoidně cystický karcinom	6q22-23 translokace 8q13 translokace	fúzní transkript MYB-NFIB a MYBL1-NFIB <i>NOTCH1</i> mutace
sekretorický karcinom (mammární analogický)	t(12;15)(p13;q25) t(12)	<i>ETV6-NTRK3</i> <i>ETV6-X</i>
karcinom z jasných buněk (hyalinizující)	t(12;22)(q21;q12)	<i>EWSR1-ATF1</i>
polymorfní adenokarcinom kribriformní adenokarcinom	t(1;14)(p36.11;q12) t(X;14)(p11.4;q12) 19q13.32 2p21	<i>PRKD1</i> mutace <i>ARID1A-PRKD1</i> <i>DDX3X-PRKD1</i> <i>PRKD2</i> rearrangement <i>PRKD3</i> rearrangement
myoepiteliální karcinom, světlobuněčná varianta	t(22;xx)	<i>EWSR1</i>

1.2. Klinicko-patologické aspekty nádorů slinných žláz

Současná WHO klasifikace (r. 2017) definuje 11 benigních adenomů a 21 karcinomů slinných žláz (tab. č. 2). Biologické vlastnosti posledně uvedených lézí jsou primárně určeny konkrétním histopatologickým typem, který u většiny z nich současně determinuje i stupeň jejich malignity. Tak např. bazocelulární či acinocelulární karcinom jsou indolentní, při neúplném chirurgickém odstranění mají tendenci k lokoregionálním recidivám, jejich sklon k uzlinovým a vzdáleným metastázám je však velmi malý. Oproti tomu salivární duktální karcinom vykazuje značně agresivní růst s vysokou incidencí lymfogenních metastáz již při nízkém klinickém stádiu (15, 16). Generální histopatologický grading (který je u většiny solidních non-salivárních malignit základním prognostickým faktorem) se tudíž u této onkologické skupiny jeví zbytečným a jeho použití není proto v současnosti doporučováno. Uplatňuje se jen u některých jednotek, konkrétně u karcinomu adenoidně cystického, mukoepidermoidního, intraduktálního a dále u adenokarcinomu jinak nespecifického (NOS). Odlišnosti v dignitě jednotlivých salivárních karcinomů odráží jejich rozdělení na leze s vysokým a nízkým biologickým rizikem (high a low-risk), (6) viz tab. č. 3.

Tab. č. 2: WHO klasifikace karcinomů slinných žláz (Barnes)

benigní tumory

- pleomorfní adenom
- myoepiteliom
- bazocelulární adenom
- Warthinův tumor
- onkocytom
- lymfadenom
- cystadenom
- sialadenoma papiliferum
- duktální papilom
- sebaceózní adenom
- kanalikulární a jiné duktální adenomy

maligní tumory

- acinocelulární karcinom
- sekreторický karcinom (*původně označený jako mamární analogický sekreторický karcinom – MASC*)
- mukoepidermoidní karcinom
 - low-grade

- intermediate-grade
- high-grade
- adenoidně cystický karcinom
 - s převahou tubulární/kribriformní složky
 - >30% solidní složky
- polymorfní adenokarcinom
 - klasický (*dříve polymorfní low-grade adenokarcinom*)
 - kribriformní (*dřívější název kribriformní adenokarcinom jazyka a malých slinných žláz, jako samostatná jednotka nebyl uznán*)
- epiteliálně-myoepiteliální karcinom
- (hyalinizující) karcinom z jasných buněk
- bazocelulární adenokarcinom
- sebaceózní adenokarcinom
- intraduktální karcinom
 - low-grade
 - high-grade
- adenokarcinom, NOS
 - low-grade
 - high-grade
- salivární duktální karcinom
- myoepiteliální karcinom
- karcinom z pleomorfního adenomu
 - low-grade, high-grade
 - intrakapsulární
 - minimálně invazivní
 - invazivní
- karcinosarkom
- špatně diferencovaný karcinom: neuroendokrinní a non-neuroendokrinní
 - nediferencovaný karcinom
 - velkobuněčný neuroendokrinní karcinom
 - malobuněčný neuroendokrinní karcinom
- lymfoepiteliální karcinom
- skvamocelulární karcinom (*jen po vyloučení metastázy z jiného primárního zdroje*)
- onkocytický karcinom
- jiné
- sialoblastom

Tab. č. 3. Rozdělení karcinomů slinných žláz dle biologického rizika.

s nízkým rizikem (low-risk)	s vysokým rizikem (high-risk)
- karcinom acinocelulární	- karcinom adenoidně cystický s převahou tubulární/kribriformní složky > 30 % solidní složky
- sekretorický karcinom	- špatně diferencovaný karcinom: neuroendokrinní a non-neuroendokrinní - nediferencovaný karcinom - velkobuněčný neuroendokrinní karcinom - malobuněčný neuroendokrinní karcinom
- karcinom mukoepidermoidní ○ low-grade ○ intermediate-grade	- karcinom mukoepidermoidní ○ high-grade
- polymorfní adenokarcinom klasický	- polymorfní adenokarcinom kribriformní
- karcinom epiteliálně-myoepiteliální	- karcinom skvamocelulární
- (hyalinizující) karcinom z jasných buněk	- karcinom salivární duktální
- adenokarcinom bazocelulární	- karcinosarkom
- adenokarcinom sebaceózní	- karcinom lymfoepiteliální
- karcinom intraduktální low-grade	- karcinom intraduktální high-grade
- adenokarcinom, NOS low-grade	- adenokarcinom, NOS high-grade
- karcinom myoepiteliální	
- karcinom onkocytický	
- karcinom z pleomorfního karcinomu low-grade, intrakapsulární, miniinvazivní	- karcinom z pleomorfního karcinomu high-grade, invazivní

Pro salivární karcinomy je typická, nikoliv však absolutně platná korelace mezi stupněm malignity a klinickým stádiem. Léze nízkého biologického rizika jsou tak většinou diagnostikovány v počátečních stádiích jejich růstu. Jsou převážně dobře ohraničené, někdy i opouzdřené, a dosažení mikroskopicky negativních resekcčních okrajů nečiní proto většinou potíží. Hlavním klinickým problémem těchto tumorů je skutečnost, že při fyzikálním vyšetření jakož i na zobrazovacích metodách se jeví jako benigní adenomy. Neúplné odstranění, ke kterému tyto low-risk tumory mohou svádět, vede - mnohdy až za řadu let či desetiletí - k opakovaným recidivám, završeným úmrtím nemocného, např. u acinocelulárního a low-grade mukoepidermoidního karcinomu. Tyto původně biologicky relativně příznivé léze mohou podlehnout tzv. high-grade transformaci, která dramaticky mění jejich chování a tedy i terapeutický přístup (59).

Zcela jiná je situace u karcinomů vysokého biologického rizika. Pro značně agresivní růst jsou diagnostikovány většinou až v pokročilých klinických stádiích, kdy na velké ploše pronikají do okolních tkání, infiltrují cévy a nervy a v asi 20 % vykazují regionální metastázy. U salivárního duktálního karcinomu není vzácné, že výrazně infiltrativně roste již záhy po svém vzniku. Kompletní odstranění je z onkochirurgického hlediska proto možné jen u malé části nemocných. Ve většině případů nacházíme mikroskopickou pozitivitu resekcčních okrajů. Prognóza je i přes radikální operační výkon na primárním ložisku i krčních uzlinách a adjuvantní radioterapii pochmurná. (8, 57)

1.3. Lymfogenní metastázy u karcinomů slinných žláz.

Podobně jako u jiných tumorů snižují lymfogenní metastázy přežívání až o 50 % i u salivárních karcinomů (30). Udávaná incidence uzlinového postižení, pohybující se v celé této nádorové skupině mezi 15 až 38 %, je závislá na klinickém stádiu tumoru a jeho histopatologickém typu (resp. biologickém riziku). U high-grade tumorů činí průměrně 49 %, u jejich nejagresivnějších forem dosahuje až 60 – 80 % (např. high-grade mukoepidermoidní karcinom, nediferencovaný karcinom). U low-risk nádorů se výskyt uzlinových metastáz blíží nule, jen zřídka je u některých histopatologických typů udávána jejich až 20% incidence (89).

Uzlinové metastázy karcinomů příušní žlázy postihují především (v 74 %) oblast II, ostatní oblasti asi v 15 – 20 % cN+ pacientů. Incidence okultních metastáz karcinomů příušní žlázy kolísá ve značném rozmezí 12-50 %. Většina je lokalizována v oblasti II a III. S klinicky pozitivním uzlinovým nálezem (cN+) přichází 15-38% pacientů s primárními karcinomy glandula parotis (36, 61, 82). Výskyt lymfogenních metastáz podmiňuje řada faktorů. Nejdůležitějším je histologický typ, resp. stupeň malignity primárního tumoru. Zatímco ve skupině high-grade karcinomů je incidence metastáz 36-49%, u low-grade tumorů se pohybuje pouze v rozmezí 15-22% (41, 89). Z klinických parametrů se jako významné jeví vyšší T stádium, mužské pohlaví a věk nemocného nad 69 let (41, 62). Lymfogenní metastázování salivárních karcinomů ovlivňuje i místo jejich vzniku: v Armstrongově sestavě činila u parotických lézí incidence klinicky manifestních krčních ložisek 16%, zatímco u karcinomů gl. Submandibularis a gl. Sublingualis byla poloviční (1,2). Jiné studie však připisují nejvyšší metastatický potenciál tumorům žlázy podčelistní (8). Výskyt metastáz karcinomů gl. parotis v jednotlivých krčních úrovních není vyrovnaný. Přestože krčními metastázami bývá vzhledem k anatomii lymfatické drenáže žlázy nejčastěji postižena oblast II, metastázy nacházíme poměrně často také v oblastech I, III, IV a V. Proto je indikována radikální či modifikovaná radikální krční disekce I-V. U karcinomů žlázy podčelistní a podjazykové lze vzhledem k predilečnímu výskytu metastáz v oblasti I, II a III zvažovat selektivní krční disekci těchto oblastí (supraomohyoidní selektivní krční direkce). Metastatické postižení uzlin v jednotlivých úrovních u karcinomů malých slinných žláz je určeno jejich anatomickou lokalitou, která rozhoduje i o rozsahu krčních disekcí.

Dosud nevyřešený klinický problém představují v kontextu lymfogenního šíření karcinomů příušní žlázy para- a intraparotické uzliny, které při metastatickém postižení nedosahují v naprosté většině případů větších rozměrů. Metastázy často unikají klinickému vyšetření jakož i detekci zobrazovacími metodami a jsou odhalovány až při rychlé či definitivní biopsii primárního tumoru. Incidence intraparotických uzlinových metastáz, které současná TNM klasifikace neodlišuje od metastáz v krčních uzlinách, ani jejich klinický význam nejsou spolehlivě známy. To je dáno malým počtem publikovaných relevantních prací a také různým rozsahem prováděných operací, kdy u laterální parotidektomie musíme očekávat nižší záchyt nežli při odstranění celé žlázy. Podstatnou roli sehrává též vigilance patologa při zpracování histologického preparátu. Podíl intraparotických uzlin na všech okultních uzlinových metastázách se u různých autorů liší, v souboru Armstronga činil přibližně 23% (1,2). Klussmann (41) udává postižení intraparotických uzlin u 39% z celého souboru karcinomů příušní slinné žlázy, u pacientů s okultními krčními metastázami byla nalezena mikroskopická ložiska karcinomu i v uzlinách intraparotických dokonce v 80%. Výskyt metastáz

v příušní žláze byl navíc spojen se signifikantně vyšším rizikem lokoregionální recidivy tumoru. Vysoká incidence okultních intraparotických metastáz proto opravňuje k provedení totálního výkonu u všech karcinomů gl. parotis.

Názory na indikace elektivních krčních disekcí u cN0 pacientů nejsou jednotné, většinou jsou však prováděny u karcinomu vysokého biologického rizika a pokročilého klinického stádia (T3, T4). Stejně tak není shoda na rozsah elektivních blokových disekcí. Převážná část autorů je však provádí v oblasti II, III a Va.

1.4. Možnosti prognózování karcinomů slinných žláz

1.4.1. Význam histopatologického gradingu pro prognózu salivárních karcinomů

Prognostický význam dnes již obsoletního histopatologického gradingu karcinomů slinných žláz byl zkoumán několika nezávislými studii. Podle Lima (46, 47) činí pětileté přežití u pacientů s tumory nízkého a středního stupně malignity 85-90 %, s high grade karcinomy pouze 40-50 %. Renehan (59) u karcinomů gl. parotis uvádí desetileté přežití u low grade karcinomů 93 %, a u intermediate a high grade afekcí 40-50 %.

Prognostický význam gradingu byl prokázán Armstrongem (1) pouze u tumorů vyšších klinických stádií (III a IV). Přežití pacientů s low- vs. high-grade karcinomy, léčenými ve stádiu I a II se signifikantně nelišilo.

1.4.2. Vliv klinického stagingu na prognózu salivárních karcinomů

Vedle stupně histopatologické diferenciaci byly jako prognostické faktory karcinomů slinných žláz zkoumány i jejich klinické charakteristiky. Některé studie prokázaly negativní vliv věku, mužského pohlaví, submandibulární lokalizace (54, 57), a zejména přítomnosti krčních metastáz.

Podobně jako u dlaždicobuněčných karcinomů hlavy a krku, je i u salivárních tumorů prognóza determinována klinickým stádiem (viz tab.č. 4). Bylo zjištěno, že staging má dokonce větší prognostickou váhu nežli stanovení stupně jejich diferenciaci (1, 2, 46, 47, 59).

Tab. č. 4: 10leté přežití pacientů karcinomů slinných žláz v závislosti na klinickém stadiu

Autor	I st.	II st.	st. III	st. IV
Lima	97%	81%	56%	20%
Renehan	96%	70%	47%	17%

Klinicky důležitým prognostickým faktorem, určujícím rozsah chirurgické resekce příušní žlázy, je velikost tumoru, kdy pacienti s karcinomy menšími než 4 cm vykazují bez ohledu na histopatologický grading signifikantně delší přežití, menší výskyt uzlinových i vzdálených metastáz (Speight PM, Barrett AW. Salivary gland tumors. *Oral Diseases*, 8, 2002, 229-240.) - tab. č. 5.

Tab. č. 5. Vliv velikosti parotických karcinomů na přežití, výskyt okultních a vzdálených metastáz (Speight)

	velikost tumoru	velikost tumoru	
<i>bez ohledu na grading</i>	< 4 cm	> 4 cm	autor
5leté přežití	> 90 %	< 40 %	<i>Renehan , 1996</i>
	> 75 %	< 40 %	<i>Spiro, 1986</i>
okultní krční meta	4 %	20 %	<i>Armstrong, 1992</i>
	8 %	19 %	<i>Frankenthaler, 1993</i>
vzdálené meta	0 %	1.6 %	<i>Gallo, 1997</i>
	0 %	8.5 %	<i>Renehan, 2001</i>

Pro předpověď vzniku lokoregionálních recidiv karcinomů příušní žlázy bylo vypracováno schéma, které pracuje s klinickými údaji, a histopatologický typ nádoru nebere v úvahu (39). Pro komplikovanost a časovou náročnost však jeho použití není všeobecně rozšířeno.

1.4.3. Prognostický význam genových abnormalit u salivárních karcinomů

V současné době je věnováno mnoho pozornosti molekulárně-genetickým aspektům vzniku, progresu a šíření zhoubných tumorů. Hlavním klinickým významem takto detailního poznání podstaty uvedených onkologických jevů je možnost biologické léčby, zabraňující jednotlivým krokům v jejich onkogezi. Opomenout nelze ani možný prediktivní, prognostický a diferenciativně diagnostický význam detekovaných genových anomálií.

I když obecně je prognóza salivárních karcinomů dána výše uvedenými faktory, individuální průběh především jejich high-risk forem se může od přepokládaného značně lišit. Proto pozornost upíná k hledání nových, prognostických a prediktivních molekulárních markerů. Jde především o identifikaci genů, resp. jejich produktů, odpovědných za iniciaci, progresi a metastázování jednotlivých typů nádorů. Kromě toho se přepokládá, že jejich cílenou biologickou blokádou by bylo možno zlepšit křivky přežití u prognosticky závažných, vysoce rizikových salivárních nádorů (46, 47, 48, 50, 51, 52, 55, 56). Cílená blokáda specifických molekul je obecným principem léčby malignit, která byla již jako standard zavedena u hematoonkologických afekcí a uplatňuje se i u některých solidních nádorů, především nemalobuněčných karcinomů plic, mammy, karcinomu kolorekta, gastrointestinálního stromálního tumoru, maligního melanomu, jakož i dlaždicobuněčných karcinomů horních cest dýchacích a polykacích, a dalších (63).

Onkogenetické alterace jsou způsobeny celou řadou mechanismů. Jedním z nich jsou i fúzní translokace, které vedou ke vzniku nových genů. Předpokládá se, že posledně uvedené genetické změny jsou odpovědné za vznik až 20 % všech lidských neoplasií (65). Z celého širokého histopatologického spektra salivárních nádorů byly tyto genové alterace identifikovány zatím jen u 5 jednotek.

Pleomorfní adenom je iniciován unikátní, a tedy pro histopatologickou diferenciativní diagnostiku významnou fúzní translokací genů PLAG1 a HMGA2 (69). Kancerizace tohoto nádoru je způsobena amplifikací genů MDM2, HMGA2 – WIF1 a genu HER2 (70).

Pro mukoepidermoidní karcinom je typická translokace genů *CRTC1* a *MAML2* (71). Ta má význam i prognostický, neboť je spojena s delší délkou přežití, nižším výskytem lokálních recidiv a menší tendencí k metastázování (72). Detekce fúzních genů *ETV6* a *NTRK3* (73) umožnila identifikaci sekretorického karcinomu slinných žláz (mammary analogue secretory carcinoma), který byl dříve mylně diagnostikován jako biologicky příznivější karcinom z acinárních buněk. Pro hyalinizující karcinom z jasných buněk je charakteristická translokace mezi geny *ESWR1* a *ATF1* (75).

Jedním ze zkoumaných genů u karcinomů slinných žláz byl i nádorový supresor *p53*. Luukkaa (39) však nezjistil prognostický význam jeho exprese v širokém spektru 17 histopatologických jednotek a k podobným závěrům došel i Felix (38) u salivárního duktálního karcinomu.

Dalším ze salivárních nádorů, u něhož byly studovány genové abnormality, je i adenoidně cystický karcinom, u kterého Jian Fen He (40) podobně jako Sasahira (41) zjistili negativní korelaci mezi expresí supresorového genu *RUNX3* s jeho prognózou. Tento tumor, podobně jako některé další karcinomy slinných žláz, je spojován se zvýšenou, avšak prognosticky irelevantní expresí onkoproteinu *C-Kit*, *EGFR* a *VEGF* (31, 42, 43, 44, 45). Dalším zkoumaným faktorem u salivárních malignit byla exprese genu pro sphingosine 1 (*SPHK1*). *SPHK1* je bioaktivní lipidový mediátor, který má důležitou roli ve fyziologických procesech jako je buněčná proliferace a angiogeneze. Zvýšená hladina této kinázy byla prokázána u širokého spektra malignit spojených se závažnou prognózou (např. u glioblastomu, karcinomu prostaty, karcinomu žaludku) a je hodnocena jako negativní prognostický faktor (48). Podobně Liu (47) prokázal, že overexprese tohoto faktoru je spojena s kratší dobou přežití u salivárních karcinomů.

1.5. Adenoidně cystický karcinom slinných žláz

Zvláštní postavení mezi karcinomy slinných žláz má pro svoje biologické specifity adenoidně cystický karcinom (ACC). Tato jednotka zastupuje asi 20 % všech maligních slalomů (6, 10, 19) a v oblasti malých slinných žláz je vůbec nejčastější histopatologickou jednotkou této onkologické skupiny (7). Postihuje pacienty každého věku, s maximem v 5. a 6. decéniu (19). Časté je perineurální šíření, prakticky znemožňující úplné chirurgické odstranění tumoru, který proto vykazuje výraznou tendenci k lokoregionálním recidivám. Adenoidně cystický karcinom se skládá z tubulárních, kribriformních a solidních struktur. Relativní zastoupení posledně uvedené složky se stalo základem později modifikovaného histopatologického gradingu (9, 10). Seethala (21) však

poukazuje na to, že jeho prognostický význam nebyl jednoznačně prokázán. Rozhodujícím prognostickým činitelem u ACC je (podobně jako u dalších karcinomů slinných žláz) jeho klinické stadium.

Velmi rychlým fatálním průběhem se vyznačují ACC, u nichž došlo k high-grade transformaci. Pro tuto histopatologickou jednotku, vyčleněnou z ACC Seethalou v r. 2007, je charakteristická dediferenciace nádorových, duktálních a myoepitelových buněk, jejich vysoká mitotická aktivita a nepravidelnosti jader (22). ACC charakterizuje pomalá, indolentní progresse a pozdní metastázy, jež vedou ve většině případů k letálnímu zakončení choroby (1, 20). Proto je tento nádor řazen mezi léze s vysokým biologickým rizikem. Na rozdíl od ostatních salivárních karcinomů je ACC typická hematogenní diseminace, směřující predilekčně do plic a kostí (41). Oproti tomu tendence k lymfogenním metastázám je nízká. Výjimku z tohoto pravidla představují high-grade transformaci podlehnoucí ACC, jež vykazují pozitivní uzlinový nález až v 60 % případů (31). Incidence cN+ „klasických“ případů většinou nepřesahuje 5 % (2, 17, 38). Výskyt okultních metastáz je ještě nižší, podle některých pramenů dokonce nulový (14), takže elektivní blokové disekce u tohoto typu nádoru nejsou všeobecně považovány za oprávněné. Woolger (43) však poukázal na skutečnost, že v důsledku chybění tvorby desmoplastického stromatu adenoidně cystickým karcinomem zůstává objem jím postižených lymfatických uzlin velmi malý, a tyto pak po dlouhou dobu zůstávají nedetekovány. Je tak otázkou, zda skutečný lymfogenní metastatický potenciál ACC není vyšší, nežli se všeobecně udává. Zhang (48) studoval tvorbu NF- κ B a VEGF ve dvou buněčných liniích tohoto tumoru, lišících se sklonem k hematogenní diseminaci. Buňky s vysokým metastatickým potenciálem vykazovaly významně vyšší expresi obou faktorů, odrážející se i v signifikantně výraznější schopnosti stimulovat pučení a migraci krevních endotelií, pěstovaných v gelové matrix, resp. ve tkáňových kulturách. Tyto výsledky ukazují, že metastatická schopnost buněk ACC je dána jejich vyšším angiogenetickým potenciálem. Li (22) zkoumal ve velké sérii 63 pacientů imunohistochemickou expresi VEGF(A) a její vliv na klinické parametry tohoto tumoru. Pozitivní, cytoplazmatická a membránová reakce byla nalezena u 80 % případů, přičemž její intenzita byla výrazně vyšší nežli u buněk normální žlázy. Signifikantně vyšší imunoreakci vykazovaly solidní histologický subtyp nádoru, jeho pokročilejší klinická stádia, recidivy a perineurální invaze. Multivariátní statistická analýza pak potvrdila, že u ACC je exprese VEGF bez ohledu na grading, způsob terapie, klinické stádium a perineurální invazi nezávislým prognostickým činitelem.

Většina pacientů s ACC zmírá na plicní metastázy. Jejich konvenční onkologická léčba však nepřináší uspokojivé výsledky, proto se naděje upíraly k terapii biologické. Při velmi nízké či nepravdělné expresi některých onkogenů, např. Her2/neu resp. EGFR (21), byla zaměřena na

blokádu c-kit genu, který ACC exprimuje silnou měrou téměř ve 100 % případů (36). Dosavadní studie, hodnotící účinnost této léčby Imatinibem, a později i modernějšími tyrosinkinázovými inhibitory s afinitou i k dalším receptorům tohoto typu (nilotinib, sunitinib, dasatinib), neprokázaly zvýšený léčebný efekt (10, 11, 13). Dalším potenciálním cílem v terapii ACC se proto jeví blokáda angiogenní kaskády, zprostředkované právě NF- κ B, resp. VEGF(A). Bortezomib, namířený proti prvně uvedenému molekulárnímu cíli, byl zatím testován jen v jedné studii. Nebylo dosaženo kompletní ani parciální léčebné odpovědi, avšak u 71 % pacientů došlo ke stabilizaci, trvající v průměru 4,2 měsíce (1). Bevacizumab, monoklonální protilátka interferující s VEGFR-1, VEGFR-2 i VEGFR-3, byla již schválena pro léčbu karcinomu kolorekta, ledviny, prsu a nemalobuněčného karcinomu plic, a v současnosti je testována i pro další malignity (19), nikoliv však pro salivární tumory. V experimentální studii na zvířeti však bylo prokázáno, že duální tyrosinkinázový inhibitor AEE 788, samotný či v kombinaci s klasickou chemoterapií, snižuje u ACC produkci epidermálního růstového faktoru (EGFR) a VEGFR-2, stimuluje apoptózu nádorových buněk i cévních endotelií a redukuje mikrovaskulární denzitu tímto tumorem vytvářených krevních cév. Uvedené výsledky naznačují, že tato terapie by mohla být efektivní u salivárního ACC (47).

1.6. Význam vaskulárních endoteliálních růstových faktorů pro růst a šíření nádorů

Všeobecně se předpokládá, že po iniciaci nádoru je tento živen do objemu, obnášejícího asi jeden mm^3 , difúzí z okolí. Po této prevaskularizační fázi jsou další růst, lokální šíření, jakož i následná generalizace tumoru závislé na ischemií indukované novotvorbě krevních kapilár, zajišťujících jeho zvýšené nutriční požadavky. Tento angiogenetický proces je spouštěn (tzv. angiogenic switch) a dále stimulován celou řadou faktorů, jež si vytvářejí a do okolní tkáně parakrinním mechanismem uvolňují samotné nádorové buňky (19, 44). Pro řízení angiogenní kaskády se jako klíčový jeví nukleární faktor kappa B (NF- κ B), který reguluje tvorbu VEGF A, jemuž je v cévní novotvorbě připisována největší role.

VEGF představuje rodinu 7 proteinů (PlGF – homologní placentární růstový faktor, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E a VEGF-F), které regulují vaskulogenezu v embryonálních tkáních, angiogenezu u savců a neoangiogenezu u solidních maligních nádorů (46). Efekt těchto cytokinů, které jsou produkovány normálními, jakož i nádorovými buňkami, je realizován prostřednictvím tyrosinkinázových endoteliálních receptorů VEGFR-1, VEGFR-2 a VEGFR-3 (9, 42). První dva z uvedených receptorů spouštějí po navázání VEGF-A a VEGF-B

intracelulární transdukční kaskádu, způsobující angiogenezu a zvýšenou permeabilitu krevních cév. VEGF-C, VEGF-D a VEGF-E pak stimulují VEGFR-3 receptory endotelií lymfatických cév, což vede k bloádě jejich apoptózy, proliferaci a migraci (18)

Metastázování do lymfatických uzlin je klíčovým krokem v diseminaci maligních epiteliálních nádorů, mechanismus rozsevu a nidace nádorových buněk však nebyl doposud ve všech detailech objasněn (52). Tradiční představa je, že nádorové buňky se dostávají do stávající, preformované lymfatické sítě. Nicméně v poslední době se objevují experimentální i klinické důkazy o tom, že některá lidská neoplasmata stimulují růst nových, peri- i intratumorálních lymfatických cév skrze zvýšenou tvorbu různých lymfangienních cytokinů (10, 48, 56, 69, 71, 72). Rozhodující roli hrají v tomto procesu hrají vaskulární endoteliální růstové faktory VEGF-D (86) a především VEGF-C, který usnadňuje i průnik nádorových buněk do lymfatických cév zvýšením permeability jejich endotelu (52).

V klinických studiích byla prokázána spojitost mezi expresí VEGF- A, VEGF-C, a VEGF-D a hustotou lymfatických cév (LVD – lymphatic vessels density), jakož i incidencí metastáz do lymfatických uzlin a prognózou různých lidských karcinomů, včetně spinocelulárních karcinomů hlavy a krku (24, 29, 46, 63, 80, 84, 85)

1.7. Význam vaskulárních endoteliálních růstových faktorů pro růst a šíření salivárních nádorů.

Informace, týkající exprese angiogenních faktorů, jejich významu pro prognózu, tvorbu lymfatických uzlin a uzlinové metastázování u salivárních tumorů jsou dosud velmi kusé. Lim (46) testoval expresi VEGF(A) v širším histopatologickém spektru 45 salivárních karcinomů. Podobně jako Li (45) zjistil korelaci VEGF(A) imunopozitivity s klinickým stádiem, perineurální a intravaskulární invazí, recidivami a přežitím. U patnácti ACC však nebyl – na rozdíl od karcinomu mukoepidermoidního - prokázán žádný vztah mezi intenzitou reakce a jeho histologickým stupněm malignity. Souvislost mezi expresí VEGF(A) a šířením ACC krevní cestou potvrzuje i nález Tanga (75), který zjistil v souboru 35 případů s hematogenním rozsevem signifikantně vyšší histoskóre u metastáz nežli u korespondujících primárních lézí.

Teymoortash (77) porovnával hustotu intratumorálních lymfatických uzlin ve Warthinově tumoru a pleomorfním adenomu. Významně vyšší hodnoty u prvního z nich považoval za důkaz, že jeho

onkocytární buňky stimulují lymfangiogenezu. Soares (70) sledovala LVD u 8 minimálně a 8 široce invazivních karcinomů z pleomorfního adenomu. V žádném případě nepozorovala proliferující mízní kapiláry, což nasvědčovalo tomu, že intra- i peritumorózní lymfatická síť pozůstávala z preexistujících cév. Mello (50) vyšetřil 15 a 60 histologicky různých salivárních karcinomů, spojených s vysokým, respektive nízkým rizikem (včetně 15 případů ACC) vzniku uzlinových metastáz. Mezi oběma skupinami nebyly prokázány signifikantní rozdíly v expresi VEGF-C a hustotě lymfatik. Autor se proto domnívá, že maligní sialomy používají k šíření v lymfatických cestách jiné molekulární mechanismy. K opačným závěrům dospěl Lim (47), který v širokém spektru salivárních karcinomů prokázal pozitivní korelaci exprese VEGF s jejich metastatickým lymfangiogenním potenciálem. Součástí jeho studie bylo i 15 ACC, z nichž všechny tři případy s pozitivním uzlinovým nálezem vykazovaly velmi intenzivní imunoreakci. Stimulaci tvorby nových míznic tímto nádorem zpochybňuje studie Fujitova (17), kdy buňky analyzovaných 29 případů exprimovaly slabě VEGFR-3, avšak vůbec a téměř ne VEGF-D, resp. VEGF-C. Na periférii tumorů byla nalezena jen velmi chabě vytvořená lymfatika, jejichž počet nepřevyšoval denzitu mízních cév v parenchymu okolní žlázy. Z celého souboru metastázoval do regionálních uzlin jen jeden nádor, a hustota jeho lymfatických cév byla stejná jako u ostatních, lymfogenních metastáz prostých karcinomů.

2. Cíle práce

Z výše uvedeného je zřejmé, že současným problémem karcinomů slinných žláz je stanovení jejich prognózy a neuspokojivé výsledky léčby jejich high-risk typů. Potenciální možností zlepšení uvedeného stavu je blokáda jejich lymfangiogenního šíření. V tomto ohledu se jako nadějná jeví experimentální práce, která prokazuje, že blokáda VEGFR-3 může vést k zamezení šíření tumoru do lymfatických uzlin. (30)

Disertace proto sleduje následující cíle:

- 1. Stanovit hustotu intra- a peritumorosní lymfatické sítě karcinomů slinných žláz**
- 2. Stanovit expresi VEGF-C a VEGF-D v nádorových buňkách**
- 3. Stanovit korelaci mezi expresí těchto faktorů a hustotou obou lymfatických sítí jakož i patologickým stavem lymfatických uzlin**
- 4. Stanovit prognostický význam exprese obou lymfangiogenních faktorů a hustoty obou lymfatických sítí**

3. Materiál a metodika

3.1 Klinická data

Salivární karcinomy byly rozděleny do dvou souborů. První (soubor I) obsahoval histopatologické jednotky jiné nežli karcinom adenoidně cystický, který jsme pro jeho biologické specifity, zejména pak tradovanou malou tendenci k šíření lymfatickými cévami, hodnotili zvlášť (soubor II). K porovnání lymfangiogenezy u karcinomů a benigních adenomů slinných žláz jsme vytvořili další soubor, pozůstávající z Warthinových tumorů a onkocytomů (soubor III).

Do souboru I bylo zařazeno 42 pacientů (19 žen a 23 mužů) s dříve neléčenými karcinomy slinných žláz, s věkovým rozmezím mezi 19 s 89 lety (průměr 62,7 + /- 16, median 65,5) let. Třicet osm tumorů vycházelo z příušní žlázy a čtyři ze žlázy submandibulární. Nejběžnější histopatologickou jednotkou byl mukoepidermoidní karcinom (10 případů), následován salivárním duktálním karcinomem a adenokarcinomem NOS (po 7 případech), spinocelulární karcinom (4 případy), nediferencovaný a acinocelulární karcinom (po 3 případech), bazocelulární adenokarcinom, karcinom z pleomorfního adenomu a cystadenokarcinom (po 2 případech), malobuněčný neuroendokrinní a mammární, analogicky sekretorický karcinom (po 1 případě). Dvacet a 22 karcinomů bylo hodnoceno jako high-, resp. low-risk léze podle WHO klasifikace (Barnes). Šestnáct a 26 pacientů bylo diagnostikováno v časném (I nebo II) resp. pozdním (III nebo IV) klinickém stádiu. U jedenácti z 42 případů byly přítomny klinicky pozitivní krční krční uzliny (cN+). Třicet devět pacientů podstoupilo chirurgickou léčbu, spočívající v totální (14x), superficiální (19x) parotidektomii nebo extrakapsulární disekci (2x), čtyři submandibulární tumory byly odstraněny kompletně se žlázou. U tří pacientů v celkově špatném stavu byla provedena pouze probatorní biopsie, po níž následovala radioterapie. Devatenáct pacientů se podrobilo pooperačně adjuvantní radioterapii samotné, nebo v kombinaci s chemoterapií. Kurativní blokovaná krční disekce I-V byla provedena u všech jedenácti cN+ pacientů, kteří podstoupili chirurgickou léčbu.

Elektivní blokovaná disekce II, III a Va byla provedena u 31 cN0 pacientů, z nichž 13 mělo parotické tumory v klinickém stádiu $T \geq 2$ a 18 (17x gl. parotis a 1x gl. submandibularis) ve stádiu $T < 2$.

Histopatologická analýza odhalila u 25, 11 a 7 pacientů pN0, pN, resp. pN2 uzlinový stav. Kompletní remise byla dosažena u 38 (82,6%) pacientů, u 12 z nich se rozvinula lokoregionální a/nebo vzdálená rekurence. 16 pacientů zemřelo na nemoc, 3 žijí s nemocí a 26 bez onemocnění. Jeden pacient byl ztracen ze sledování, follow-up interval činil 4,3 a 136 (průměr 30,4 ± 27,5)

měsíců.

Do souboru II bylo zařazeno 20 pacientů (12 žen a 8 mužů) s diagnózou ACC, s věkovými rozmezím od 24 do 84 (průměr 56,4 + - 15,0) let. Čtrnáct tumorů vycházelo z velkých (6 příušní žláza, 6 submandibulární žláza, 2 sublingvální žláza) a šest z malých slinných žláz (po dvou z bukální sliznice a maxily, po jednom z tvrdého patra a palatinální tonsily). Sedm, šest, tři a čtyři nádory byly diagnostikovány v klinickém stádiu I, II, III, respektive IV. Šest pacientů mělo klinicky pozitivní krční uzliny (cN+). U jedenácti a devíti nádorů byl stanoven histologický grading G2, resp. G3, podle Szanto (75). Šestnáct z sedmnácti operovaných pacientů bylo následně léčeno adjuvantní radioterapií samotnou nebo v kombinaci s chemoterapií. Samotná radioterapie, resp. konkomitantní chemoradioterapie byla aplikována ve dvou případech. Jeden pacient s lokálně velmi pokročilým tumorem a vzdálenými metastázami odmítl podstoupit léčbu po provedené probatorní biopsii. U tří ze šesti cN+ pacientů (jeden pacient odmítl léčbu a dva podstoupili radioterapii na oblast krku při N+) byla provedena kurativní bloková disekce krčních uzlin. Tři nemocní s cN0 nálezem na krčních uzlinách, ale s klinicky suspektní high-grade malignitou, u nichž jsme nepomýšleli na možnost diagnózy adenoide cystického karcinomu příušní žlázy, podstoupili elektivní krční blokovou disekci.

Kompletní remise byla dosažena u 18 z 20 pacientů. Pacienti, jež jí nedosáhli, byli ze sledovaného souboru vyloučeni. Sledovací interval se pohyboval v rozmezí 5 až 286 (medián 46,7) měsíců. Klinicko-patologická data jsou sumarizována v tabulce I.

Soubor III pozůstával z 19 Warthinových tumorů (WT) a 13 onkocytomů. První z těchto histopatologických entit se vyskytla u 2 žen a 17 mužů, ve věkovém rozmezí 46 až 82 (průměr 65,4) let. U dvou z těchto 19 pacientů šlo o oboustranný duplicitní, resp. samostatný tumor. Celkově byla tedy provedena analýza 23 WT. Všechny tumory měly origo v kaudě příušní žlázy. Chirurgická léčba spočívala v jednoduché enukleaci (10 případů), částečné (7 případů) a povrchové (2 případy) parotidektomii. Dvacet Warthinových tumorů bylo obdařeno středně nebo silně vyvinutým lymfoidním stromatem, v dalších třech případech bylo stroma chudé.

Ve skupině monomorfních onkocytárních adenomů (OCA) bylo analyzováno 13 případů (5 žen a 8 mužů, ve věkovém rozmezí 55-75, průměr 61 let). Kromě jednoho případu v hlubokém laloku, všechny tumory byly lokalizovány v povrchní části příušní žlázy. U 10 a 3 pacientů byla provedena parciální, resp. superficiální konzervativní parotidektomie.

VEGF-C a VEGF-D imunohistochemie

Řezy tloušťky 4 mikrometry byly řezány z archivních parafinových tkáňových vzorků. Řezy byly deparafinizovány a rehydratovány v stupňovaném alkoholu. Endogenní peroxidáza byla blokována hydrogen peroxidázou po dobu 15 minut. Řezy byly opláchnuty v destilované vodě a následně v pufovacím roztoku. Ke stanovení imunohistochemických reakcí v nádorových buňkách byly použity protilátky anti-VEGF-C a anti-VEGF D (Abcam, 330 Cambridge Science Park, Cambridge, United Kingdom, ředění 1:50, resp. 1:100), k detekci endotelií lymfatických cév D2-40 antipodoplanin (Dako Denmark, Produktiosvej 42, Glostrup, Denmark, ředění 1:100). K vyšetření bylo použito EnVision a Dual Systém HRP. Enzymatická aktivita byla vizualizovaná diaminobenzidin tetrahydrochloridem při dobarvení hematoxylinem. Pozitivní kontroly byly provedeny dle doporučení výrobce.

Intenzita imunoreakce VEGF-C a VEGF-D v cytoplazmě nádorových buněk byla hodnocena podle Moriyama (36). Stejná intenzita jako u lymfatických endotelií byla určena jako stupeň 2. Chybějící, slabší či silnější barvení bylo označeno jako 0, 1, resp. 3. Relativní zastoupení pozitivních buněk v nádoru bylo skórováno procentuelně podle Lima (15) jako 0 (0-19 %), 1 (20-39 %), 2 (40-50 %), a 3 (60-100 %). Konečné histoskóre bylo stanoveno jako součet intenzity a procenta pozitivních (možné rozmezí tedy od 0 do 6). U adenoidně cystického karcinomu byla imunoreakce vyhodnocena v buňkách převažující (tj. kribriformní, tubulární nebo solidní) histoarchitekturální struktury. U tohoto souboru (II) jsme sledovali imunoreakci a hustotu lymfatické sítě i v přilehlé zdravé slinné žláze.

Vyhodnocení hustoty lymfatických cév

Lymfatické kapiláry byly detekovány pomocí protilátky D2-40. Pro určení hustoty intra- a peritumorálních lymfatik (iLVD, resp. pLVD) bylo hodnoceno 40 polí. V nejvíce vaskularizovaném (tzv. „hot spot“) pak byl stanoven těchto cév na čtverečném milimetru. VEGF-C a VEGF-D imunoreaktivita stejně tak jako hustota lymfatických sítí byla hodnocena zkušeným patologem (LK), neznajícím klinická data.

Statistická analýza

Pro porovnání histoskóre mezi dvěma soubory s nenormální distribucí dat byl použit Mann-Whitney U-test. Souvislost mezi histoskóre, LVD a klinicko-patologickými parametry byla hodnocena Spearmanovým testem. Vliv vybraných parametrů na přežití byl zjišťován pomocí

Kaplan-Meierovou analýzy. Živí pacienti byli klasifikováni jako cenzurovaní, a ti, kteří zemřeli jako „s kompletní odpovědí“. Prognóza skupin byla porovnána použitím long rank testu. U všech analýz byla použito statistické hodnocení v 10.0 (Statsoft Inc). Statistická významnost byla zvažena jako $p < 0.05$.

4. Výsledky

A: skupina karcinomů (I)

U sedmnácti ze všech 42 (40 %) karcinomů byla prokázána současná exprese obou testovaných faktorů, samotná VEGF-C a VEGF-D pozitivita byla nalezena v jednom (2,3%), resp. v třinácti případech (30,9%). Jedenáct nádorů (26,1 %) nevykazovalo imunoreakci žádnou.

Obě, tj. intra- a peritumorální lymfatická síť byly zjištěny ve 35 ze všech 42 případů (83,3%) analyzovaných vzorků. V jednom případě lymfatika kompletně chyběla. U tří low-grade karcinomů (dva acinocelulární karcinomy a jeden low-grade adenokarcinom NOS) byly přítomny výlučně peritumorální cévy. Neoplastické buňky dvou tumorů vykazovaly pozitivní membranozní D2-40 imunoreakci. Hodnoty histoskóre VEGF-C a VEGF-D, iLVD a pLVD jsou sumarizovány v tabulce č. 6.

Tab. č.6: hodnoty histoskóre VEGF-C, VEGF-D a hustoty intra- (iLVD) a peritumorální (pLVD) lymfatické sítě u karcinomů slinivých žláz skupiny I.

	průměr	medián	SD	min	max
VEGF - C	1.40	0	1.93	0	5
VEGF - D	2.39	3	1.89	0	5
iLVD	3.14	3	2.22	0	10
pLVD	6.68	6	3.56	0	14

Vztahy mezi vybranými parametry lymfangiogeneze

Byla prokázána signifikantně pozitivní vzájemná korelace mezi hodnotami histoskóre VEGF-C, VEGF-D, pLVD a iLVD (Wilcoxon, vždy $p < 0.002$), s výjimkou chybění vztahu mezi VEGF-D a iLVD ($p = 0.22$).

Grading a vybrané parametry lymfangiogeneze

High-grade karcinomy ve srovnání s low-grade tumory vykazovaly signifikantně vyšší VEGF-C, iLVD a pLVD (Mann-Whitney, $p < 0.02$). Mezi histoskóre VEGF-D a diferenciací nádoru však závislost prokázána nebyla ($p = 0.95$).

Metastázování do krčních lymfatických uzlin a vybrané parametry lymfangiogeneze

Žádný ze všech sledovaných parametrů, tedy VEGF-C, VEGF-D, iLVD či pLVD, nekoreloval s histopatologickým stavem uzlin (pN) (Kruskal-Wallis, $p > 0.05$).

Vztahy mezi expresí jednotlivých faktorů, hustotou lymfatických cév, prognózou, gradingem a stavem lymfatických uzlin je uveden v grafu 5.

Přežití, délka remise a vybrané parametry lymfangiogeneze

Kaplan-Meierova analýza prokázala, že pacienti s nízkým iLVD a pLVD mají výrazně lepší prognózu (vždy $p < 0.009$) než nemocní s vysokou hustotou obou relevantních lymfatických sítí. Oproti tomu se nepotvrdila závislost mezi histoskóre VEGF-C, VEGF-D a přežitím, u pacientů s tumory s nulovou či minimální expresí jednoho či druhého faktoru byla jen naznačena tendence k jejich delšímu přežití ($p = 0.12$, resp. $p = 0.29$), grafy 1-4.

Kupodivu délka remise nevykazovala závislost na vybraných parametrech lymfangiogeneze, tedy VEGF-C, VEGF-D, iLVD a pLVD ($p > 0.05$).

B: skupina adenoidně cystického karcinomu (II)

Expresie VEGF-C a VEGF-D

Sedmnáct ze všech dvaceti SACC vykazovalo expresi obou VEGF-C i VEGF-D. Samotná pozitivita VEGF-D byla prokázána pouze u jednoho pacienta, zatímco VEGF-C a VEGF-D byly současně negativní ve 2 případech. VEGF-C i VEGF-D imunoreakce byla pozorována ve všech typech buněk (tedy v duktálních a myoepiteliálních/bazálních), vytvářejících histoarchitekturu tohoto tumoru (obr. 1a, b,c). VEGF-C a VEGF-D histoskóre je uvedeno v tabulce č. 7.

Tabulka č. 7: Průměrné hodnoty histoskóre VEGF-C, VEGF-D, iLVD a pLVD u adenoidně cystických karcinomů (ACC) a normální žlázy.

ACC	
VEGF-C	3,65 (± 1,25)
VEGF-D	3,82 (± 0,88)
iLVD	6,32 (± 3,83)
pLVD	7,0 (± 4,04)
normální žláza	
LVD	1,70 (± 2,56)
VEGF-C	1,67 (± 1,78)
VEGF-D	2,33 (± 1,92)

Hustota lymfatických cév u SACC

Intratumorózní lymfatické cévy byly zachyceny ve všech těchto karcinomech. U 4 z nich nebyly přítomny hodnotitelné okraje, proto peritumorózní cévy mohly být zkoumány jen v 16 případech (obr. 2 a 3). U 15 z nich (tj. v 93,8 %) byly tyto kapiláry prokázány. Hustota peri- a intravaskulární sítě (viz tab. I) se vzájemně nelišila (Spearman, $p > 0.05$), byla však signifikantně vyšší než v normální žláze ($p = 0.001$).

Vedle lymfatického endotelu se D2-40 pozitivní reakce vyskytovala v tumorózních myoepiteliálních buňkách.

Expresse VEGF-C, VEGF- D a LVD v normální slinné tkáni

V normálním parenchymu slinné žlázy vykazovaly velmi slabou (převážně stupeň 0) reakci VEGF-C a VEGF-D acinární buňky. Intenzivnější reakce buněk vývodů byla považována za nespecifickou, a nebyla tedy kvantifikována.

Interlobulárně se nacházející lymfatické kapiláry byly provázeny malými vývody a krevními cévami. Obě VEGF histoskóre a hodnota LVD je uvedena v tabulce č 5. Myoepiteliální buňky na periferii acinů a vývodů vykazovaly D2-40 pozitivitu (obr. 4.)

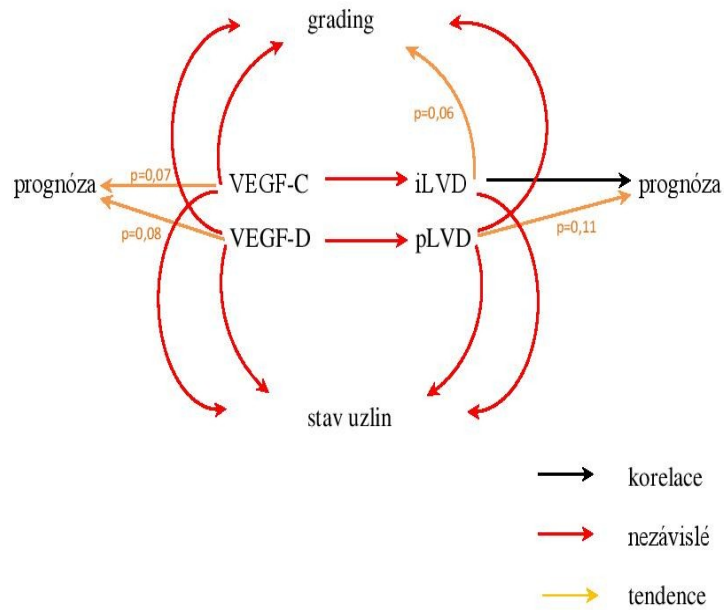
Srovnání s normální žlázou

VEGF-C, nikoli však VEGF-D histoskóre bylo signifikantně vyšší u SACC než v acinárních buňkách normální žlázy ($p=0.003$). Hodnoty iLVD a pLVD v nádorech byly signifikantně vyšší než LVD v normální žláze ($p=0.0009$, resp. $p=0.0008$).

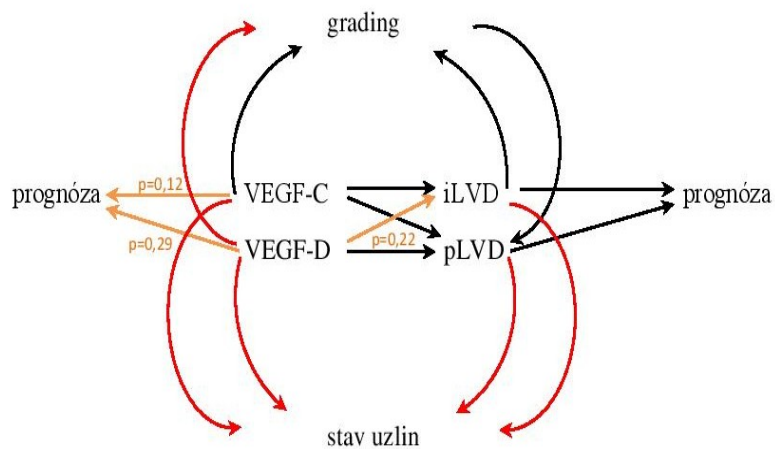
Srovnání s klinickopatologickými parametry SACC

Žádné z obou histoskóre, hustota intra- ani peritumorózní lymfatické sítě nekorelovala se stupněm diferenciacie nádoru, či se stavem lymfatických uzlin (Spearman, vždy $p>0,05$) – graf 6.

Graf 5.: Vztah mezi expresí VEGF-C, VEGF-D, hustotou intra- a peritumorózní lymfatické sítě, gradingem a prognózou u karcinomů slinných žláz.



Graf 6.: Vztah mezi expresí VEGF-C, VEGF-D, hustotou intra- a peritumorózní lymfatické sítě, gradingem a prognózou u SACC.



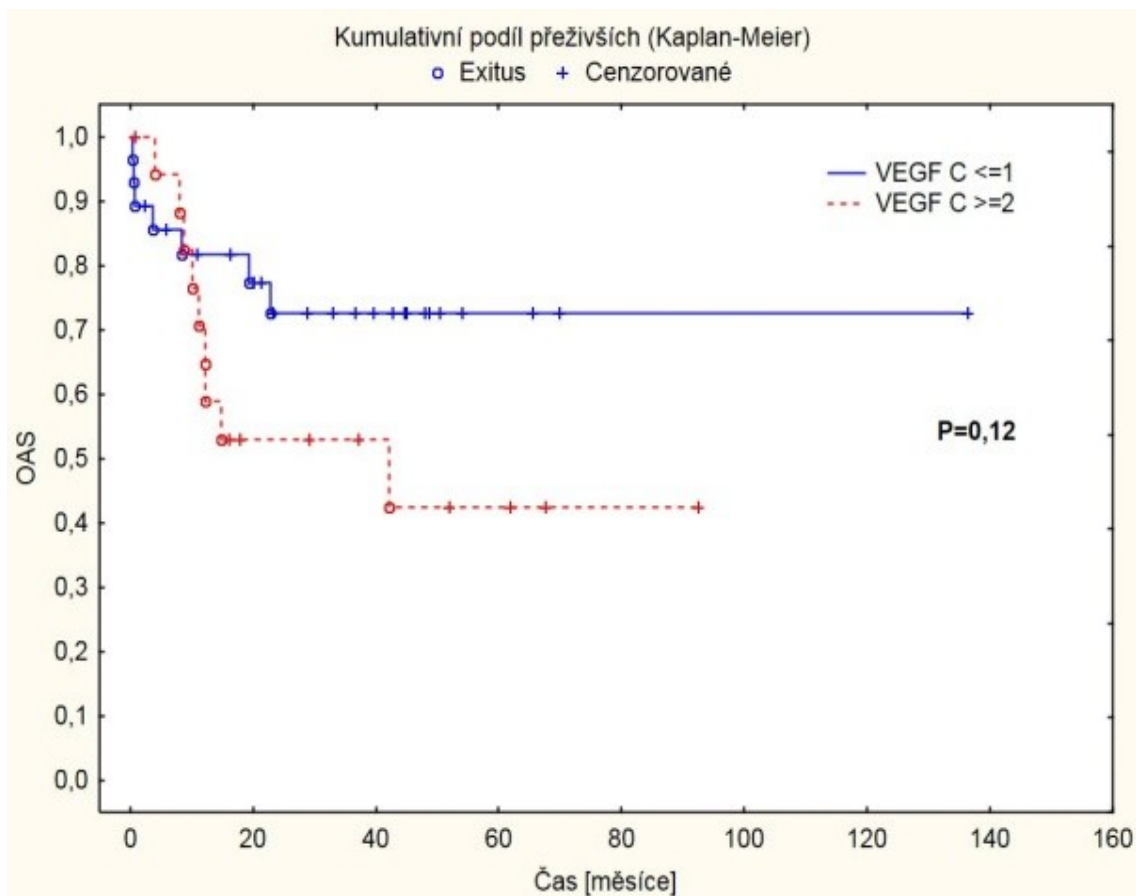
Vztah mezi VEGF-C, VEGF-D a hustotou obou lymfatických sítí

VEGF-C ani VEGF-D histoskóre nekorelovalo s pLVD ani s iLVD (Spearman, $p > 0.05$).

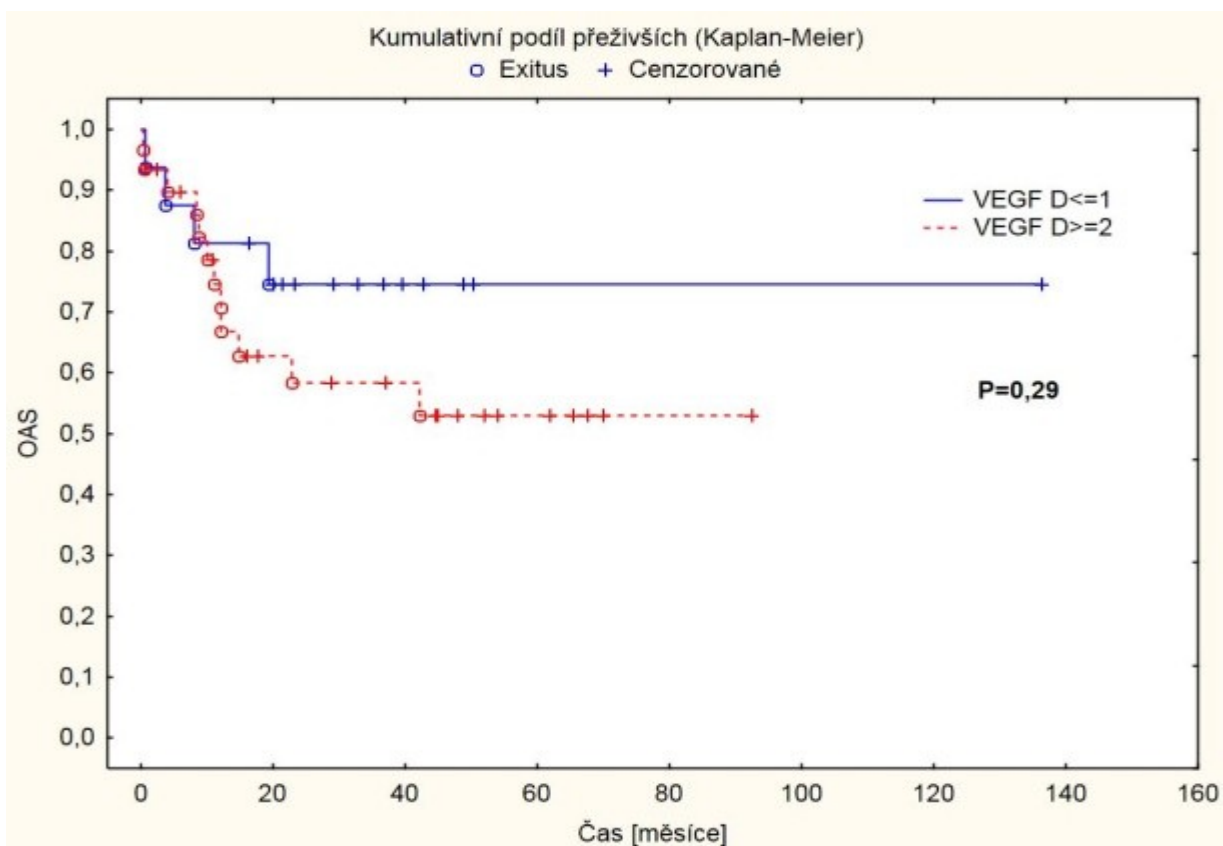
Prognostická hodnota exprese VEGF-C, VEGF-D, iLVD a pLVD

Kaplan-Maierova analýza přežití neprokázala spojitost mezi histoskóre VEGF-C, VEGF-D a pLVD ani přežitím ($p = 0.11$). Vysoké hodnoty iLVD (> 9) byly signifikantně (log rank test, $p = 0.0002$) spojeny se špatnou prognózou. Oproti tomu u vyšších hodnot pLVD byla prokázána jen tendence k horšímu přežití.

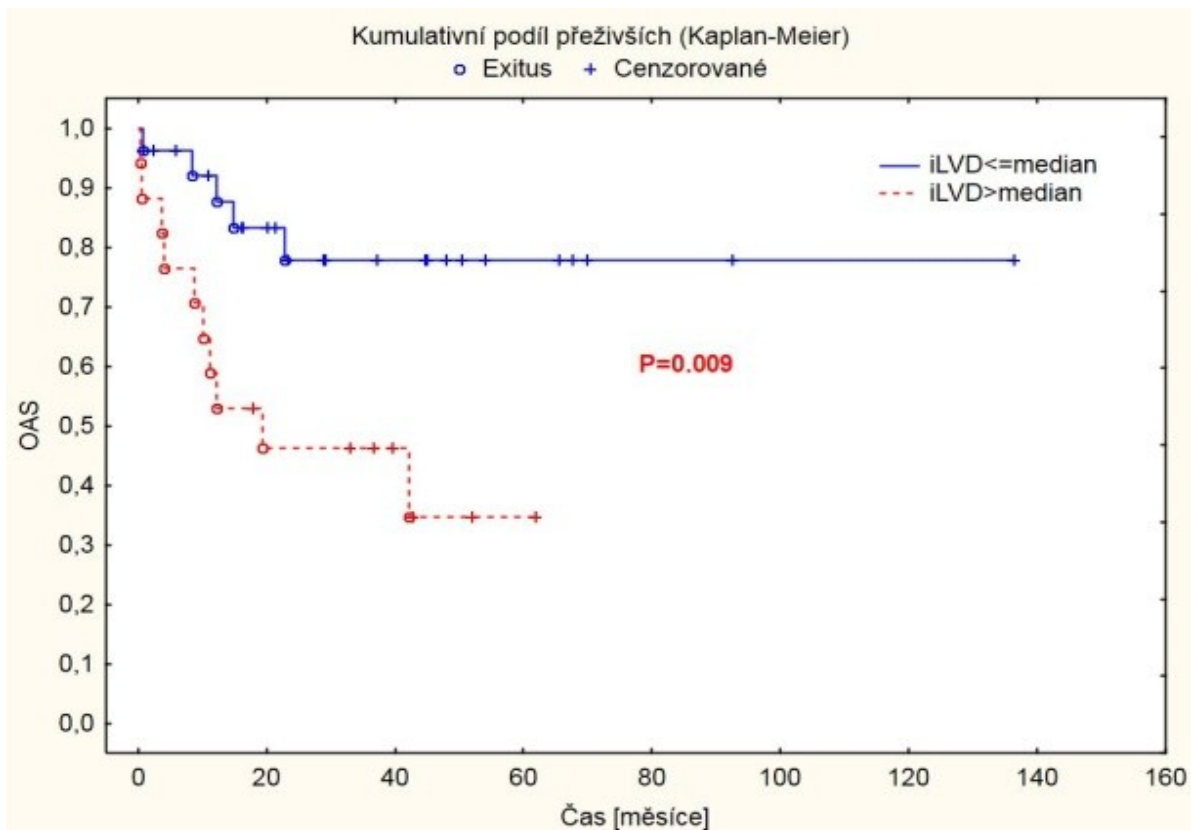
Graf č.1: Celkové přežití pacientů s karcinomy slinných žláz v závislosti na expresi VEGF-C



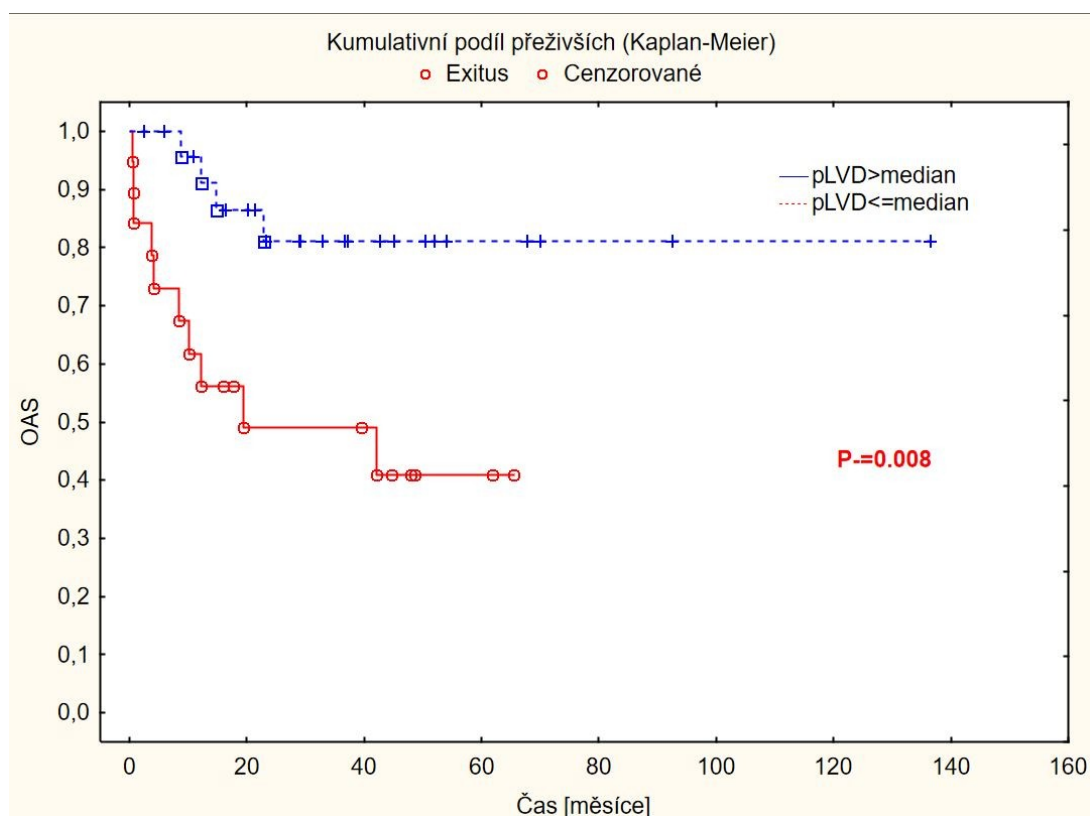
Graf č. 2: Celkové přežití pacientů s karcinomy slinných žláz v závislosti na expresi VEGF-D



Graf č. 3: Celkové přežití pacientů s karcinomy slinných žláz v závislosti na iLVD



Graf č 4.: Celkové přežití pacientů s karcinomy slinných žláz v závislosti na pLVD



C: skupina Warthinových tumorů (WT) a onkocytárních adenomů (OCA)

Hustota lymfatických cév u WT a OCA

U těchto nádorů byly jako peritumorózní lymfatické cévy považovány cévy, nacházející se v jejich pouzdru. Důvodem je skutečnost, že u většiny Warthinových tumorů byla provedena jejich prostá enukleace, a tedy naléhající slinná tkáň nebyla součástí chirurgického specimenu.

U Warthinových tumorů byly lymfatické kapiláry přítomny jak v kapsule, tak i v lymfoidním stromatu (obr. 5 a 6). Kromě toho, D2-40 pozitivní reakce byla zjištěna v bazálních epiteliálních buňkách a ve folikulárních dendritických buňkách reaktivních germinálních centrech těchto nádorů. Obdobná distribuce lymfatických cév byla viděna v onkocytomech, zřídka vyskytující se myoepiteliální buňky vykazovaly pozitivitu D2-40 (obr. 7).

Průměrná hodnota (mean) iLVD a pLVD u Warthinových tumorů činila 4.7 (rozmezí 1-8), resp. 6.9 (rozmezí 3-10), u onkocytárních adenomů 1.0 (rozmezí 0-3), resp. 5.8 (rozmezí 2-8).

Rozdíly v hodnotách iLVD, nikoliv však pLVD mezi oběma těmito skupinami tumorů byly velmi statisticky velmi významné, viz tabulka č. 6. U obou tumorů pak hustota intratumorálních lymfatických cév (iLVD) byla signifikantně nižší nežli hustota těchto cév v jejich pouzdru (pLVD) – viz tab. č. 8.

Tabulka č. 8. Hodnoty iLVD a pLVD u Warthinových tumorů a onkocytomů

	WT průměr (SD)	OCA průměr (SD)	p
iLVD	4.7 (±2.1)	1.0 (±1.3)	0.000004
pLVD	6.9 (±2.2)	5.8 (±1.5)	0.10
p	0.002	0.001	

Expresí VEGF-C a VEGF-D u WT a OCA

VEGF-C imunopozitivita byla přítomna u 13 ze 23 (tj. 56,6 %) Warthinových tumorů (obr. 8). Reakce byla nalezena v jádrech stromálních lymfocytů, makrofágů a nádorových onkocytů.

V posledně uvedených buňkách byla přítomna rovněž fokálně v cytoplazmě. (fig. 4). Stejně buněčné elementy jevíly jadernou pozitivitu VEGF-D v 17 případech (tj. 73,9 %) (obr. 9). Deset tumorů (43,4 %) vykazovalo současně obě imunoreakce.

Ve skupině OCAs VEGF-C imunoreakce kompletně chyběla. V 10 ze 13 tumorů (77 %) jsme prokázali střední jadernou VEGF-D reaktivitu neoplastických onkocytů, v některých případech tyto buňky jevíly i velmi slabou fokální pozitivitu cytoplazmatickou (obr. 10).

5. Diskuze

První práce, zabývající se lymfangiogeneze u karcinomů slinných žláz, zkoumaly VEGF (A), který v tomto procesu kooperuje s VEGF-C (41). Doi (13) zjistil vyšší expresi prvně uvedeného cytokinu u metastázujících nádorů, Lim (46) pozoroval její jednoznačnou korelaci s uzlinovým postižením, klinickým stádiem, perineurální a vaskulární invazí, lokoregionálními recidivami a přežitím. Významnou souvislost VEGF(A) s uzlinovými metastázami a klinickými parametry nádoru udává Lequeurica-Fernandez (23). Oproti tomu jiné studie (8, 10, 22) prokázaly, že exprese tohoto faktoru sice odlišuje salivární adenomy od karcinomů, nepredikuje však výskyt metastáz.

VEGF-C asociované lymfangiogeneze u salivárních karcinomů se věnovalo dosud jen málo autorů. Mello (50) v tomto smyslu prozkoumal široké spektrum 75 těchto nádorů, rozdělených do skupiny s nízkým a vysokým rizikem vzniku uzlinových metastáz. Hustota peri- ani intratumorózní sítě neměla vztah k tomuto faktoru. Mezi oběma sledovanými skupinami nebyly nalezeny signifikantní rozdíly v jeho expresi a denzitě lymfatických sítí. Autor proto došel k závěru, že salivární karcinomy s nízkým i vysokým rizikem vzniku uzlinových metastáz jsou stejně lymfangiogenní, posledně uvedené však mají vyšší schopnost invaze do lymfatických cév.

Oproti výše uvedené práci Mellové (50) jsme prokázali u skupiny karcinomů (I) jednoznačnou asociaci mezi VEGF-C a denzitou obou lymfatických sítí. Histoskóre VEGF-D korelovalo jen s hustotou cév peritumorózních, nádory s vyšším histoskóre tohoto cytokinu však jeví tendenci k větší denzitě cév v jejich nitru. Naše nálezy tak podporují hypotézu, že salivární karcinomy produkují VEGF-C i VEGF-D, jež stimulují tvorbu lymfatických sítí na jejich periferii i v centru. Potvrzují současně i rozhodující roli VEGF-C v lymfangiogeneze karcinomů slinných žláz, známou z tumorů jiných lokalit (36). Je dána skutečností, že zatímco oba faktory jsou kvalitativními modulátory lymfatických cév, jako stimulant jejich proliferace se uplatňuje jen VEGF-C (50). Na jeho klíčovou roli v tomto procesu poukazuje i silná vazba mezi jeho expresí a stupněm diferenciací karcinomů. Tu jsme však neprokázali u adenoidně cystického karcinomu. Vysvětlením může být skutečnost, že jeho histopatologický grading nemá jednoznačnou prognostickou reflexi (40).

U adenoidně cystického karcinomu jsme nezjistili žádnou korelaci mezi expresí obou studovaných lymfangiogenních faktorů a hustotou lymfatických cév. Podobně vyznívají výsledky

některých studií, týkajících se dlaždicobuněčných karcinomů hlavy a krku (5, 6). Vysvětlením může být chybění proteolytické aktivace obou cytokinů u těchto nádorů, která je nutná k jejich efektivní vazbě na specifický receptor VEGFR-3, nacházející se na endoteliích lymfatických cév. Lze uvažovat i tom, že VEGF-C a D nejsou u ACC (podobně jako u nádorů jiných lokalit) jediným lymfangiogenezu stimulujícím činitelem (32, 56, 57).

U některých extrasalivárních karcinomů byla potvrzena korelace mezi expresí VEGF-C, VEGF-D a délkou přežití (50). Takovýto statisticky významný vztah jsme v naší sestavě adenoidně cystických (soubor II) a ostatních (soubor I) karcinomů nezjistili. Avšak u pacientů v obou těchto souborech, vykazujících vyšší hodnoty VEGF-C a VEGF-D, byla patrna tendence ke kratšímu přežití.

Prokázali jsme silnou korelaci mezi přežitím a hustotou intra- i peritumorálních lymfatických cév. Výjimkou však byl karcinom adenoidně cystický, kde prognostickou signifikanci jevila jen iLVD. Zatímco role peritumorální sítě pro lymfangiogení šíření buněk nádorů a následně pro jejich klinický průběh je všeobecně akceptována (34), existence ani prognostický význam vnitřních lymfatických cév dlaždicobuněčných karcinomů hlavy a krku nebyly zatím jednoznačně potvrzeny (5, 19, 26, 51,58, 60). Výsledky naší práce nasvědčují tomu, že intratumorální lymfatika u salivárních karcinomů, včetně karcinomu adenoidně cystického představují důležité diseminační kanály. Tento názor podporuje i práce Soaresové (70), která vyšetřila lymfatickou síť ana partes 20 minimálně a široce invazivních karcinomů z pleomorfního adenomu. V prvně uvedené skupině počet peritumorálních cév značně převyšoval cévy intratumorální. U široce invazivních nádorů zjistila významně elevovanou hustotu sítě posledně uvedených kapilár. Autorka proto došla k závěru, intratumorální lymfatika hrají důležitou roli, zvyšující metastatický potenciál tohoto nádoru.

Adenoidně cystický karcinom je znám svou tendencí k hematogennímu šíření. Poměrně četné studie se proto u tohoto tumoru zabývaly expresí VEGF(A), který je obecně klíčovým faktorem novotvorby normálních i nádorových krevních cév. Tyto práce prokázaly významné spojení exprese uvedeného cytokinu s prognózou, vaskulární invazí, výskytem hematogenních metastáz, přežitím (61, 62), nikoli však s výskytem uzlinových metastáz (22). Oproti tomu VEGF-C a VEGF-D byly dosud u adenoidně cystického karcinomu zkoumány v dosud jediné práci (12), prokazující při jejich nepatrné expresi přítomnost nečetných, výlučně peritumorálních lymfatických cév. Autor se tak domníval, že lymfangiogeneze není tímto nádorem stimulována. To je v kontrastu s naší studií, prokazující jak tvorbu obou uvedených faktorů, tak i hojnou peri i intratumorální

lymfatickou síť.

Velmi málo je dosud známo o lymfangiogeneze u benigních sialomů. Nepatrné množství intratumorálních lymfatických cév v pleomorfním adenomu potvrdila jiná studie (42). Soaresová, A.B. (70) porovnála expresi VEGF(A) s hustotou lymfatických cév u pleomorfního a bazocelulárního adenomu. Expresie tohoto proteinu se silně lišila ve prospěch posledně uvedené léze. Oba nádory vykazovaly podobnou, relativně vysokou hustotu lymfatických cév peritumorálních, intratumorální denzita byla u pleomorfních adenomů výrazně nižší. Tento rozdíl je vysvětlitelný odlišnou hojností a charakterem stromatu pleomorfního adenomu, který svým tlakem utlačuje a brání proliferaci lymfatických cév, nacházejících se v jeho nitru (42).

Uvnitř Warthinových tumorů jsme na rozdíl od onkocytomů detekovali četné lymfatické kapiláry. Korespondující výsledky byly potvrzeny dříve publikovanou studií (52). Takovouto hustotu intratumorálních lymfatických cév nacházíme u karcinomů. Vysvětlením je skutečnost, že WT je v současnosti považován nikoliv za pravé neoplazma, ale za pseudotumor, indukující lokální imunologickou odpověď (15, 53). Její relevantní buňky, nacházející se ve stromatu této histopatologické entity pak – podobně jako je tomu u běžných zánětlivých stavů - stimulují VEGF asociovanou tvorbu lymfatických, jakož i krevních cév (10, 33). Naše studie prokázala prakticky nulovou expresi VEGF-C a VEGF-D u onkocytárního adenomu a Warthinova tumoru, který vykazoval vysoké počty intra- i peritumorálních lymfatických kapilár. Její výsledky jsou zcela v soulase s výše uvedenými, dosud publikovanými pracemi. Můžeme se tedy oprávněně domnívat, že benigní sialomy (s výjimkou biologicky specifického Warthinova tumoru) jsou spojeny s minimální nebo žádnou lymfangiogenezou, což potvrdily i námi prokázané významné rozdíly v hustotě lymfatických cév mezi pleomorfním adenomem a adenoidně cystickým karcinomem (64).

Neprokázali jsme očekávanou souvislost mezi přítomností uzlinových metastáz a žádným ze sledovaných parametrů lymfangiogenezy. Důvodem je zřejmě skutečnost, že invaze karcinomů do mízních cév a uzlin je spletitým dějem, na němž se vedle tvorby lymfatických kapilár podílí interakce mezi jejich endoteliemi a neoplastickými buňkami. Molekulární mechanismy těchto dějů však dosud nejsou přesně známy (34, 50).

6. Závěr

V karcinomech slinných žláz jsme prokázali VEGF-C a VEGF-D asociovanou tvorbu intra- i peritumorálních lymfatických cév. Jejich hustota má prognostický význam, avšak stejně jako exprese žádného z obou uvedených faktorů není prediktorem uzlinových metastáz. Tyto nálezy ukazují, že cílená blokáda receptorů endotelií novotvořených lymfatických cév je potenciální cestou ke zlepšení prognózy závažně probíhajících salivárních karcinomů vysokého biologického rizika.

7. Literatura:

1. **Argiris, A., Ghebremichael, M., Burtness B. et al.:** A phase 2 trial of bortezomib followed by the addition of doxorubicin at progression in patients with recurrent or metastatic adenoid cystic carcinoma of the head and neck: a trial of the Eastern Cooperative Oncology Group (E1303). *Cancer*, 117, 2011, 3374-3382.
2. **Armstrong, J. G., Harrison, L. B., Thaler, H. T., Friedlander – Klar, H., Fass D. E., Zelefsky M. J., Shah J. P., Strong E. W., Spiro, R. H.:** The indications for elective treatment of the neck in cancer of the major salivary glands. *Cancer*, 69, 1992, s. 615-619.
3. **Armstrong, J. G.:** Malignant tumors of major salivary gland origin. A matched-paired surgery and postoperative radiotherapy. *Arch. Otolaryng. Head Neck Surg.*, 1990, 116, s. 290-293.
4. **Audet, N, Beasley, N. J., MacMillan, C., Jackson, D. G., Gullane, P. J., Kamel-Reid, S.:** Lymphatic vessel density, nodal metastasis, and prognosis in patients with head and neck cancer. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 131, 2005, s. 1065-1070.
5. **Barnes, L., Eveson, J. W., Reichart, P., et al.:** (eds): WHO classification of tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. IARC Press, Lyon, 2005.
6. **Bhattacharya, N., Fried, M.P.:** Determinants of survival in parotid gland carcinoma: a population-based study. *Am. J. Otolaryngol.* 26, 2005, 1, s. 39-44.
7. **Beasley, N. J., Prevo, R., Banerji, S., Leek, R. D., Leek, R. D., Moore, J., van Trappen, P., Cox, G., Harris, A. L., Jackson, D. G.:** Intratumoral lymphangiogenesis and lymph node metastasis in head and neck cancer. *Cancer Res.*, 62, 2002, s. 1315-1320.
8. **Borthne A.** Salivary gland malignant neoplasms: treatment and prognosis. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Physiol.*, 12, 1986, s. 747-751.
9. **Burian, M., Quint, C., Neuchrist, C.:** Angiogenic factors in laryngeal carcinomas: do they have prognostic relevance? *Acta Otolaryngol.*, 119, 1999, s. 289-292.
10. **Cao Y.:** Opinion: Emerging mechanism of tumour lymphangiogenesis and lymphatic metastasis. *Nat. Rev. Cancer*, 5, 2005 s. 735-743.
11. **Califano, L., Zupi, A., Massari, P. S. et al.:** Indication for neck dissection in carcinoma of the parotid gland. Our experience on 39 cases. *Int. Surg.*, 78, 1993, s. 347-349.
12. **De Ru, J. A., van Leeuwen, M, S., van Benthem, P. P., et al.:** Do magnetic resonance imaging and ultrasound add anything to the preoperative workup of parotid gland tumors? *J. Oral Maxillofac. Surg.*, 65, 2007, 5, s. 945-952.

13. **El-Naggar, A. K., Huvos, A. G.** Adenoid cystic carcinoma. WHO classification of tumours: pathology & genetics. In: Barnes, E. L., Eveson, J. W., Reichart, P., Sidransky, D.: Head and neck tumours. Lyon, IARC Press, 2005, s. 221-222.
14. **Ferlito, A., Pellitteri, P. K., Robbins, K. T., et al.:** Management of the neck in cancer of the major salivary glands, thyroid and parathyroid. *Acta Otolaryngol.*, 122, 2002, s. 673-678.
15. **Frankenthaler, R. A., Byers, R. M., Luna, M. A., et al.:** Predicting occult lymph node metastasis in parotid gland cancer. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 119, 1993, s. 517-520.
16. **Frankenthaler, R. A.:** Prognostic variables in parotid gland cancer. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 117, 1997, s. 1251-1256.
17. **Fujita, G., Sato S., Kishino, M., Iwai, S., Nakazawa, M., Toyosawa, S., Yura, Y., Ogawa, Y.:** Lymphatic vessels and related factors in adenoid cystic carcinoma of the salivary gland. *Mod. Pathol.*, 24, 2011, 7, s. 885-891.
18. **Gerwins, P., Sköldenberg, E., Claesson-Welsh, L.:** Function of fibroblast growth factor and vascular endothelial factors and their receptors in angiogenesis. *Hepatology*, 34, 2000, s. 185-194.
19. **Heinrich M, Joensuu H, Demetri G, et al.:** Phase II, Open-label study evaluating the activity of Imatinib in treating life-threatening malignancies known to be associated with Imatinib-sensitive tyrosine kinases. *Clin. Cancer* 2008,14, s. 2717-2725.
20. **He Y, Zhang ZY, Tian Z.:** The diagnostic value of fine-needle aspiration cytology (FNAC) for lesions in the parotid gland. *Shanghai Kou Quiang Yi Xue*, 12, 2003, 6, s. 410-413.
21. **Hee, C.G., Perry, C.F.:** Fine needle aspiration cytology of parotid tumours: is it useful? *ANZ J. Surg.*, 71, 2001, 6, 345-348.
22. **Hosni, A., S. H. Huang, D. Goldstein, et al.:** ngash (2016). Outcomes and prognostic factors for major salivary gland carcinoma following postoperative radiotherapy." *Oral Oncol.*, 54, 2016, s. 75-80.
23. **Hotte, S. J., Winquist, E. W., Lamont, E., MacKenzie, M., Vokes, E., Chen, E. X., Brown, S., Pond, G. R., Murgo, A., Siu, L. L.:** Imatinib mesylate in patients with adenoid cystic cancers of the salivary glands expressing c-kit: a Princess Margaret Hospital phase II consortium study. *J. Clin. Oncol.* 2005, 23, s. 585-590.
24. **Hu. W.- G, Li, J.-W., Feng, B., Beveridge, M., Yue, F., Lu, A.-G, Ma, J.-J., Wang, M.-L., Guo, Y., Jin, X.-L., Zheng, M.-H.:** Vascular endothelial growth factors C and D represent novel prognostic markers in colorectal carcinoma using quantitative image analysis. *Eur. Surg. Res.*, 39, 2007, s.229-238.

25. **Chau, N. E. X., Chen, E., Hotte, J., et al.:** A phase II study of sunitinib in recurrent and/or metastatic adenoid cystic carcinoma (ACC) of the salivary glands: current progress and challenges in evaluating molecularly targeted agents in ACC. *Ann. Oncol.*, 23, 2012, s.1562-1570.
26. **Chaudhuri, R., Bingham, J. B., Crossman, J. E, et al.:** Magnetic resonance imaging of the parotid gland using the STIR sequence. *Clin. Otolaryngol. Allied Sci.*, 17, 1992, 3, s. 211-217.
27. **Chen, A.M., Granchi, P.J., Garcia, J. et al.:** Local-regional recurrence after surgery without post-operative irradiation for carcinomas of the major salivary glands: Implications for adjuvant therapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 67, 2007, s. 982-987.
28. **Chen, A. M., Garcia, J., Lee, N. Y., Bucci, M. K., Eisele, D. W.:** Pattern of nodal relapse after surgery and postoperative radiation therapy for carcinomas of the major and minor salivary gland: what is the role of elective neck irradiation? *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 67, 2007, s. 988-994.
29. **Choi, W. W., Lewis, M. M., Lawson, D., Yi-Goen, Q., Birdsong, G. G., Cotsonins, G. A., Cohen, C., Young, A.:** Angiogenic and lymphangiogenic microvessel density in breast carcinoma: correlation with clinicopathologic parameters and VEGF-family gene expression. *Mod. Pathol.*, 18, 2005, s. 143-152.
30. **Chris H. J. Terhaard MD, PhD** Salivary gland carcinoma: independent prognostic factors for locoregional control, distant metastases, and overall survival: results of the Dutch head and neck oncology cooperative group
31. **Inoue, K., Ozeki, Y., Sugunuma, T., Sugiura, Y., Tanaka, S.:** Vascular endothelial growth factor expression in primary esophageal squamous carcinoma. Association with angiogenesis and tumor progression. *Cancer*, 79, 1997, s. 206-213.
32. **Izzo, L., Casullo, A., Caputo, M. et al.:** Space occupying lesions of parotid gland. Comparative diagnostic imaging and pathological analysis of echo color/power Doppler and of magnetic resonance imaging. *Acta Otorhinolaryngol. Ital.*, 26, 2006, 3, s. 147-153.
33. **Jackson, G. L., Luna, M. A., Byers, R. M.:** Results of surgery alone and surgery combined with pooperative radiotherapy in the treatment of cancer of the parotid gland. *Amer. J. Surg.*, 146, 1983, s. 497-500.
34. **Kawata, R., Koutetsu, L., Yoshimura, K., Nishikawa, S., Takenaka, H.:** Indication for elective neck dissection for N0 carcinoma of the parotid gland: a single institution's 20-year experience. *Acta Oto-Laryngol.*, 130, 2010, s. 286-292.
35. **Kawata, R., Koutetsu, L., Yoshimura, K. et al.:** Indication for elective neck dissection for N0 carcinoma of the parotid gland: a single institution's 20-year experience. *Acta Oto-Laryngol.*, 130, 2010, s. 286-292
36. **Kelley, D., Spiro, R. H.** Management of the neck in parotid carcinoma. *Amer. J. Surg.*, 172, 1996, s. 695-697.
37. **Kinoshita, T., Ishii, K., Naganuma, H. et al.:** MR imaging findings of parotid tumors with pathologic diagnostic clues: a pictorial essey. *Clin. Imaging*, 28, 2004, 2, s. 96-101.

- 38. Kiyoshi T.:** Management of the facial nerve in parotid tumor surgery. In: Castro D. Proceedings of the sixth international symposium on the facial nerve. Rio De Janeiro, Brasil, 2-5 Oct., 1988.
- 39. Kitadai, Y., Amioka, T., Haruma, K., Tanaka, S., Yoshihara, M., Sumii, K., Matsutani, N., Yasui, W., Chayama, K.:** Clinicopathological significance of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C in human esophageal squamous cell carcinomas. *Int. J. Cancer*, 93, 2001, s. 662-666.
- 40. Klener, P.:** Nové možnosti využití bevacizumabu v protinádorové léčbě. *Remedia*, 18, 2008, s. 70–75.
- 41. Klussmann, J. P., Ponert, T., Mueller, R. P. et al.:** Patterns of lymph node spread and its influence on outcome in resectable parotid cancer. *EJSO*, 34, 208, s. 939-937.
- 42. Kraft, M, Lang, F., Mihaescu, A. et al.:** Evaluation of clinician-operated sonography and fine-needle aspiration in the assessment of salivary gland tumours. *Clin. Otolaryngol.* 33, 2008, 1, s. 18-24.
- 43. Kyzas, P. A., Geleff, S., Batistatou, A., Agnantis, N. J.:** Evidence for lymphangiogenesis and its prognostic implications in head and neck squamous cell carcinoma. *J. Pathol.*, 206, 2005, s.170-177.
- 44. Laurie, S.A., Licitra, L.:** Systemic therapy in the palliative management of advanced salivary gland cancers. *J. Clin. Oncol.*, 24, 2006, s. 2673-2678.
- 45. Li, J., Nong, X., Chen, Q., Yang, Y., Li, J., Li, Y.:** Nerve growth factor and vascular endothelial growth factor: retrospective analysis of 63 patients with salivary adenoid cystic carcinoma. *Int. J. Oral Sci.*, 2, 2010, s. 35-44.
- 46. Lim, J. J., Kang, S., Lee, M. R., Pai, H. K., Yoon H. J., Lee, J. I., Hong, S. P., Lim, Ch. B.:** Expression of vascular endothelial growth factor in salivary gland carcinomas and its relation to p53, K-67 and prognosis. *J. Oral Pathol. Med.*, 32, 2003, s. 552-561.
- 47. Lim, Y.C., Lee, S.Y., Kim, K. et al.:** Conservative parotidectomy for the treatment of parotid cancers. *Oral Oncol* 2005, 41: 1021-1027.
- 48. Matilla, M. M. T., Ruohola, J. K., Karpanen, T., Jackson, D. G., Alitalo, K., Härkönen, P.:** VEGF-C induced lymphangiogenesis is associated with lymph node metastasis in orthotopic MCF-7 tumors. *Int. J. Cancer* 98, 2002, s. 946-951.
- 49. Medina, J. E.:** Neck dissection in the treatment of cancer of major salivary glands. *Otolaryngol. Clin. North Amer.*, 31, 1998, s. 815-921.
- 50. Mello MF, Costa AF, Freitas LL, Soares AB, Araujo VC, Tincani AJ, Martins AS, Alemani A.:** Lymphatic vessel density and expressions of lymphangiogenic growth factors in salivary carcinomas. *Neoplasma*, 58, 2011, s. 331-336.

51. **Mineta, H., Miura, K., Ogino, T., Takebayashi, S., Misawa, K., Ueda, Y., Suzuki, I., Dictor, M., Borg, A., Wennerberg, J.:** Prognostic value of vascular endothelial growth factor (VEGF) in head and neck squamous cell carcinomas. *Br. J. Cancer*, 83, 2000, s. 775-781.

52. **Nathanson, S. D.:** Insights into the mechanism of lymph node metastasis. *Cancer*, 98, 2003, s. 413-423.

53. NCCN clinical practise guidelines in oncology. Head and neck cancers. Salivary gland tumors. www.nccn.org

54. **North, C.A.:** Carcinoma of the major salivary glands treated by surgery or surgery plus postoperative radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Physiol* 1990, 18: 1319-1326.

55. **O-charoenrat, P., Rhys-Evans, P., Eccles, S. A.:** Expression of vascular endothelial growth factor family members in head and neck squamous cell carcinoma correlates with lymph node metastasis. *Cancer*, 92, 2001, s. 556-568.

56. **Pepper, M. S., Tille, J. C., Nisato, R., Skobe, M.:** Lymphangiogenesis and tumor metastasis. *Cell Tissue Res.*, 314, 2003, s. 167-177.

57. **Pohar, S., Gay, H., Rosenbaum, P. et al.:** Malignant parotid tumours: presentation, clinical/pathological prognostic factors and treatment outcomes. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2005, 61, s. 112-118.

58. **Que Hee, C.G., Perry, C.F.:** Fine needle aspiration cytology of parotid tumours: is it useful? *ANZ J. Surg.*, 71, 2001, 6, 345-348.

59. **Renehan A, Gleave E, Slevin NJ et al.** Clinico-pathological and treatment-related factors influencing survival in parotid cancer. *Br. J. Cancer*, 1999, 80, s. 1296-1300.

60. **Rizk, S., Vandenjooff, A., Aoiroldi, M. et al.:** Activity of chemotherapy in the palliative treatment of salivary gland tumors. Review of the literature. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngol.* 264,2007,6,s.587-594.

61. **Rodriguez-Cuevas, S., Labastida, L., Baena,I., et al.:** Risk of nodal metastases from malignant salivary gland tumors related to tumor size and grade of malignancy. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*, 252, 1992, s. 139-142.

62. **Santos, I. R, Kowalski, L. P., Araujo, V. C. et al.:** Multivariate analysis of risk factors for neck metastases in surgically treated parotid carcinomas. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 127, 2001, s. 56-60.

63. **Salven, P., Lymboussaki, A., Heikkila, P., Jääskela-Saari, H., Enholm, B., Aase, K., Euler, G., Eriksson, U., Alitalo, K., Joensuu, H.:** Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C are expressed in human tumors. *Amer. J. Pathol.*, 153, 1998, s. 103-108.

64. **Salzman R., Stárek I., Kučerová L., Skálová A.** Differing Lymphatic Vessels Density in Salivary Adenoid Cystic Carcinoma and Pleomorphic Adenoma. *Pathol Oncol Res, Pathol Oncol Res.* 2017,23,(3)545.550.
65. **Seethala, R. R., Hunt, J. L., Baloch, Z. W., LiVolsi, V. A., Barnes, E. L.:** Adenoid cystic carcinoma with high-grade transformation. A report of 11 cases and a review of the literature. *Amer. J. Surg. Pathol.*, 2007, 31, s. 1686-1694.
66. **Speight, P. M., Barrett, A.W.:** Salivary gland tumors. *Oral Diseases*, 8, 2002, s. 229-240.
67. **Schwentner, I., Obrist, P., Thumfart, W. et al.:** Distant metastasis of parotid gland tumors. *Acta Otolaryngol.*, 126, 2006, 4, s. 340-345.
68. **Stennert, E., Kisner, D., Jungehelsing, M. et al.:** High incidence of lymph node metastasis in major salivary gland cancer. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 129, 203, s. 720-723.
69. **Skobe, M., Hawighorst, T., Jackson, D. G., Prevo, R., Janes, L., Velasco, P., Riccardi, L., Alitalo, K., Claffey, K., Detmar, M.:** Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. *Nature Med.*, 2, 2001, s. 192-198.
70. **Soares, A. B., Juliano, P. B., Araújo, V. C., Altemani, A.:** Lymphatic vascular density and lymphangiogenesis during tumor progression of carcinoma ex pleomorphic adenoma. *J. Clin. Pathol.*, 60, 2007, s. 995-1000.
71. **Stacker, S. A., Caesar, C., Baldwin, M. E., Thornton, G. E., Williams, R. A., Prevo, R., Jackson D. G., Nishikawa, S. I., Kubo, H., Achen M. G.:** VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat. Med.*, 2001, 7, s. 186-191.
72. **Stacker, S. A., Achen, M. G., Jussila, L., Baldwin, M. E., Alitalo, K.:** Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nat. Rev. Cancer*, 2, 2002, s. 573-583.
73. **Stárek, I., Kučerová, L., Skálová, A., Brož, M., Bakaj, M., Langová, K.:** Imunohistochemická exprese C-kit onkoproteinu u karcinomů slinných žláz. *Otorinolaryng. Foniatr. /Prague/*, 59, 2010, s. 129-135.
74. **Stárek I., Salzman R., Skálová A., Chovanec M., Gál B., Zábrodský M., Školoudík L., Rotnágel J. Pár I., Štrympl P. ,** Doporučené postupy v diagnostice a léčbě nádorů příušní žlázy, *Otorinolaryngologie a Foniatrie*, 2017
75. **Tang, Q. L., Chen, W. L., Tan, X. Y., Li, H. G., Yuan, X. P., Fan, S., Wen, B., Song, Y.:** Expression and significance of Cyr61 in distant cells of human primary salivary adenoid cystic carcinoma. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, 2011, 112, s. 228-236.
76. **Terhaard, C.H.J., Lubsen, H., Rasch, C.R.N. et al.:** The role of radiotherapy in the treatment of malignant salivary gland tumours. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 61, 2005, s. 103-111.

77. **Teymoortash, A., Werner, J. A.:** Value of neck dissection in patients with cancer of the parotid gland and a clinical N0 neck. *Onkologie*, 25, 2002, s. 122-126.
78. **Teymoortash, A., Werner, J. A.:** Value of neck dissection in patients with cancer of the parotid gland and a clinical N0 neck. *Onkologie*, 25, 2002, s. 122-126.
79. **Teymoortash, A., Schrader, C., Shimoda, H., Kato, S., Werner, J. A.:** Evidence of lymphangiogenesis in Warthin's tumor of the parotid gland. *Oral. Oncol.*, 43, 2007, s. 614-618.
80. **Tsurusaki, T., Kanda, S., Sakai, H., Saito, Y., Alitalo, K., Koji, T.:** Vascular endothelial growth factor-C expression in human prostatic carcinoma and its relationship to lymph node metastasis. *Br. J. Cancer*, 80, 1999, s. 309-313.
81. **Umeda, M., Komatsubara, H., Nishimatsu, N., Oku, N., Shibuya, Y., Yokoo, S., Komori, T.:** Establishment and characterization of a human adenoid cystic carcinoma line of the salivary gland which is serially transplantable and spontaneously metastasises to the lung in nude mice. *Oral. Oncol.*, 38, 2002, s. 30-34.
82. **Witte, L., Hicklin, D. J., Zhu, Z., Pytowski, B., Kotanides, H., Rockwell P., Bohlen, P.:** Monoclonal antibodies targeting the VEGF receptor-2 (Flk-1/KDR) as an anti-angiogenic therapeutic strategy. *Cancer Metastasis Rev.* 17, 1998, s. 155-161.
83. **Woolger, J. A., Triantafyllou, A.:** Contemporary salivary clinical pathology. Facts and dilemmas. In: *Salivary gland disorders and diseases: Diagnosis and management*. Chpt. 4, s. 27-41. Eds. Bradley PJ, Guntinas-Lichius O. Thieme 2011, Stuttgart, ISBN 978-3-13-146491-0
84. **Xu, W., Liu, L. Z., Loizidou, M., Ahmed, M., Charles, I. G.:** The role of nitrid oxid in cancer (review). *Cell Res.*, 12, 2002, s. 311-320.
85. **Xu, W. G., Ji, X. R., Zhou, L. X., Xie, Y. Q., Zhang, L. F.:** Prognostic value of VEGF in primary oesophageal squamous cell carcinoma. *Chin. J. Cancer Res.*, 16, 2004, s. 85-89.
86. **Yamazaki, Y., Morita, T.:** Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors. *Molecular Diversity*, 10, 2006, s. 515-527.
87. **Younes, M. N., Park, Y. W., Yazici, Y. D., Gu, M., Santillan, A. A., Nong, X., El-Naggar, A. K., Myers, J. N.:** Concomitant inhibition of epidermal growth factor and vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases reduces growth and metastasis of human salivary adenoid cystic carcinoma in an orthotopic nude mouse model. *Molecular Target Therapeutics* 5, 2006, s. 2696-2705.
88. **Zhang, J., Peng, B.:** In vitro angiogenesis and expression of nuclear factor κ B and VEGF in high and low metastasis cell lines of salivary gland adenoid cystic carcinoma. *BMC Cancer* 7, 2007, s. 95-111.

8. Obrazová příloha:

Popisy k obrázkům:

Obr. č.1: Kribriformní struktury ACC (a) se silnou (3+) VEGF-D (b) a střední (c) (2+) VEGF-C imunoreakcí v cytoplazmě i jádrech nádorových buněk.

Obr. č.2: D2-40 pozitivní peritumorální lymfatické cévy jsou většinou dilatovány (šipky), méně často komprimovány (hlavičky šipek).

Obr. č.3: Intratumorální lymfatické cévy lemované D2-40 pozitivními endoteliálními buňkami jsou většinou komprimovány (hlavičky šipek), vzácně dilatovány (šipky).

Obr. č.4: D2-40 pozitivní myoepiteliální buňky na periferii acinů (hlavičky šipek) a vmezeřených vývodů (šipky) normální slinné žlázy.

Obr. č.5: Warthinův tumor. Většinou dilatované, D2-40 pozitivní lymfatické kapiláry jsou přítomny v pouzdru nádoru (černé šipky). V přilehlém parenchymu příušní žlázy jeví reakci rovněž myoepiteliální buňky kolem vývodů (bílá šipka) i acinů (dvojšipka).

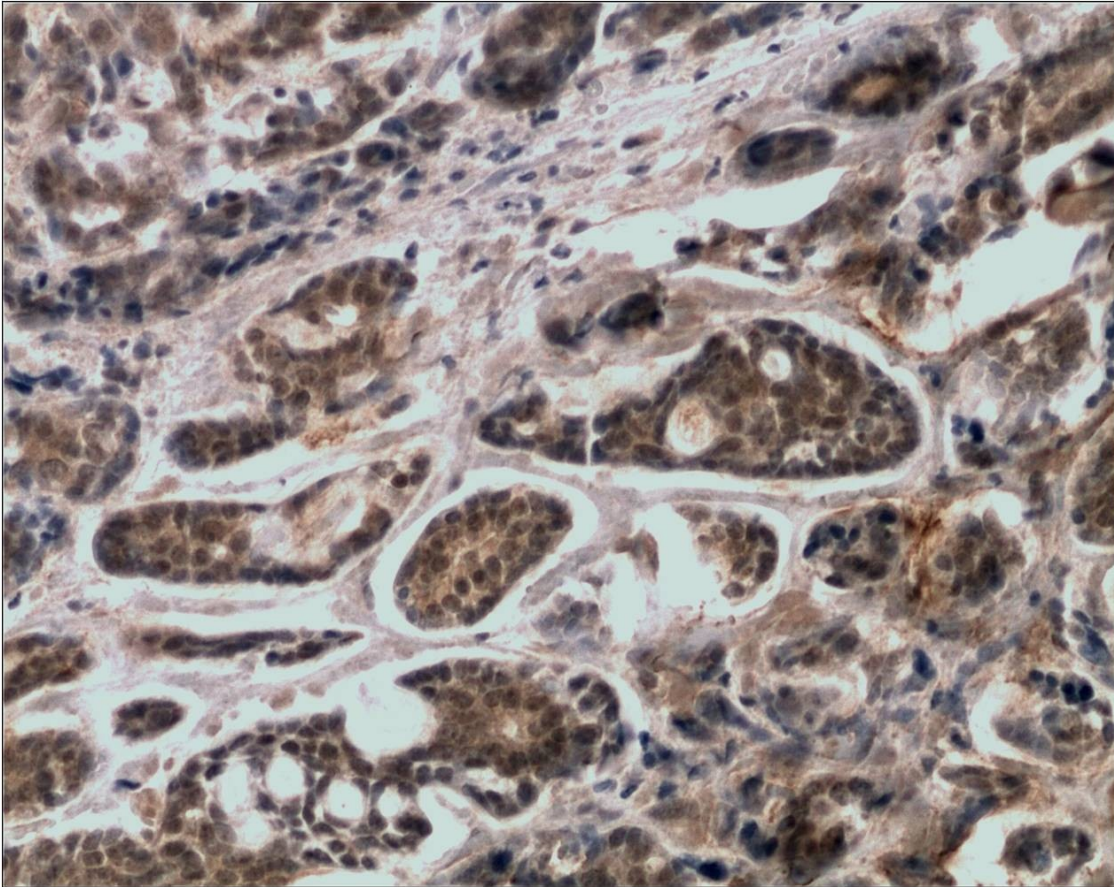
Obr. č.6: Warthinův tumor. Většinou komprimované D2-40 pozitivní lymfatické cévy se vyskytují v lymfoidním stromatu (černé šipky). Pozitivně reagují rovněž folikulární dendritické buňky v germinálních centrech (hvězdička) a bazální buňky onkocytárního epitelu nádoru (bílá šipka).

Obr. č.7: Onkocytom. Dilatovaná D2-40 pozitivní lymfatická céva (černá šipka) v pouzdru nádoru. Dvě menší cévy jsou zachyceny v parenchymu žlázy (bílá šipka), v němž se místy slabě barví i myoepiteliální buňky (hlavička šipky).

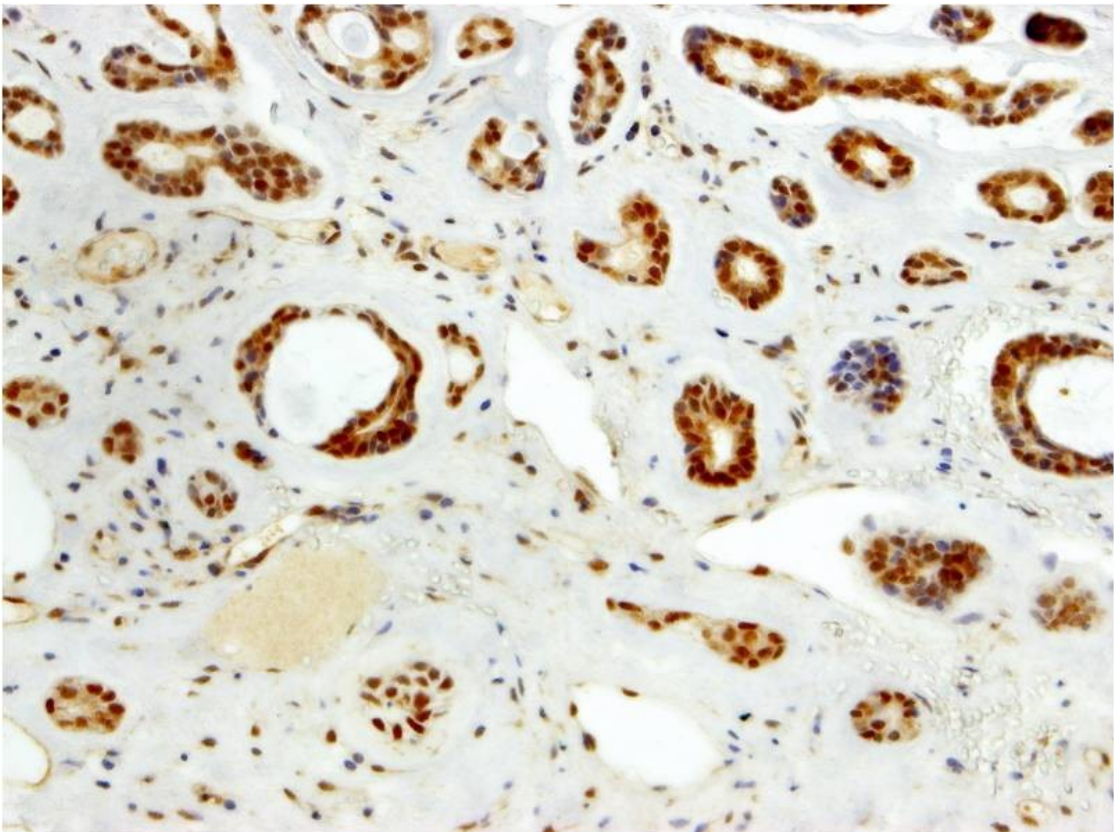
Obr. č.8: Warthinův tumor. Středně silná VEGF-C imunoreakce je patrna v jádrem většiny vnitřní vrstvy onkocytárních nádorových buněk (černá šipka), z nichž některé jeví rovněž slabou reakci cytoplazmatickou (bílá šipka). Inset: slabě až středně intenzivní VEGF-C pozitivita v jádrech stromálních lymfocytů (dvojšipka).

Obr. č.9: Warthinův tumor. Slabá VEGF-D imunoreakce v jádrech obou vrstev některých ovocytů (černá šipka), je patrna i střední až silná nukleární pozitivita stromálních lymfocytů (bílá šipka).

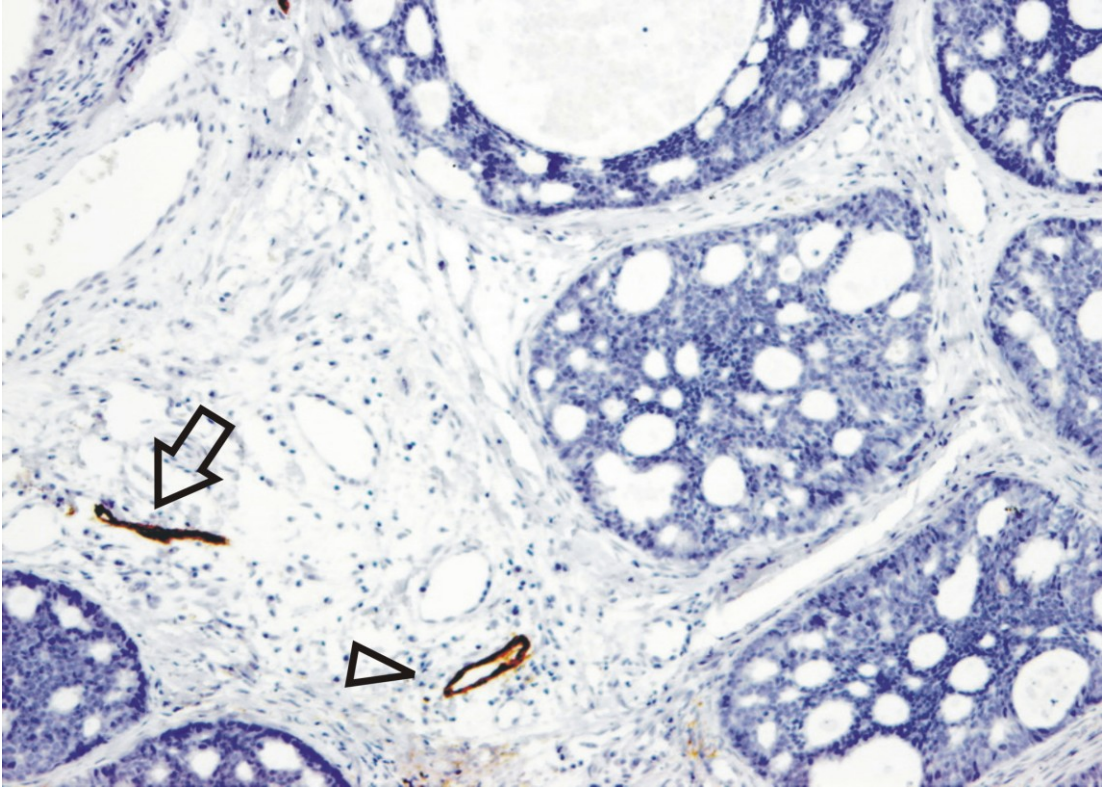
Obr. č. 1:



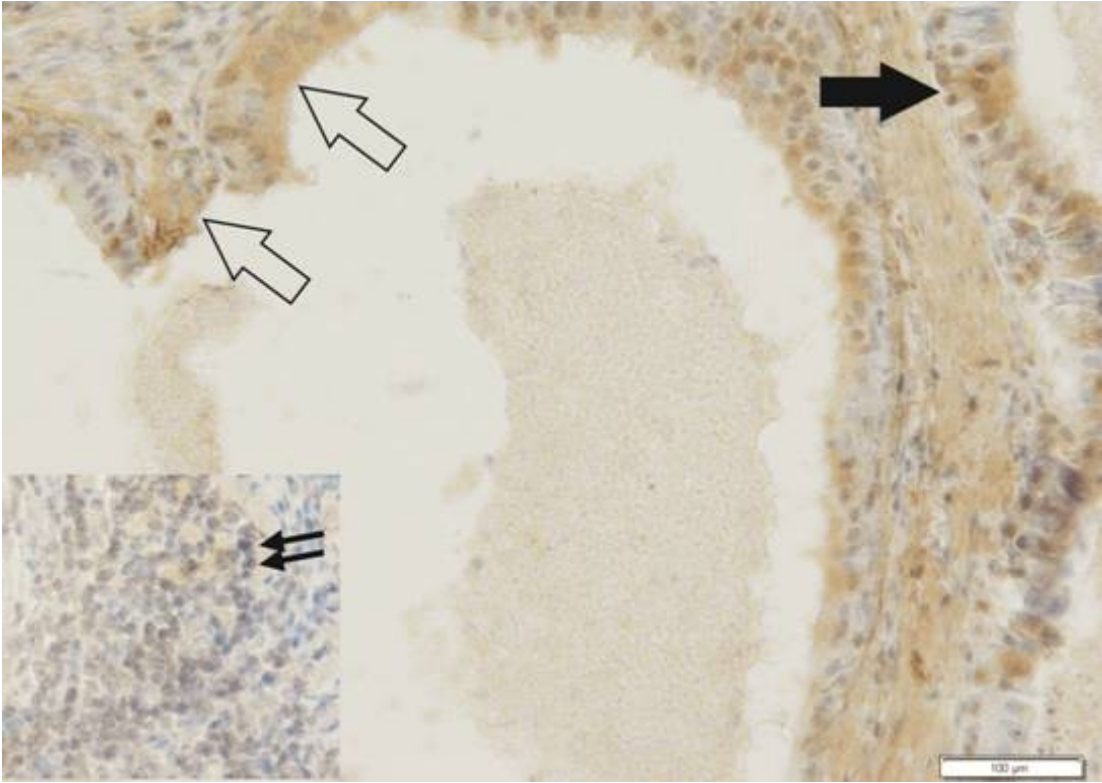
Obr. č. 2:



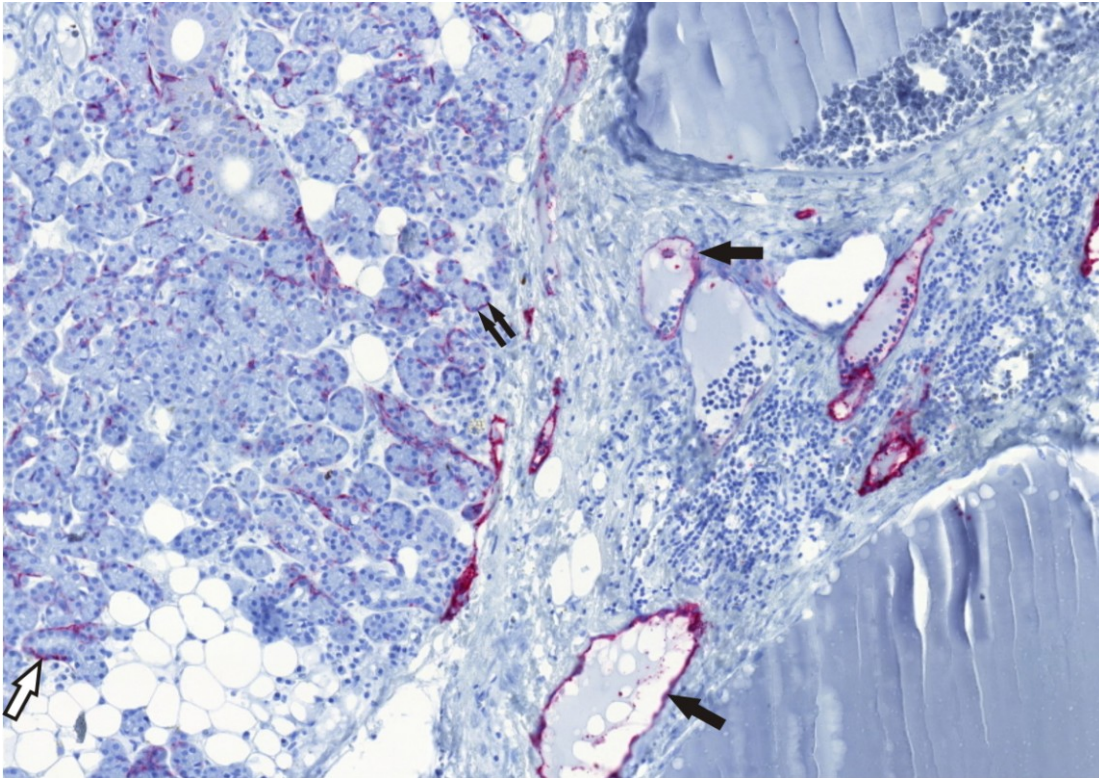
Obr. č. 3:



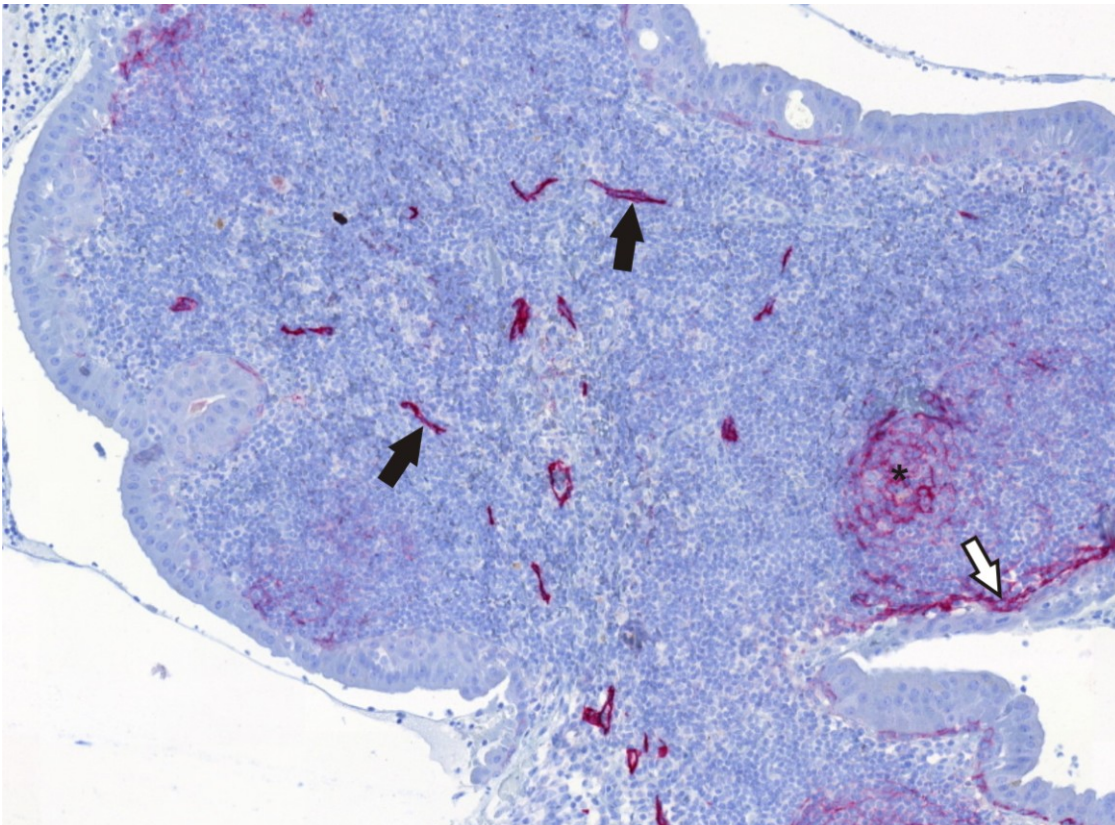
Obr. č.4:



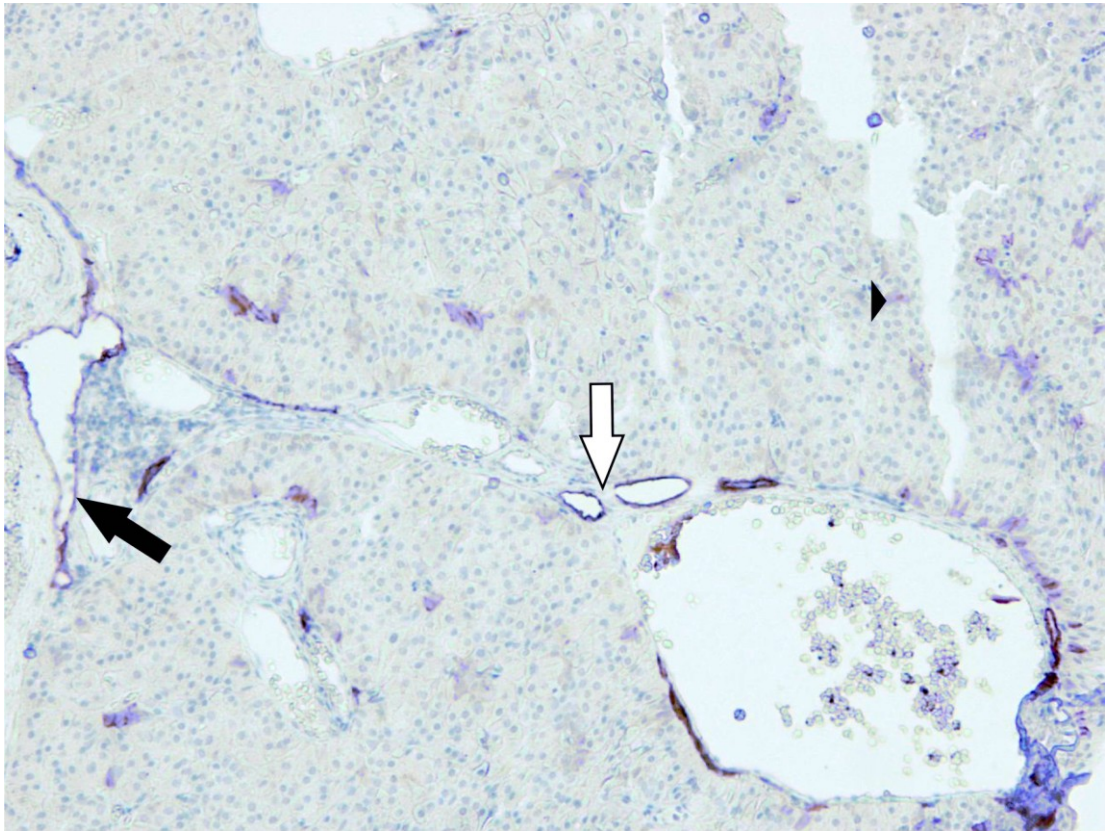
Obr. č. 5:



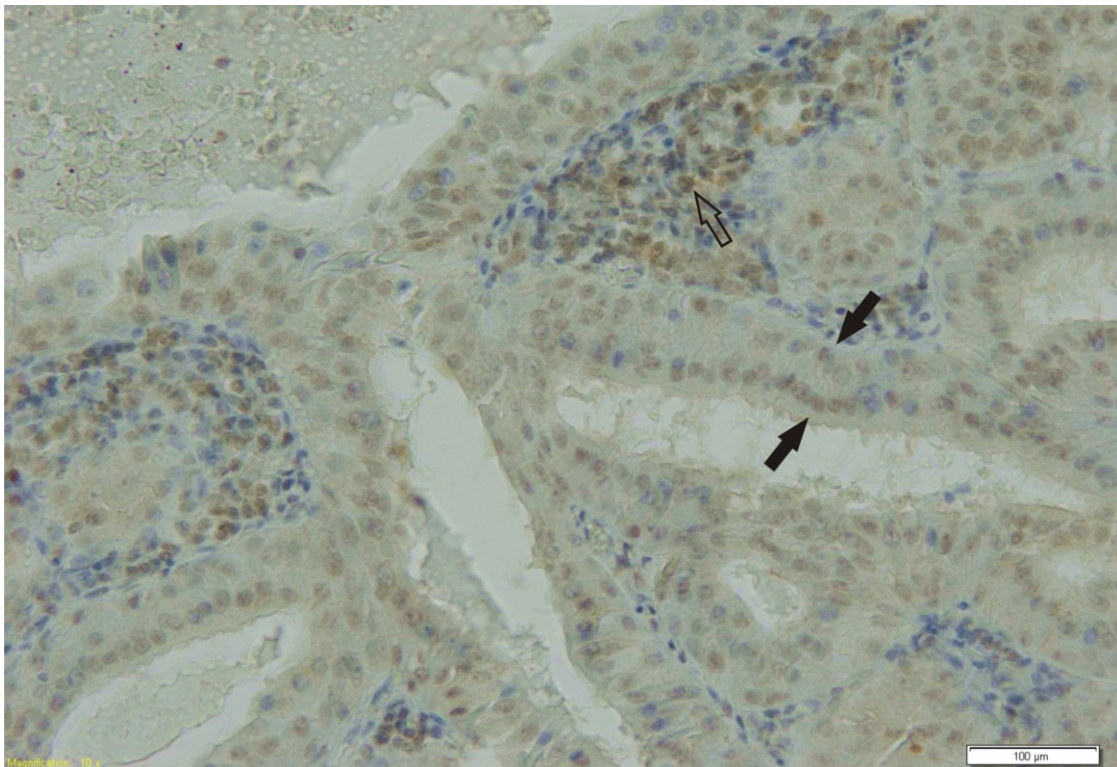
Obr. č. 6:



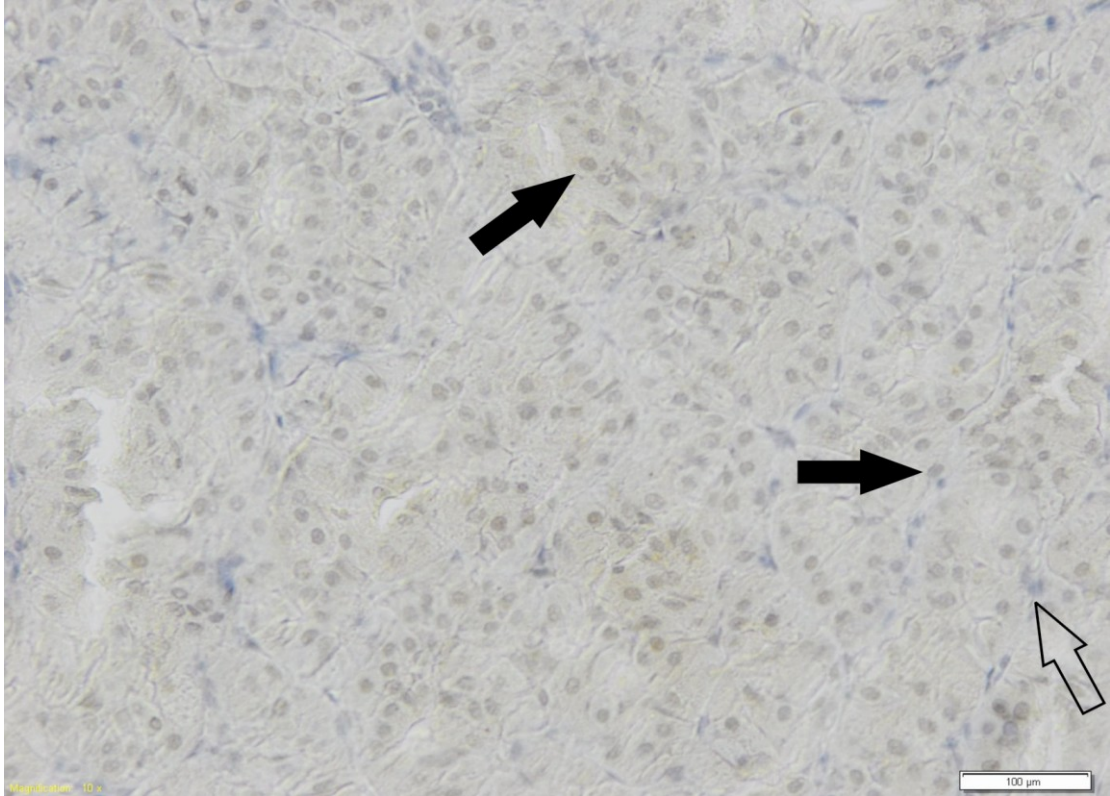
Obr.č.7:



Obr. č. 8



Obr. č. 9



9. Seznam publikovaných prací:

1. Hoza J.: Léčba chronické rhinosinuitidy, Interní medicína pro praxi, ISSN 1212-7299, 2012, ročník 14, č.12 (příloha č.1)
2. Hoza J., Stárek I., Brož M. Salzman R.: Význam vaskulárního endotelového růstového faktoru (vascular endothelial growth factor – VEGF) pro metastázování adenoidní cystického karcinomu slinných žláz, Otorinolaryngologie a foniatrie, 2014, 63, č. 3
3. Hoza J., Salzman R., Bakaj T., Stárek I., Kučerová L., Skálová A.: Comparison of lymphatic vessel density in Warthin's tumour and oncocytic adenoma, Virchows Archiv, 1-5, 2018
4. Hoza J., Salzman R., Stárek I., Schalek P., Kellnerová R.: Efficacy and safety of erdosteine in the treatment of chronic rhinosinuitis with nasal polyposis – a pilot study, Rhinology 51: 323-327, 2013
5. R. Salzman, I. Stárek, L. Kučerová, A. Skálová, J. Hoza: Neither expression of VEGF-C/D nor lymph vessel density supports lymphatic invasion as the mechanism responsible for local spread of recurrent salivary pleomorphic adenoma, Virchows Archiv, 1-6, 2013
6. Richard Salzman, Jiří Hoza, Vojtěch Perina, Ivo Stárek: Osteonecrosis of the External Auditory Canal Associated With Oral Bisphosphonate Therapy: Case Report and Literature Review, Otology & Neurotology 34 (2), 209-213

10. Seznam přednášek:

- 1.Hoza J.: Interdisciplinární spolupráce při řešení rinosinusogenních komplikací, Horní Smokovec, Slovensko – českém kongresu ORL a chirurgie hlavy a krku
- 2.Hoza J., Schalek P.: Erdosteine has an affect in the treatment of chronic rhinosinusitis: a pilot study, poster, 24. Evropském rinologickém kongresu v Toulouse, Francie
- 3.Hoza J.: Urgentní chirurgické zajištění dýchacích cest, I.Hirschův den, 12.4.2013, Olomouc
- 4.Hoza J, Stárek I., Kučerová L. a kol.: Expresse lymfangiogenních faktorů VEGF-C, VEGR-D a lymfangiogeneza v adenoidně cystickém karcinomu slinných žláz, Ostrava, Československý ORL kongres Ostrava, 4.-6. 6.2014
- 5.Hrabálek L., Hoza J., Vaverka M.: Transnasální endoskopická operace sfenoidální meningokély provázené adenomem hypofýzy – kazuistika
ORL kongres Ostrava, 4.-6.2014
- 6.Hoza, J., Stárek I.: Lymfangiogeneza u karcinomů slinných žláz, Onkologické dny Olomouc, 2018.

11. PODĚKOVÁNÍ

Děkuji svému školiteli panu Prof. MUDr. Ivo Stárkovi, CSc., z Kliniky otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku Fakultní nemocnice a Univerzity Palackého v Olomouci za cenné rady, trpělivost a připomínkami při psaní práce.

Za pomoc při statistickém zpracování dat děkuji panu MUDr. Richardovi Salzmanovi, PhD. z Kliniky otorinolaryngologie a chirurgie hlavy a krku Univerzity Palackého a Fakultní nemocnice v Olomouci.

Za odečet histologických vzorků a fotodokumentaci děkuji paní MUDr. Ladislavě Kučerové Ústavu klinické a molekulární patologie Lékařské Fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.