Univerzita Karlova v Praze

Lékařská fakulta v Plzni

Autoreferát disertační práce

Molekulárně genetické znaky nádorů slinných žláz v diferenciální diagnostice a predikci prognózy

Molecular genetic characteristics of salivary gland tumors in differential diagnosis and prognosis prediction

Lukáš Hauer

Plzeň (2016)

Disertační práce byla vypracována v rámci kombinovaného doktorského studijního programu Patologie na Šiklově ústavu patologie LF UK v Plzni.

Uchazeč: MUDr. et MUDr. Lukáš Hauer, Stomatologická klinika LF UK a FN v Plzni

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Alena Skálová, CSc., Šiklův ústav patologie LF UK a FN v Plzni

Školitel: Prof. MUDr. Alena Skálová, CSc., Šiklův ústav patologie LF UK a FN v Plzni

Oponenti:
prof. MUDr. Jiří Mazánek, DrSc., Stomatologická klinika 1. LF UK a VFN v Praze
doc. MUDr. Jan Laco, Ph.D., Fingerlandův ústav patologie LF UK a FN v Hradci Králové

Obhajoba disertační práce před komisí pro obhajobu disertačních prací studijního programu Patologie se koná dne 8. 6. 2016 v 13:00 hod.

Místo obhajoby: Bioptická laboratoř s.r.o., Mikulášské nám. 4, Plzeň

Tato disertační práce nevznikla za podpory grantu

S disertační prací je možno se seznámit na děkanátě Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Plzni, Husova 3, Plzeň.

Obsah

1 Anotace v českém jazyce
2 Anotace v anglickém jazyce
3 Cíle práce
4 Materiál a metodika
5 Výsledky
6 Diskuse
7 Závěr
8 Použitá literatura
9 Přehled publikační činnosti autora

1 Anotace v českém jazyce

Autor v předkládané práci shrnuje současné poznatky týkající se molekulárně genetických znaků slivárních karcinomů se zaměřením na nádorově specifické fúzní onkogeny a jejich využití jako diagnostických, prognostických a terapeutických biomarkerů. Dále se podrobněji zabývá adenoidně cystickým karcinomem (AdCC), druhým nejčastějším maligním sialomem, u něhož byly v posledních několika letech zjištěny nejen nové skutečnosti ohledně jeho biologického chování, ale byly objeveny i nové genetické znaky, které jsou pravděpodobně zodpovědné za jeho kancerogenezi.

V prezentované práci je vyhodnocen vlastní souboru 27 pacientů s AdCC, kteří byli léčeni ve FN v Plzni v posledních 30 letech (1986 - 2016). Byly sledovány tyto ukazatele: věk, pohlaví, lokalizace nádoru, klinické stadium v době diagnózy, přítomnost regionálních a vzdálených metastáz, grading, průměrná doba dispenzarizace, léčba a její výsledky. Soubor nádorů byl vyšetřen pomocí fluorescenční in situ hybridizace na průkaz *MYB-NFIB* fúzního onkogenu vznikajícího chromozomální translokací t(6;9)(q22-23;p23-24) a na deleci 1p36.

AdCC vznikl ve 41 % v malých slinných žlázách, v 26 % ve žláze podčelistní, v 22 % v žláze příušní a v 11 % v žláze podjazykové. První stadium bylo zaznamenáno v 26 % případů, 2. stadium v 18 %, 3. stadium v 26 % a 4. stadium v 30 % případů. Metastázy v regionálních lymfatických uzlinách byly diagnostikovány u 26 %, vzdálené metastázy pak u 30 % pacientů (dle lokalizace - plíce 55 %, játra 27 %, kosti 9 %, peritoneum 9 %).

Průměrný follow-up byl 76,4 ± 67,0 měsíců (v rozmezí 7 – 287 měsíců). Za dobu dispenzarizace bylo 59 % pacientů bez jakýchkoliv příznaků choroby, 22 % zemřelo v důsledku AdCC a 19 % žilo s tímto onemocněním, ať již v podobě recidivy či metastáz. Fúzní onkogen *MYB-NFIB* byl prokázán v 79 % případů (19/24) a 1p36 delece pak ve 13 % případů (3/23).

V souladu s recentní literaturou byla v souboru pacientů s AdCC potvrzena vysoká incidence regionálních uzlinových metastáz i vysoká incidence nádorově specifického fúzního onkogenu *MYB-NFIB*, který v současné době lze potenciálně využít pouze jako diagnostický biomarker v histopatologicky sporných případech, především u pozdních vzdálených metastáz.

Klíčová slova:
Salivární karcinomy, fúzní onkogen, biomarker, cílená léčba, adenoidně cystický karcinom, *MYB-NFIB*.

2 Anotace v anglickém jazyce

Molecular genetic characteristics of salivary gland tumors in differential diagnosis and prognosis prediction

In the presented manuscript the author summarizes the current knowledge on molecular biomarkers of salivary gland cancer, focusing on tumor-type specific fusion oncogenes and their use as diagnostic, prognostic and therapeutic biomarkers. In detail, the author deals with adenoid cystic carcinoma (AdCC), the second most common salivary gland cancer. New facts of its biological behavior as well as new fusion oncogenes probably responsible for its carcinogenesis were described in the last few years.

A retrospective case series evaluating 27 patients suffering from AdCC, who were treated at the University Hospital in Pilsen in the last 30 years (1986-2016), is presented in this study. The following characteristics were observed: age, gender, tumor location, clinical stage at diagnosis, presence of regional and distant metastases, tumor grade, duration of follow-up, treatment and outcomes. Detection of the 1p36 deletion and the t(6;9)(q22–23;p23–24) chromosomal translocation resulting in the *MYB–NFIB* gene fusion were performed.

The incidence of AdCC in minor salivary glands, submandibular gland, parotid gland and sublingual gland was 41 %, 26 %, 22 % and 11% respectively. The following staging was observed: the 1st stage in 26 %, the 2nd stage in 18 %, the 3rd stage in 26 % and the 4th stage in 30 % of cases. Metastases to regional lymph

nodes were diagnosed in 26 % and distant metastases in 30 % of patients (55 % to lung, 27 % to liver, 9 % to bones and 9 % of peritoneal metastases). The average follow-up was 76.4 ± 67.0 months (range 7-287 months). An outcome of the treatment during follow- up was as follows: 59 % of patients were with no evidence of the disease, 22 % of patients died because of the disease and 19 % of patients were alive with a recurrence or metastases of AdCC. The *MYB-NFIB* fusion transcript was detected in 79% of cases (19/24) and the 1p36 deletion in 13% of cases (3/23).

In line with a recent literature the high incidence of regional lymph node metastases as well as the *MYB-NFIB* fusion oncogene was confirmed in our retrospective case series of 27 patients with AdCC. The *MYB-NFIB* gene fusion could currently only be used as a potential diagnostic tool in difficult histopathological cases of AdCC, especially in late distant metastases.

Keywords:
Salivary gland cancer, fusion oncogene, biomarker, targeted therapy, adenoid cystic carcinoma, *MYB-NFIB*

3 Cíle práce

Definovat současné možnosti využití molekulárně genetických znaků salivárních karcinomů jako diagnostických, prognostických a terapeutických biomarkerů.

Na základě literární rešerše shrnout současný pohled na biologické chování, diagnostiku, léčbu a prognózu adenoidně cystického karcinomu slinných žláz včetně využití molekulárně genetických znaků u tohoto nádoru.

Vyhodnotit biologické chování a výsledky léčby adenoidně cystického karcinomu slinných žláz ve vlastním souboru 27 pacientů s tímto nádorem, kteří byli léčeni ve FN v Plzni v letech 1986 - 2016. Pomocí fluorescenční in situ hybridizace vyšetřit tyto karcinomy na nádorově specifický *MYB-NFIB* fúzní onkogen vznikající chromozomální translokací t(6;9)(q22-23;p23-24) a na deleci 1p36.

4 Materiál a metodika

Pomocí klinických informačních systémů PC DENT (CompuGroup Medical Česká republika s.r.o., verze 3.1.1, revize:6), WinMedicalc (Medicalc software s.r.o., Česká republika, verze 2.10.8.46) a WinZis (Prodata Praha s.r. o., Česká Republika) byli vyhledáni všichni pacienti s diagnózou AdCC, kteří byli léčeni ve FN v Plzni (Stomatologická a ORL klinika) a u kterých byly dohledatelné klinické údaje o dispenzarizaci trvající nejméně 6 měsíců. Bylo identifikováno 27 pacientů za období 01/1986 - 01/ 2016, tedy za 30 let. Ve stanoveném souboru byly sledovány tyto ukazatele: věk, pohlaví, lokalizace nádoru, klinické stadium v době diagnózy dle 7. vydání TNM klasifikace, přítomnost metastáz v regionálních lymfatických uzlinách a vzdálených metastáz, grading, průměrná doba dispenzarizace, léčba a její výsledky.

Metodika detekce *MYB-NFIB* fúze pomocí FISH

Čtyři μm silné řezy tkáně formalínem fixované, v parafínu zalité (FFPE) byly naneseny na povrch pozitivně nabitých podložních skel. Neobarvené, standardně deparafinizované, preparáty byly inkubovány v 1x Target Retrieval Solution Citrate pH 6 (Dako, Glostrup, Německo) při 95°C/40 minut a ve stejném roztoku chlazeny po dobu 20 minut při pokojové teplotě. Skla byla následně omyta v destilované vodě po dobu 5 minut při pokojové teplotě, natrávena v roztoku pepsinu (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) o koncentraci 0,5 mg/ml v 0,01M HCl při 37°C/25 minut a omyta v destilované vodě po dobu 5 minut při pokojové teplotě. Následovala dehydratace vzestupnou alkoholovou řadou

(70 %, 85 % a 96 % a´ 2 minuty) a vysušení preparátu na vzduchu.

Pro detekci fúze *MYB-NFIB* byla použita komerčně dostupná break-apart FISH sonda ZytoLight® SPEC MYB Dual Color Break Apart Probe (ZytoVision GmbH, Bremerhaven, Německo) a dále sondy vlastního designu, break-apart sonda SureFish NFIB Break Apart Probe a fúzní sonda SureFish MYB-NFIB Fusion Probe (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA). Oligonukleotidy NFIB break-apart sondy byly lokalizovány v oblasti chromosomu 9 na pozici 13740671-14140560 a 14340306-14740560. U *MYB-NFIB* fúzní sondy byly oligonukleotidy v oblasti chromosomu 6 lokalizovány na pozici 135271234-135771043 a v oblasti chromosomu 9 na pozici 13990266-14490285 (vše Build GRCh37).

Hybridizační směs SureFish sond byla připravena z 1 µl oranžově a 1 µl zeleně značených částí sond, 1 µl destilované vody a 7 µl LSI pufru (Vysis/Abbott Molecular, IL, USA). Sonda MYB Dual Color Break Apart Probe byla již z výroby připravena k přímé aplikaci.

Dle velikosti řezu bylo na preparáty aplikováno potřebné množství sondy a přikryto krycím sklem, jehož okraje byly zalepeny lepidlem. Pak byla skla inkubována v přístroji ThermoBrite™ (StatSpin/Iris Sample Processing, Westwood, MA, USA) s následujícím programem: kodenaturace při 85 °C/8 minut a hybridizace při 37 °C/16 hodin. Po vyjmutí skel

z přístroje byla odstraněna krycí sklíčka a preparáty byly omyty v post-hybridizačním roztoku 2xSSC + 0,3% NP-40 při 72 °C/2 minuty. Po oschnutí skel ve tmě byly preparáty podbarveny 4 ′, 6 ′ -diamidino-2-phenylindolem - DAPI (Vysis/Abbott Molecular) a přikryty novým krycím sklíčkem.

Interpretace FISH
Preparáty byly prohlédnuty v epifluorescenčním mikroskopu Olympus BX51 (Olympus Corporation, Tokyo, Japonsko) při 100x zvětšení se sety filtrů Triple Band Pass (DAPI / SpectrumGreen / SpectrumOrange), Dual Band Pass (SpectrumGreen / SpectrumOrange) a Single Band Pass (SpectrumGreen nebo SpectrumOrange).

V každém preparátu bylo hodnoceno 100 náhodně vybraných nepřekrývajících se jader v cílové oblasti. Jako pozitivní byl u break-apart sond hodnocen nález separátního zeleného nebo oranžového signálu v jádře, u fúzní sondy byl pozitivní nález značen přítomností fúzního oranžovo-žluto-zeleného signálu v jádře.

Cut-off hodnoty byly určeny na vlastní kontrolní skupině s normálním histologickým nálezem, kde byla hodnocena jádra s abnormálním nálezem, stanoven jejich průměr a směrodatná odchylka. Cut-off byla definována jako hodnota součtu průměru + 3 standardní odchylky. Pro obě break-apart sondy byla cut-off hodnota 10 % pozitivních jader, u fúzní sondy 20 %.

Příprava RNA pro detekci *MYB-NFIB* pomocí PCR

RNA z FFPE tkáně byla izolována pomocí QIASymphony RNA Kitu (QIAGEN, Hilden, Německo) v přístroji QIASymphony SP (QIAGEN). Kvalita a kvantita RNA byla následně změřena na spektrofotometru Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, Waltham, USA) a přepsána do cDNA pomocí Transcriptor First Strand cDNA Kitem (Roche, Basel, Německo) dle pokynů výrobce. Integrita RNA byla zjištěna pomocí kontrolní PCR připravené z 2 µl cDNA, 12,5 µl HotStar Taq PCR Master Mix (QIAGEN), 10 pM příslušných primerů a doplněním destilovanou vodou do objemu 25 µl. Primery a délky vzniklých PCR produktů jsou zobrazeny v **tabulce 1**. Program PCR se skládal z úvodní denaturace při 95 °C/14 minut, a následujících 40 cyklů denaturace při 95 °C/1 minuta, nasedání primerů při 60 °C/30 sekund a extenze při 72 °C/1 minuta. Program byl ukončen závěrečnou extenzí při 72 °C/7 minut. Vzorky, jejichž integrita byla menší než 133 bp, byly vyřazeny z následující analýzy.

Tabulka 1 - Primery a délky vzniklých produktů použité pro určení integrity RNA

Primer	**Délka amplikonu (bp)**	**Forward primery**	**Reverse primery**
B2M	105	GAAAAAGATGAGTATGCCTG	ATCTTCAAACCTCCATGATG
B2M-133	133	CTCGCGCTACTCTCTCTTTCT	TGTCGGATTGATGAAACCCAG
PGK	247	CAGTTTGGAGCTCCTGGAAG	TGCAAATCCAGGGTGCAGTG

Detekce *MYB-NFIB* fúze pomocí PCR
Pro vlastní detekci *MYB-NFIB* fúze byly smíchány 2 µl cDNA, 12,5 µl HotStar Taq Master Mixu (QIAGEN), 10 pM příslušných primerů a destilovaná voda do výsledného objemu 25 µl. Amplifikační program se skládal z úvodní denaturace při 95 °C/14 minut, poté ze 40 cyklů denaturace při 95 °C/1 minuta, nasedání primerů při 55 °C/1 minuta a extenze při 72 °C/1,5 minuty. Program byl ukončen závěrečnou extenzí při 72 °C/7 minut. Primery pro tuto PCR byly použity dle [1].

Vzniklé amplifikáty byly přečištěny magnetickými kuličkami Agencourt AMPure (Agencourt Bioscience Corporation, A Beckman Coulter Company, Beverly, MA, USA) dle pokynů výrobce a oboustranně sekvenovány Big dye Terminator kitem (Applied Biosystems, California, USA). Po přečištění sekvenačních reakcí Agencourt CleanSEQ kitem (Agencourt Bioscience Corporation) byly reakce procesovány v automatickém analyzátoru ABI Prism 3130xl (Applied biosystems) za použití konstantního napětí 13,2 kV/20 minut. Získané sekvence byly porovnány s GenBank sekvencemi.

5 Výsledky

Soubor 27 pacientů s AdCC a sledované parametry shrnuje **tabulka 2.** Průměrný věk pacientů byl 55,8 ± 17,4 let (v rozmezí 24 – 84 let). Poměr zastoupení mužů a žen byl 1 : 1,7. AdCC vznikl v malých slinných žlázách (nebo v jim podobných žlázách horního aerodigestivního traktu) v 41 %, v podčelistní žláze v 26 %, v příušní žláze v 22 % a v podjazykové žláze pak v 11 % případů.

V době diagnózy bylo zaznamenáno 1. klinické stadium v 26 %, 2. stadium v 18 %, 3. stadium v 26 % a 4. stadium v 30 % případů. Metastázy v regionálních lymfatických uzlinách byly v době diagnózy detekovány u 6 pacientů, z toho u jednoho nemocného se jednalo o přímé prorůstání karcinomu z podčelistmí žlázy do uzliny. U jednoho pacienta s AdCC příušní žlázy byla diagnostikována metastáza v intraglandulární parotické uzlině, která ale dle pravidel TNM klasifikace nebyla započítána. Celkem se metastázy v regionálních lymfatických uzlinách vyskytovaly u 26 % pacientů (7/27). Vzdálené metastázy byly diagnostikovány u 30 % pacientů, u 3 nemocných v době diagnózy. Nejdelší období od diagnózy AdCC do diagnózy vzdálených metastáz (plicních) bylo 11 let u pacientky bez lokoregionální recidivy. Nejčastější lokalizací vzdálených metastáz byly plíce (55 %), játra (27 %), kosti (9 %) a peritoneum (9 %). U 2 pacientů byly diagnostikovány vzdálené metastázy ve více lokalizacích. Grading byl popsán jen u 21 pacientů, a to grade 1 v 5 % případů, grade 2 v 67 % případů a grade 3 v 28 % případů.
Průměrná doba dispenzarizace byla 76,4 ± 67,0 měsíců (v rozmezí 7 – 287 měsíců).

Všichni pacienti kromě jednoho (pacient se synchronní nádorovou triplicitou s generalizací – karcinom ledviny, tračníku a AdCC) byli primárně léčeni chirurgicky, u jedné pacientky byl proveden pouze debulking. 61 % chirurgických výkonů s cílem radikálního odstranění AdCC mělo histologicky blízké nebo pozitivní okraje

resekátu. Všichni pacienti (kromě čtyř – nemocní se vzdálenými metastázami v době diagnózy plus jedna nemocná, která odmítla léčbu) poté podstoupili adjuvantní radioterapii nebo chemoradioterapii. V případě jinak neléčitelného progresivního onemocnění pak byla indikována paliativní chemoterapie.

Za dobu dispenzarizace bylo 59 % pacientů bez jakýchkoliv příznaků choroby, 22 % zemřelo v důsledku AdCC a 19 % žilo s tímto onemocněním, ať již v podobě recidivy či metastáz.

Genetické vyšetření souboru 26 pacientů s AdCC shrnuje **tabulka 3**. Při FISH vyšetření pomocí MYBba sondy byla pozitivita zaznamenána v 75 % (18/24), pomocí NFIBba sondy v 87 % (20/23) a pomocí MYB/NFIB fúzní sondy pak v 90 % případů (19/21). Souhrnná detekce fúzního onkogenu *MYB-NFIB* byla zaznamenána v 79 % případů (19/24) a 1p36 delece pak ve 13 % případů (3/23). U jedné pacientky bylo FISH vyšetření pomocí MYBba a NFIBba sond negativní, ale přesto byla potvrzena *MYB- NFIB* fúze. U dvou pacientů bylo vyšetření pomocí MYBba sond negativní, ale NFIBba pozitivní, s negativními *MYB-NFIB* fúzemi u obou z nich.

Tabulka 2 – Soubor pacientů s AdCC léčených ve FN v Plzni v letech 1986 - 2016

Č.	Věk/ Pohlaví	Lokalizace (místo vzniku)	Staging/ Grading, Stadium	Chirurgická terapie	Onkol. terapie	Výsledky, další vývoj	Follow-up (m)
1	57/Ž	příušní žláza	T3N0M0/Gx, 3.	superficiální parotidektomie	RT	NED	48
2	32/M	podčelistní žláza	T1N0M0/G2, 1.	ND Ib	RT	NED	62
3	84/M	dolní vestibulum	T4N2bM1/Gx, 4.	- (triplicita)	-	DOD	9
4	58/Ž	měkké patro	T2N0Mx/G3, 2.	excize	CHRT	NED	135
5	60/Ž	horní vestibulum	T1N0M0/G2, 1.	excize	-	rT4N0M0, odmítla Th AWD	91
6	48/Ž	měkké patro	T2N0M0/G3, 2.	excize	CHRT	NED	115
7	57/M	příušní žláza	T4N2bM0/G3, 4.	totalní parotidektomie RND	RT, CHT	rT3N0M1, DOD	18
8	48/Ž	podčelistní žláza	T3N0M0/G2, 3.	ND Ib	CHRT, CHT	rT4N0M1, DOD	137

9	47/Ž	podčelistní žláza	T1N0M0/G2, 1.	exstirpace, RND - T0N2bM0	CHRT, CHT	T0N0M1, DOD	44
10	28/Ž	příušní žláza	T1N0M0/G2, 1.	exstirpace	CHRT	NED	92
11	65/M	podjazyk. žláza	T1N0Mx/G2, 1.	excize, ND I	RT	NED	80
12	45/M	příušní žláza	T3N0M0/G2, 3.	totalní parotidektomie RND	RT	NED	75
13	56/Ž	příušní žláza	T3N0Mx/G2, 3.	totalní parotidektomie	RT	rT4N0M1, AWD	190
14	79/Ž	patrová tonsila	T4N1M0/G2, 4.	debulking	RT	DOD	7
15	28/Ž	čelistní dutina	T4N0M0/G2, 4.	etmoidektomie, subtotální maxillektomie	CHRT	rT4N0M0, DOD	63
16	77/Ž	příušní žláza	T2N0M0/G3, 2.	totalní parotidektomie	RT	NED	55
17	49/Ž	podčelistní žláza	T3N0M0/G2, 3.	ND Ib, rT2N0M0 – ND Ia	RT, CHT	NED	193
18	76/Ž	podjazyk. žláza	T3N1M0/G3, 3.	excize, ND Ib	RT	NED	29
19	54/Ž	podčelistní žláza	T1N0M0/Gx, 1.	exstirpace	RT	T0N0M1, AWD	130

20	82/Ž	podjazyk. žláza	T2N0M0/Gx, 2.	excize	RT	NED	48
21	51/M	čelistní dutina	T4N2bM0/Gx, 4.	- rT4N0M0 - subtotální maxillektomie	RT	NED	86
22	24/M	podčelistní žláza	T1N0M0/Gx, 1.	ND I	RT	NED	287
23	63/M	dolní vestibulum	T3N0M0/G3, 3.	excize	RT	NED	26
24	77/Ž	nosní dutina	T4N0M1/G1, 4.	subtotální maxillektomie	-	T0N0M1, AWD	10
25	32/Ž	tvrdé patro	T4N0M0/G2, 4.	alveolo-palatinální resekce	RT	NED	15
26	79/M	podčelistní žláza	T3N1M1/G2, 4.	ND Ib	CHT	T0N0M1, AWD	12
27	50/M	čelistní dutina	T2N0M0/G2, 2.	etmoidektomie, subtotální maxillektomie	RT	NED	7

(R)ND – (radical) neck dissection, (radikální) krční disekce, Th – terapie, RT – radioterapie, CHT – chemoterapie, CHRT – chemoradioterapie, NED – no evidence of disease, bez příznaků onemocnění, AWD - alive with disease, žije s onemocněním, DOD – dead of disease, smrt v důsledku onemocnění

Tabulka 3 – Genetické vyšetření souboru pacientů s AdCC léčených ve FN v Plzni v letech 1986 - 2016

Č.	1p36 delece	MYBba	NFIBba	MYB/NFIB fúze	PCR MYBF
1	Neg.	+	+	+	Neg.
2	Neg.	+	+	+	Neg.
3	+	+	+	+	Neg.
4	Neg.	+	+	+	+
5	Neg.	+	+	+	+
6	Neg.	+	+	+	Neg.
7	+	+	+	+	Neg.
8	Neg.	+	+	+	Neg.
9	+	+	+	+	Neg.
10	Neg.	+	+	+	///
11	Neg.	+	+	+	Neg.
12	Neg.	Neg.	+	Neg.	Neg.
13	Neg.	+	+	+	+
14	Neg.	+	+	+	+
15	///	///	///	///	///
16	Neg.	+	+	+	///
17	Neg.	Neg.	+	Neg.	Neg.
18	Neg.	Neg.	Neg.	///	Neg.
19	N/A	N/A	N/A	///	///
20	Neg.	Neg.	Neg.	///	///
21	N/A	Neg.	N/A	N/A	///
22	Neg.(NH)	+	+	+	Neg.
23	N/A	N/A	N/A	N/A	Neg.
24	Neg.	Neg.	Neg.	+	+
25	Neg.	+	+	+	///
26	Neg.	+	+	+	///
27	Neg.	+	+	+	///

Neg. - negativní, + pozitivní, /// - nevyšetřeno, NH - nerovnoměrná hybridizace, N/A – nelze analyzovat

6 Diskuse

V prezentovaném souboru pacientů jsme v souladu s recentní literaturou [2, 3] potvrdili vysokou tendenci AdCC k lokálním recidivám (26 %, 7/27), která je způsobena především obtížnou radikální chirurgickou léčbou vzhledem k časté peri- a intraneurální invazi (61 % resekátů AdCC s histologicky blízkým nebo pozitivním okrajem). Metastazování hematogenní cestou jsme zaznamenali jako časný (11 % pacientů v době diagnózy) i pozdní projev AdCC, který je nezávislý na lokoregionální kontrole onemocnění (plicní metastázy až 11 let od stanovení diagnózy při lokoregionální remisi). V kontrastu s dřívějšími názory na AdCC jsme zjistili vysokou incidenci metastáz do regionálních lymfatických uzlin (26 %,7/27), čímž jsme potvrdili i výsledky jiných současných prací [4, 5]. V průměru po více jak 6 letech dispenzarizace bylo 59 % pacientů v kompletní remisi a 41 % nemocných zemřelo v důsledku AdCC nebo žije s pokročilým, jinak neřešitelným onemocněním, což odpovídá výsledkům léčby v jiných studiích i prognóze tohoto novotvaru [6, 7].

Fúzní onkogen *MYB-NFIB* byl v našem souboru detekován u 79 % pacientů s AdCC (19/24). V současné době je ve studiích dosahováno většinou výsledků 50 % - 80 % [8, 9, 10, 11]. U dvou nemocných, u kterých bylo vyšetření pomocí MYB break-apart sondy negativní a NFIB break-apart sondy pozitivní současně s negativními *MYB-NFIB* fúzemi lze předpokládat jiného fúzního partnera, pravděpodobně *MYBL1*, což bude předmětem dalšího výzkumu. Deleci 1p36 jsme zaznamenali ve 13 %

případů (3/23). V práci z roku 2008 byla zjištěna incidence této genetické změny 44 % u 53 vyšetřených AdCC se závěrem, že se jedná o nejčastější genetickou změnu signifikantně spojenou s horší prognózou pacientů [12]. Všichni tři pacienti z našeho souboru s diagnostikovanou delecí 1p36 zemřeli v důsledku AdCC v období 9 - 44 měsíců od stanovení diagnózy a léčby. Vzhledem k malému soubou pacientů s AdCC a nízké incidenci delece 1p36, navíc při nádorové triplicitě jednoho z nemocných, nelze blíže statisticky hodnotit klinicko- patologickou korelaci tohto markeru.

MYB-NFIB fúzní onkogen lze u AdCC v současnosti využít pouze jako diagnostický biomarker, a to hlavně u pozdních vzdálených metastáz při lokoregionální remisi onemocnění. Ty již často nebývají dávány do souvislosti s AdCC a mohou být mylně považovány za primární nádory daných lokalizací (např. adenokarcinomy plic) nebo za metastázy neznámého origa (např. v jatrech), což pak může vést klinického lékaře k dalším chybám v diagnosticko-léčebném postupu. Problémem v těchto případech bývá i to, že se biopsie z těchto orgánů primárně nedostávají k patologům specializujících se na diagnostiku NSŽ.

7 Závěr

AdCC slinných žláz vykazuje vyšší tendenci k zakládání regionálních uzlinových metastáz, než se dříve soudilo. *MYB-NFIB* fúze je hlavní nádorově specifickou onkogenní událostí u AdCC s vysokou úspěšností detekce. Tento fúzní onkogen je možné v současné době potenciálně využít pouze jako pomocný diagnostický

nástroj u histopatologicky sporných případů, především pak u pozdních vzdálených metastáz.

8 Literatura

1) Fehr A, Kovács A, Löning T, Frierson H Jr, van den Oord J, Stenman G. The MYB-NFIB gene fusion-a novel genetic link between adenoid cystic carcinoma and dermal cylindroma. *J Pathol*. 2011;224(3):322-327.
2) Coca-Pelaz A, Rodrigo JP, Bradley PJ, Vander Poorten V, Triantafyllou A, Hunt JL et al. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck--An update. *Oral Oncol*. 2015;51(7):652-661.
3) Amit M, Binenbaum Y, Sharma K, Ramer N, Ramer I, Agbetoba A et al. Analysis of failure in patients with adenoid cystic carcinoma of the head and neck. An international collaborative study. *Head Neck.* 2014;36(7):998-1004.
4) Amit M, Binenbaum Y, Sharma K, Ramer N, Ramer I, Agbetoba A et al. Incidence of cervical lymph node metastasis and its association with outcomes in patients with adenoid cystic carcinoma. An international collaborative study. *Head Neck.* 2015;37(7):1032-1037.
5) Min R, Siyi L, Wenjun Y, Ow A, Lizheng W, Minjun D et al. Salivary gland adenoid cystic carcinoma with cervical lymph node metastasis: a preliminary study of 62 cases. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2012;41(8): 952-957.
6) Marx RE, Stern D. *Oral and Maxillofacial Pathology: A Rationale for Diagnosis and Treatment*. 2nd edition, Quintessence Pub Co, 2012, 547 – 598.
7) Myers EN, Ferris RL. *Salivary Gland Disorders*. 1st edition, Springer-Verlag, Berlin, 2007, 59-62.

8) Mitani Y, Liu B, Rao PH, Borra VJ, Zafereo M, Weber RS et al. Novel MYBL1 Gene Rearrangements with Recurrent MYBL1-NFIB Fusions in Salivary Adenoid Cystic Carcinomas Lacking t(6;9) Translocations. *Clin Cancer Res*. 2016;22(3):725-733.
9) Mitani Y, Rao PH, Futreal PA, Roberts DB, Stephens PJ, Zhao YJ et al. Novel chromosomal rearrangements and break points at the t(6;9) in salivary adenoid cystic carcinoma: association with MYB-NFIB chimeric fusion, MYB expression, and clinical outcome. *Clin Cancer Res*. 2011;17(22):7003-7014.
10) Persson M, Andrén Y, Moskaluk CA, Frierson HF Jr, Cooke SL, Futreal PA et al. Clinically significant copy number alterations and complex rearrangements of MYB and NFIB in head and neck adenoid cystic carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2012;51(8):805-817.
11) Rettig EM, Tan M, Ling S, Yonescu R, Bishop JA, Fakhry C et al. MYB rearrangement and clinicopathologic characteristics in head and neck adenoid cystic carcinoma. *Laryngoscope*. 2015;125(9):E292-E299.
12) Rao PH, Roberts D, Zhao YJ, Bell D, Harris CP, Weber RS et al. Deletion of 1p32-p36 is the most frequent genetic change and poor prognostic marker in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. *Clin Cancer Res*. 2008;14(16):5181-5187.

9 Přehled publikační činnosti autora

Původní články

1. Hauer L, Hrušák D, Walter J, Andrle P, Hostička L. Kostní nekrózy čelistí indukované bisfosfonáty. Plzeň. Lék. Sborn. 2009;75:59-73.

2. Hrušák D, Jambura J, Hauer L**.** Zlomeniny spodiny očnice. Čes. Stomat. 2010;110(5):104-108.

3. Hauer L, Hrušák D, Hostička L, Andrle P, Jambura J, Pošta P. Dlaždicobuněčný karcinom rtu. Čes. Stomat. 2013;113(2):42-51.

4. Skálová A, Vanecek T, Simpson RH, Vazmitsel MA, Majewska H, Mukensnabl P, Hauer L, Andrle P, Hosticka L, Grossmann P, Michal M. CRTC1-MAML2 and CRTC3-MAML2 fusions were not detected in metaplastic Warthin tumor and metaplastic pleomorphic adenoma of salivary glands. Am J Surg Pathol. 2013;37(11):1743-1750. **(IF: 4.592)**

5. Skálová A, Vanecek T, Majewska H, Laco J, Grossmann P, Simpson RH, Hauer L**,** Andrle P, Hosticka L, Branžovský J, Michal M. Mammary Analogue Secretory Carcinoma of Salivary Glands With High-grade Transformation: Report of 3 Cases With the ETV6-NTRK3 Gene Fusion and Analysis of TP53, β-Catenin, EGFR, and CCND1 Genes. Am J Surg Pathol. 2014;38(1):23-33. **(IF: 5.145)**

6. Stárek I, Salzman R, Kučerová L, Skálová A, Hauer L. Expression of VEGF-C/-D and lymphangiogenesis in salivary adenoid cystic carcinoma. Pathol Res Pract. 2015; 211(10):759-765. **(IF: 1.397)**

Přehledové články

1. Hauer L, Hostička L, Andrle P. Diferenciální diagnostika lézí imitujících sialolitiázu na ortopantomogramu. LKS. 2009;19(4):114–120.
2. Hauer L. Historie a etiologie čelistních osteonekróz. Prakt. Zub. Lék. 2009;57(5):71-75.
3. Hauer L, Geigerová L, Andrle P. Cervikofaciální aktinomykóza. LKS. 2010;20(12):244–249.
4. Hauer L, Hrušák D, Hostička L, Andrle P, Jambura J, Maňáková T, Mukenšnabl P. Bisfosfonáty a dutina ústní. Stomateam. 2010;10(5):5-14.
5. Hauer L, Hrušák D, Andrle P, Hostička L, Jambura J, Waloschek T. Benigní fibrooseální léze čelistních kostí. Stomateam. 2011;11(1):13-19.
6. Hauer L, Hrušák D, Hostička L, Andrle P, Jambura J, Pošta P. Osteonekróza čelistí v souvislosti s celkovou léčbou bisfosfonáty – doporučení pro praxi. LKS. 2011;21(5):94–105.
7. Hauer L, Baxa J, Hrušák D, Hostička L, Andrle P. Využití zobrazovacích vyšetřovacích metod při diagnostice osteonekrózy čelistí vzniklé v souvislosti s léčbou bisfosfonáty. Prakt. zub. Lék. 2012;60(1):4-13.
8. Jambura J, Hauer L. Úrazy stálých zubů - praktické postupy pro diagnostiku a léčbu. LKS. 2012;22(6):134–141.
9. Hostička L, Andrle P, Hauer L, Pošta P. Sialoendoskopie. LKS. 2012;22(12):263-265.
10. Hauer L, Hrušák D, Jambura J, Hora M. Osteonekróza čelistí jako nežádoucí účinek léčby urologických onkologických pacientů. Ces Urol. 2013;17(2):88–99.

11. Hauer L, Kasl Z, Hrušák D, Hostička L, Andrle P, Tupý R. Záněty očnice odontogenní etiologie. LKS. 2014;24(2):34-40.
12. Hauer L, Hrušák D, Hostička L, Andrle P, Jambura J, Pošta P, Genčur J. Chirurgická terapie osteonekrózy čelistí způsobené léčivy. LKS. 2014;24(6):130 – 135.
13. Hrušák D, Hauer L, Vyskočil V. Osteonekróza čelisti – patogeneze, prevence, včasná diagnostika a efektivní léčba. Onkologická revue. 2015;Speciál:25-34.
14. Pošta P, Hauer L, Hrušák D, Hostička L, Andrle P, Jambura J, Genčur J. Problematika zubního ošetřování u pacientů léčených novými perorálními antikoagulancii. LKS. 2015;25(12):224 – 251.

Ostatní

1. Hauer L, Andrle P, Hrušák D, Hostička L, Šafránek J, Štěpán M, Vondráková A. Angina Ludovici odontogenní etiologie. LKS. 2012;22(10):210–215.
2. Andrle P, Hauer L, Hostička L, Hrušák D, Jambura J, Pošta P, Skálová A. Intraoseální mukoepidermoidní karcinom. Čes. Stomat. 2013;113(6):137-141.
3. Hauer L, Hrušák D, Hostička L, Andrle P, Jambura J, Pošta P, Genčur J. Chirurgická terapie bisfosfonátové osteonekrózy čelistí. LKS. 2014;24(7 – 8):154 –160.
4. Hauer L. Dentoalveolární chirurgie. Test 1: Nekrotizující sialometaplazie – léze imitující orální malignity. LKS. 2015;25(1):17-19.

5. Hauer L. Dentoalveolární chirurgie. Test 2: Neobvyklá komplikace extrakce zubu v horní čelisti. LKS. 2015;25(2):37-39.
6. Hauer L. Dentoalveolární chirurgie. Test 3: Aspergilom čelistní dutiny. LKS. 2015;25(3):61-63.
7. Hauer L. Dentoalveolární chirurgie. Test 4: Preprotetická chirurgie – alveoloplastika. LKS. 2015;25(4):79-81.
8. Hauer L. Dentoalveolární chirurgie. Test 5: Folikulární cysta. LKS. 2015;25(5):107-109.
9. Hauer L. Dentoalveolární chirurgie. Test 9: Nezhoubný nádor dutiny ústní – sialom patra. LKS. 2015;25(9):181 – 183.
10. Hauer L. Dentoalveolární chirurgie. Test 10: Zhoubný nádor dutiny ústní – spinocelulární karcinom jazyka. LKS. 2015;25(10):203 – 207.

Některé přednášky na odborných setkáních, které přednesl autor

1. Hauer L, Andrle P, Hostička L. Extraoseální odontom submandibulární krajiny. Pražské dentální dny 21.- 23. 10. 2009, Praha.
2. Hauer L, Jambura J, Hlavsa L. Periapikální cementooseální dysplazie. VI. Plzeňské pracovní dny 13. - 14. 11. 2009, Plzeň.
3., 4. Hauer L**,** Geigerová L, Andrle P. Cervikofaciální aktinomykóza. VI. Plzeňské pracovní dny 13.- 14. 11. 2009, Plzeň + Večer Stomatologické kliniky, Spolek lékařů v Plzni ČLS JEP 16. 12. 2009
5., 6. Hauer L, Hostička L, Andrle P. Závažné komplikace kolemčelistních zánětů. VI. Plzeňské pracovní dny 13.- 14. 11. 2009, Plzeň + Večer

Stomatologické kliniky, Spolek lékařů v Plzni ČLS JEP 16. 12. 2009
7., 8. Hauer L, Jambura J, Hostička L, Andrle P, Vyskočil V, Waloschek T. Fibrózní dysplazie čelistí, VII. Plzeňské pracovní dny, 5. – 6. 11. 2010, Plzeň + Večer Stomatologické kliniky, Spolek lékařů v Plzni ČLS JEP 1. 12. 2010
9. Hauer L, Hrušák D, Hostička L, Andrle P, Jambura J, Pošta P. Cervikofaciální aktinomykóza, XX. Jihočeské ORL dny, 28. – 29. 4. 2011, České Budějovice.
10. Hauer L, Hostička L, Andrle P, Jambura J. Bisfosfonátová osteonekróza mandibuly 3. stádia - případ úspěšné konzervativní terapie. Pražské dentální dny 2011, 12. – 14. 10. 2011, Praha.
11., 12. Hauer L, Hrušák D, Hostička L, Andrle P, Jambura J, Pošta P. Dlaždicobuněčný karcinom retní červeně. VIII. Plzeňské pracovní dny, 25. – 26. 11. 2011, Plzeň + Večer Stomatologické kliniky, Spolek lékařů v Plzni ČLS JEP 30. 11. 2011
13. Hauer L, Hrušák D, Jambura J, Hostička L, Andrle P, Pošta P. Extranodální difuzní velkobuněčný B-lymfom orofaciální krajiny. XV. Olomoucké onkologické dny, 9. – 10. 2. 2012., Olomouc.
14. Hauer L., Jambura J., Pošta P. Komplikace při ošetřování pacienta po radioterapii hlavy a krku. Konference stomatologů Úsměv 12, 23.- 24. 3. 2012, Olomouc.
15. Hauer L, Hrušák D. Bisfosfonátová osteonekróza čelistí 3. stádia jako komplikace léčby GIOP u pacientů s revmatoidní artritidou. X. Celostátní konference sekundární osteoporóza SMOS ČLS JEP, 13.- 15. 4. 2012, Plzeň.

16. Hauer L, Jambura J, Andrle P, Skálová A. Angioleiomyom – vzácný nádor dutiny ústní. Pražské dentální dny 2012, 3. – 5. 10. 2012, Praha.
17. Hauer L, Hrušák D, Hostička L, Andrle P, Jambura J, Pošta P. Osteonekróza čelistí v souvislosti s lécbou bisfosfonáty u onkologických i osteologických pacientů – 37 případů. Večer Stomatologické kliniky, Spolek lékařů v Plzni ČLS JEP 31. 10. 2012
18. Hauer L, Pošta P, Hostička L. Chronická toxicita radioterapie v oblasti hlavy a krku z pohledu stomatologa IX. Plzeňské pracovní dny, 23. – 24. 11. 2012, Plzeň.
19. Hauer L, Hrušák D, Hostička L, Andrle P, Jambura J, Pošta P. Osteonekróza čelistí u pacientů léčených perorálními bisfosfonáty pro osteoporózu. Vinohradské stomatologické dny, 11. - 13. 4. 2013, Praha.
20. Hauer L, Jambura J, Andrle P, Skálová A, Hostička L. Nekrotizující sialometaplazie – léze imitující orální malignity. Pražské dentální dny 2013, 9. – 11. 10. 2013, Praha.
21. Hauer L, Hrušák D, Pošta P, Hostička L, Andrle P, Jambura J. Drug-related osteonecrosis of the jaw - Retrospective Case Series, 10. česko-polsko-slovenské trilaterální sympozium orální a maxillofaciální chirurgie a 2. národní kongres Společnosti maxillofaciální chirurgie, 7. 11. - 9. 11. 2013, Velké Karlovice.
22., 23. Hauer L, Kasl Z, Hrušák D, Hostička L, Andrle P, Tupý R. Záněty očnice odontogenní etiologie, X. Plzeňské pracovní dny, 29. – 30. 11. 2013, Plzeň + Večer Stomatologické kliniky, Spolek lékařů v Plzni ČLS JEP 4.12.2013
24. Hauer L, Hrušák D, Hostička L, Andrle P, Jambura J, Pošta P, Genčur J. Chirurgická léčba osteonekrózy čelistí

způsobené léčivy, Postgraduální lékařské dny 2014, 4. – 6. 2. 2014, Plzeň.
25. Hauer L. Chirurgická léčba bisfosfonátové osteonekrózy čelistí. XI. Celostátní konference sekundární osteoporóza, 10. 4. – 12. 4. 2014, Plzeň.
26., 27. Hauer L**,** Hrušák D, Andrle P, Hostička L, Jambura J, Pošta P, Genčur J. Dermoidní a epidermoidní cysty ústní spodiny, XI. Plzeňské pracovní dny, 21. – 22. 11. 2014, Plzeň + Večer Stomatologické kliniky, Spolek lékařů v Plzni ČLS JEP 10. 12. 2014
28. Hauer L, Hrušák D, Vyskočil V, Jambura J, Hostička L, Andrle P, Pošta P, Genčur J. Závažná komplikace osteonekrózy maxilly způsobené léčivy. XVIII. Mezinárodní kongres českých a slovenských osteologů, 10. - 12. 9. 2015, Brno.
29. Hauer L, Hrušák D, Genčur J, Hostička L, Jambura J, Pošta P, Andrle P. Využití stopkatého tvářového tukového laloku při léčbě osteonekróz maxily různé etiologie. Pražské dentální dny, 8. - 9. 10. 2015, Praha.
30. Hauer L, Hrušák D, Hostička L, Andrle P, Jambura J, Pošta P, Genčur J. Léčba osteonekrózy čelistí způsobené léčivy - chirurgický protokol Stomatologické kliniky LF UK a FN v Plzni. XII. Plzeňské pracovní dny, 4.- 5. 12. 2015, Plzeň.
31. Hauer L, Hrušák D, Hostička L, Andrle P, Jambura J, Pošta P, Genčur J. Chirurgická léčba recidivující luxace temporomandibulárního kloubu. Večer Stomatologické kliniky, Spolek lékařů v Plzni ČLS JEP 2. 12. 2015
32. Hauer L, Hrušák D, Andrle P, Hostička L, Skálová A, Pošta P, Sebera O. Adenoidně cystický karcinom slinných žláz. XIX. Olomoucké onkologické dny, 11.- 12. 2. 2016, Olomouc.