

Univerzita Karlova

Lékařská fakulta v Plzni

Šiklův ústav patologie



Doktorská disertační práce

Obor Patologie

**Korelace imunohistochemických a molekulárně
biologických metod v diagnostice nádorů slinných žláz**

Školitelka: prof. MUDr. Alena Skálová, CSc.

Plzeň 2019

MUDr. Markéta Horáková

(roz. Miesbauerová)

Abstrakt

Doktorská disertační práce se zabývá korelací morfologického, imunohistochemického a molekulárně-genetického nálezu v maligních nádorech slinných žláz. V první části jsou shrnuty současné poznatky týkající se salivárních malignit. V druhé části je prezentován vlastní výzkum.

Druhá polovina disertační práce se týká přímo výsledků vlastního výzkumu a je rozdělena do tří částí. V první části je představena metoda „dvoustupňového screeningu“ maligních nádorů, který má za cíl nalézt nové, doposud nepopsané genové aberace se zaměřením na zhoubné nádory slinných žláz. Tato metoda probíhá ve dvou na sebe navazujících krocích, kdy je materiál nejdříve vyšetřen imunohistochemicky směsí protilátek nespécificky detekujících aberace v genech *NTRK1-3*, *ALK* a *ROS1*. Pozitivní případy jsou dále podrobeny vysoce senzitivnímu i specifickému molekulárně-genetickému vyšetření metodou masivního paralelního sekvenování s použitím Archer kitu.

V druhé části výsledků je vypracován postup pro cytologickou diagnostiku sekrečního karcinomu slinných žláz z tenkojehlové aspirace (FNA). V této části je detailně popsána cytomorfologie sekrečního karcinomu v nátěrech obarvených dle Papanicolaoua i v cytobloku, ze kterého jsou následně provedena doplňková imunocytochemická a genetická vyšetření. Výsledky dostupných vyšetření jsou dány do kontextu s kategorizací dle Milánského systému. Dále byl navržen základní vyšetřovací panel protilátek, jehož výsledky podporují diagnózu sekrečního karcinomu.

V poslední části jsou pak krátce komentovány tři publikované články, které se přímo týkají tématu práce. Jeden prvoautorský článek publikovaný v recenzovaném časopise pojednává o přínosu Milánského systému reportování do rutinní cytologické praxe. Dále jsou komentovány dva spoluautorské články. První se týká dvou případů sekrečního karcinomu dutiny nosní. Druhý článek popisuje tři případy světlobuněčného karcinomu, u kterých byla objevena nová genová translokace *EWSR1-CREM*.

Summary

This doctoral thesis is dealing with the correlation of morphological, immunohistochemical and genetical findings in malignant tumors of salivary glands. The first half of the thesis comprises the summary of current knowledge about salivary malignancies. The second half is presenting the research itself.

The research results are divided into three parts. The first part is presenting the method of “2-step diagnostic test” of malignant tumors. This screening test aims to find new, so far not described gene aberrations with a focus on malignant tumors of salivary glands. This method takes place in two consecutive steps. In the first step the material is examined by an immunohistochemical mixture of antibodies, which non-specifically detects aberration in the genes *NTRK1-3*, *ALK* and *ROS1*. In the second step all positive cases are subjected to highly sensitive and specific molecular-genetic examination by the method of next generation sequencing (NGS) using the Archer kit.

In the second part of the work there has been designed the approach to the cytological diagnosis of salivary secretory carcinoma by the fine-needle aspiration (FNA). This part is describing to the details the cytomorphology of secretory carcinoma in both, Pap smears and cell blocks, from which additional immunocytochemical and genetic examinations are performed. The results of available examinations are put into context with the categorization according to the Milan system. Furthermore, we have designed a basic antibody screening panel. Its results support the diagnosis of secretory carcinoma.

The last part comprises shortly commented three articles, which are directly related to the topic of the thesis. One first-authored article published in a reviewed journal is describing the contribution of the Milan reporting system to the routine cytology practice. There are another two co-authorial articles. The first one is concerning two cases of secretory carcinoma of the nasal cavity. Second article is describing three cases of clear cell carcinoma harboring a newly discovered *EWSR1-CREM* gene translocation.

Poděkování

Velký dík patří především mé školitelce a dlouholeté mentorce prof. MUDr. Aleně Skálové CSc., za její odborné vedení, rady, konzultace a čas, který mi věnovala již od studijních let a za možnost nahlédnout do společnosti nejvýznamnějších světových patologů. Kolektivu Biopstické laboratoře s.r.o. a Šiklova ústavu patologie za spolupráci. Dále bych chtěla poděkovat doc. MUDr. Ivaně Kholové, Ph.D. za vedení během zahraniční stáže ve Finsku a za příjemnou kooperaci v odvětví cytologie slinných žláz a samozřejmě mému manželovi za trpělivost, podporu a porozumění.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem disertační práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání žádného jiného titulu. Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi Univerzity Karlovy LF Plzeň.

Obsah

Abstrakt	1
Summary	2
Poděkování	3
Prohlášení.....	3
Obsah.....	4
Seznam použitých zkratk	6
Cíle disertační práce	9
1. Úvod	10
2. Obecná specifikace nádorů slinných žláz	14
2.1. Epidemiologie	14
2.2. Klinické příznaky	20
2.3. Diagnostika	21
2.3.1. Zobrazovací metody	21
2.3.2. Cytologické vyšetření.....	23
2.3.2.1. Interpretace cytologických nálezů: The Milan System for Reporting Salivary Gland Cytopathology	24
2.3.3. Biopsické vyšetření	25
2.4. Histologické typy nádorů slinných žláz.....	27
2.5. Genetické profily vybraných nádorů slinných žláz	50
2.6. WHO klasifikace & staging.....	51
2.6.1. Staging nádorů slinných žláz.....	51
2.7. Léčba.....	54
3. Vlastní výzkum.....	59
3.1. Specifický dvoustupňový screening rekurentních translokací karcinomů slinných žláz	60
3.1.1. Cíle	60
3.1.2. Materiál a metodika	60
3.1.3. Výsledky.....	65
3.1.4. Diskuze.....	70
3.2. Imunocytochemická a molekulárně genetická korelace v cytologické diagnostice sekrečního karcinomu slinných žláz a její vliv na interpretaci nálezů v souvislosti s Milánskou klasifikací ..	95
3.2.1. Cíle	95
3.2.2. Materiál a metodika	95
3.2.3. Výsledky.....	99

3.2.4. Diskuze.....	102
3.3. Další publikované práce přímo se týkající tématu	105
3.3.1. Nový systém pro sjednocené hodnocení tenkojehlových aspiračních cytologií slinných žláz: Co nového přinesl tzv. „Milánský systém reportování“ do cytodiagnostiky lézí slinných žláz?	105
3.3.2. Significance of 1p36 locus deletion in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands.	111
3.3.3. Molecular profiling of hyalinizing clear cell carcinomas revealed a subset of tumors harboring a novel EWSR1-CREM fusion: report of three cases	123
4. Další publikované práce	132
5. Použitá literatura.....	134
6. Přílohy.....	167

Seznam použitých zkratek

Aj.	a jiné
ACC	<i>acinic cell carcinoma</i> , acinický karcinom
ADC	<i>adenoid cystic carcinoma</i> , adenoidně-cystický karcinom
ASR-W	<i>worldage-standardized rate</i> , světová věkově standardizovaná incidence/mortalita
Atd.	a tak dále
Ca	<i>carcinoma</i> , karcinom
CCC	<i>clear-cell carcinoma</i> , světlobuněčný karcinom
CK	cytokeratin
CNB/CCB	<i>core needle/cut biopsy</i> , core-cut biopsie
CT	<i>computed tomography</i> , výpočetní tomografie
ČR	Česká republika
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> , úřad pro kontrolu potravin a léčiv
FFPE	<i>formalin-fixed, paraffin embedded</i> , formalínem fixovaná, v parafínu zalitá tkáň
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace
FN	Fakultní nemocnice
FNAB/FNAC	<i>fine-needle aspiration biopsy/ cytology</i> , tenkojehlová aspirační biopsie/ cytologie
GCO	<i>Global Cancer Observatory</i>
HE	barvení hematoxylin - eosin
Her-2/neu	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HGT	<i>high-grade</i> transformace, dediferenciace
HG	high-grade
HPF	<i>high power field</i>

ICC	imunocytochemie
ICD-O	<i>International Classification of Diseases for Oncology</i>
IDC	<i>invasive ductal carcinoma</i> , invazivní duktální karcinom
IG	intermediate-grade
IHC	imunohistochemie
ITAC	<i>intestinal-type adenocarcinoma</i> , intestinální typ sinonazálního adenokarcinomu
CHT	chemoterapie
LG	low-grade
LU, LN	lymfatické uzliny
MASC	<i>mammary-analogue secretory carcinoma of salivary glands</i> , sekreční karcinom mamárního typ
MEC	<i>mucoepidermoid carcinoma</i> , mukoepidermoidní karcinom
MIB	index proliferační aktivity
MR, MRI	<i>magnetic resonance imaging</i> , magnetická rezonance
MSRSGC	<i>The Milan System for Reporting Salivary Gland Cytopathology</i> , Milánský systém reportování cytologií slinných žláz
NGS	<i>next-generation sequencing</i> , Masivní paralelní sekvenování
NOS	<i>not otherwise specified</i> , blíže nespecifikovaný
PAS	<i>Periodic acid Schiff</i>
PET	pozitronová emisní tomografie
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , polymerázová řetězová reakce
RNA	kyselina ribonukleová
RT-PCR	<i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>
RTU	<i>ready to use</i> , připraveno k použití
SC	<i>secretory carcinoma</i> , sekreční karcinom
SDC	<i>salivary duct carcinoma</i> , salivární duktální karcinom
SqCC	<i>squamous cell carcinoma</i> , dlaždicobuněčný karcinom
SMA	<i>smooth muscle actin</i> , hladkosvalový aktin

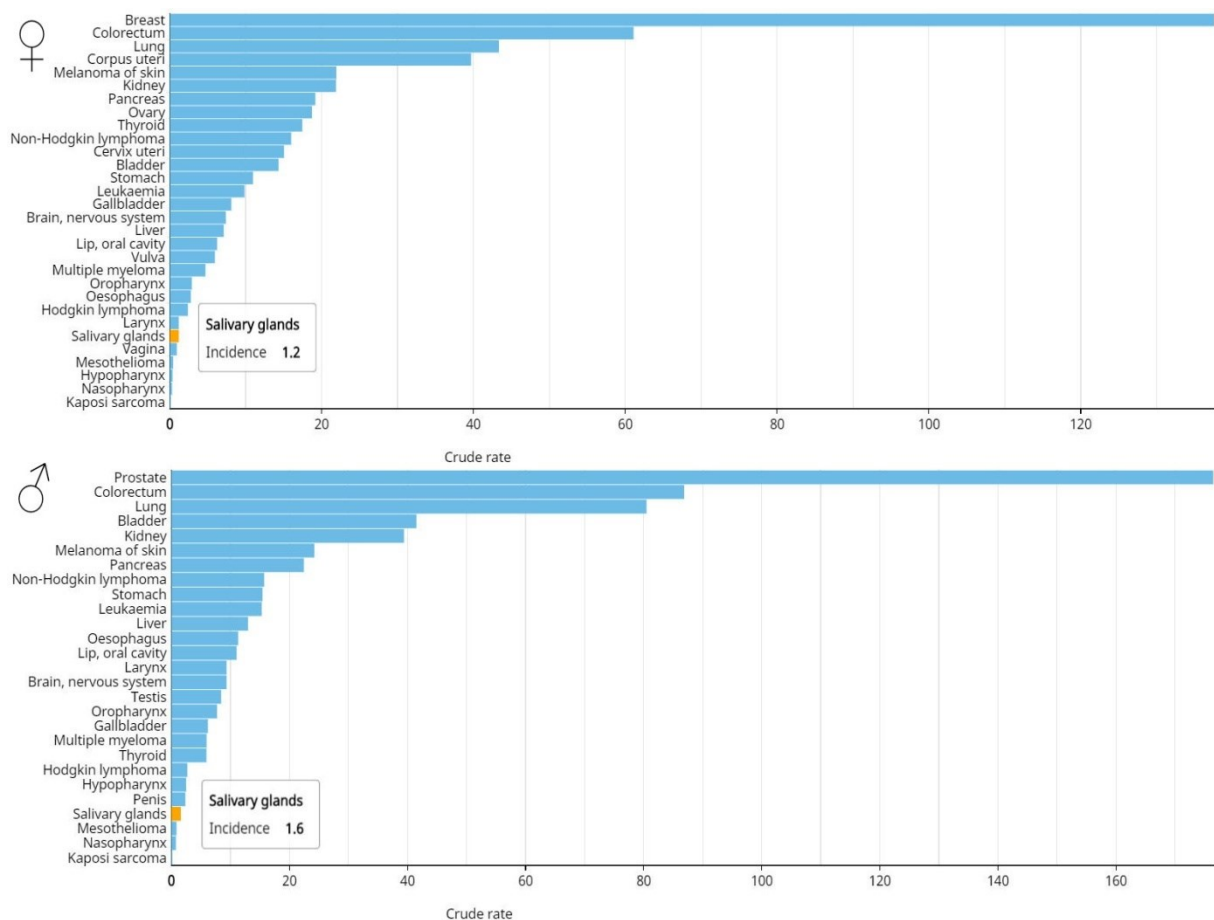
SNAC	<i>sinonasal adenocarcinoma</i> , sinonazální adenokarcinom
SŽ	slinná žláza
TNM klasifikace	<i>tumor-node-metastasis</i> klasifikace
UICC	<i>The Union for International Cancer Control</i>
USG	ultrasonografie
ÚZIS	Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR
WHO	<i>World Health Organization</i> , Světová zdravotnická organizace
ZN	zhoubný novotvar

Cíle disertační práce

- Pomocí dvoustupňové screeningové metody hledat nové genové aberace v karcinomech slinných žláz.
- Korelovat cytomorfolonii sekrečního karcinomu slinných žláz s histomorfologií a molekulárně-genetickým profilem.
- Nalézt vhodný základní imunocytochemický panel protilátek podporující diagnózu sekrečního karcinomu z tenkojehlové aspirační cytologie.
- Aplikovat molekulárně-genetické metody v cytologii slinných žláz.
- Kategorizovat výsledky tenkojehlové aspirační cytologie sekrečního karcinomu slinných žláz podle nového Milánského systému v závislosti na dostupných pomocných vyšetřeních.

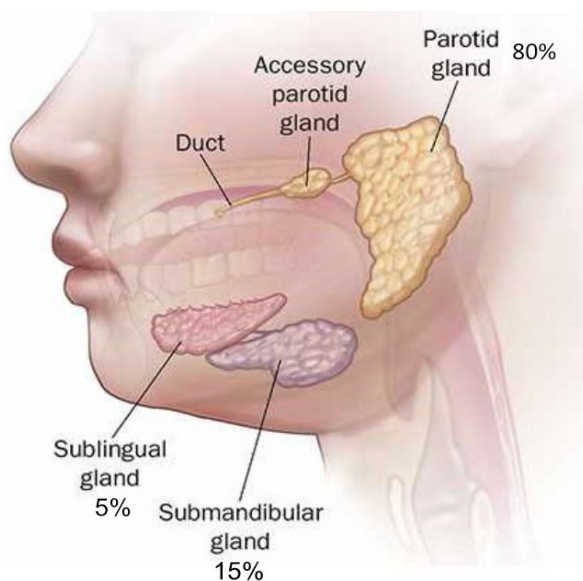
1. Úvod

Nádory slinných žláz jsou vzácné, představují méně než 1 % všech malignit a na žebříčku incidence nejčastějších malignit jsou celosvětově na 25. místě u mužů a na 24. místě u žen. Tento žebříček kopíruje i stav v České republice, kde jak u žen, tak u mužů jsou malignity slinných žláz na 24. místě (obrázek 1) (1). Přestože jsou nádory slinných žláz vzácné, představují velmi problematickou skupinu nádorových jednotek. Jedná se o velmi heterogenní skupinu onemocnění se značně variabilním histologickým nálezem. Histomorfologické a imunohistochemické znaky se totiž v četných nádorových jednotkách vzájemně překrývají, což komplikuje jejich diagnostiku. Nádory slinných žláz jsou charakteristické především svou morfologickou variabilitou, která se může projevovat i v rámci jednoho tumoru, kdy se různá místa novotvaru strukturálně liší, což znesnadňuje diagnostiku především z probatorních excizí.



Obrázek 1 – Incidence a pořadí jednotlivých onkologických diagnóz u českých žen a mužů za rok 2018. (Zdroj: Global Cancer Observatory)

Většina nádorů vychází z velkých slinných žláz (obrázek 2): Až 80 % vzniká v příušní žláze, 15 % v podčelistní žláze a zbylých 5 % v podjazykové a v malých slinných žlázách, které jsou rozptýleny v dutině ústní a horním aerodigestivním traktu (2). Až v 75 % případů se jedná o nádory benigní. Se snižující se velikostí žlázy, se zvyšuje riziko vzniku malignity, které s velikostí žlázy obráceně koreluje. To znamená, že zatímco u nádorů vznikajících z malých slinných žláz a sublingvální žlázy je riziko malignity 50–81 %, u submandibulární žlázy je to 40–50 % a u nádorů vycházejících v příušní žlázy je riziko malignity pouze 20–25 % nádorů (3).



Obrázek 2 – Topografická anatomie velkých slinných žláz a procentuální vyjádření výskytu nádorů v jednotlivých slinných žlázách.

Naprostá většina nádorů se vyskytuje unilaterálně a unilokulárně. Bilaterální a multicentrický výskyt je častý pro benigní Warthinův tumor, který představuje až 70 % všech bilateralit slinných žláz. Z maligních nádorů byly popsány případy oboustranného acinického karcinomu (4).

Primární nádory slinných žláz jsou v naprosté většině epitelálního původu. Jen velmi raritně jsou diagnostikovány nádory mezenchymální a hematologické. Z benigních měkkotkáňových nádorů se vyskytují především hemangiomy, lipomy a schwannomy. Sarkomy a jiné maligní měkkotkáňové tumory jsou pak extrémně vzácné a je nutné je odlišit od jiných sarkomatoidně vyhlížejících malignit (5). Z hematologických malignit se pak

setkáváme častěji s primárním postižením ne Hodgkinsonskými lymfomy z B-buněk. Konkrétně se pak nejčastěji vyskytuje extranodální lymfom z B-buněk marginální zóny, tzv. MALT lymfom, který vzniká především v terénu Sjögrenova syndromu (6, 7). Metastatické sekundární nádory slinných žláz představují zhruba 5 %. Naprostá většina metastáz je lokalizována v příušní žláze a až v 80 % je primární nádor nalezen v oblasti hlavy a krku. Opačně je tomu v případě submandibulární žlázy, kde až 85 % metastáz pochází odjinud než z oblasti hlavy a krku a prognosticky jsou závažnější než metastázy parotické. Do slinných žláz však může metastazovat prakticky každý nádor tvořící vzdálené metastázy. Nejčastěji jsou přítomny metastázy dlaždicobuněčných karcinomů kůže a z oblasti horního aerodigestivního traktu, dále pak maligního melanomu či nádory mající primární origo v prsu, plicích nebo ledvinách (8, 9, 10, 11). Určení primárního origa bez použití imunohistochemického vyšetření je v některých případech prakticky nemožné, což platí dvojnásob především při cytologickém vyšetření nádoru (12).

Příčiny vzniku nádorů slinných žláz nejsou zcela přesně objasněny. Jednoznačně byl prokázán pouze vliv ionizačního záření na vznik malignity obecně a kouření tabákových výrobků na vznik benigního Warthinova tumoru (13). Dále byl popsán endemický výskyt lymfoepiteliálního karcinomu slinných žláz v souvislosti s infekcí Epstein-Barrové virem (EBV), která je rozšířená především v Asii (14, 15). Jinak se mezi rizikové faktory vzniku nádorů této lokality uvádějí noxy mající kauzální souvislost obecně se vznikem všech nádorů. Jsou jimi vyšší věk, životní styl, strava či expozice nejrůznějším chemikáliím. Poměrně hojně debatovaná byla i souvislost vzniku zhoubného nádoru slinných žláz s dlouhodobým používáním mobilních telefonů, ani to se však neprokázalo (16).

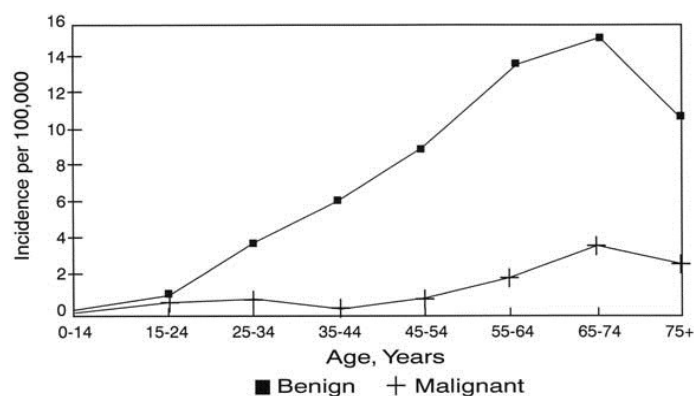
Z hlediska prognózy, jsou určujícími faktory především klinické stadium, dále lokalizace a histologický typ nádoru a přítomnost či nepřítomnost různých genových aberací. Obecně mají horší prognózu malignity lokalizované v submandibulární žláze, neboť je zde vyšší incidence recidiv a metastáz než pro histologicky stejné nádory lokalizované v příušní žláze (17). Pětileté přežití od doby první diagnózy maligního nádoru slinných žláz je 72 %. Toto číslo se však mění v závislosti na histologickém typu a pokročilosti nádoru v době diagnózy. Pro stage I je pětileté přežití až 91 %, pro stage II 75 % a pro pokročilá stadia stage III a IV je pětileté přežití v rozmezí 39–65 % (18). Méně než polovina (43 %) případů je diagnostikována ve stadiu I nebo II, tedy v časném stadiu, kdy se nádor nešíří mimo

parenchym žlázy. Z histologického hlediska se maligní nádory dále dělí do tří základních kategorií: low-grade (LG), intermediate-grade (IG) a high-grade (HG). Prognóza pro LG maligní nádory je excelentní a až 93 % pacientů přežívá 10 let od první diagnózy. Naproti tomu 10 let od první diagnózy HG malignity přežívá méně než polovina pacientů. Pro nádory z kategorie IG je desetileté přežití 61 %.

2. Obecná specifikace nádorů slinných žláz

2.1. Epidemiologie

Zhoubné nádory slinných žláz jsou velmi vzácné. Podle nejnovějších statistik Global Cancer Observatory (GCO) (1) bylo v roce 2018 nově diagnostikováno 18 078 957 zhoubných nádorů, z toho 52 799 pocházelo ze slinných žláz (ICD-O kódy C07 a C08), což představuje pouze 0,3 % a v podskupině malignit oblasti hlavy a krku je to 3-5 %. Více než polovina maligních nádorů (51,8 %) byla diagnostikována v Asii, v Evropě to byla téměř pětina případů (18 %). V důsledku tohoto onemocnění zemřelo celosvětově 22 176 (42 %), opět nejvíce v Asii (56,3 %). Bez ohledu na pohlaví a věk bylo v rámci Evropy za rok 2018 diagnostikováno 9 487 nových případů ZN slinných žláz, v důsledku této nemoci zemřelo 4 035 pacientů a prevalence byla 24 890 nemocných, kteří žijí s tímto onemocněním déle než 5 let. Nejvyšší incidence ZN slinných žláz je ve Švédsku, kde dosahuje až 4,9 nových případů na 100 000 obyvatel. Nádory slinných žláz se mohou vyskytovat v každém věku včetně dětského, avšak nejvíce jsou diagnostikovány pacientům ve vyšších věkových kategoriích. Benigní nádory jsou nejčastěji diagnostikovány v 5. a 6. dekádě, zatímco maligní nádory jsou častější ve vyšší věkové kategorii, mezi 6. a 7. dekadou (obrázek 3). Průměrný věk, kdy je malignita slinných žláz diagnostikována, je 64 let (18).

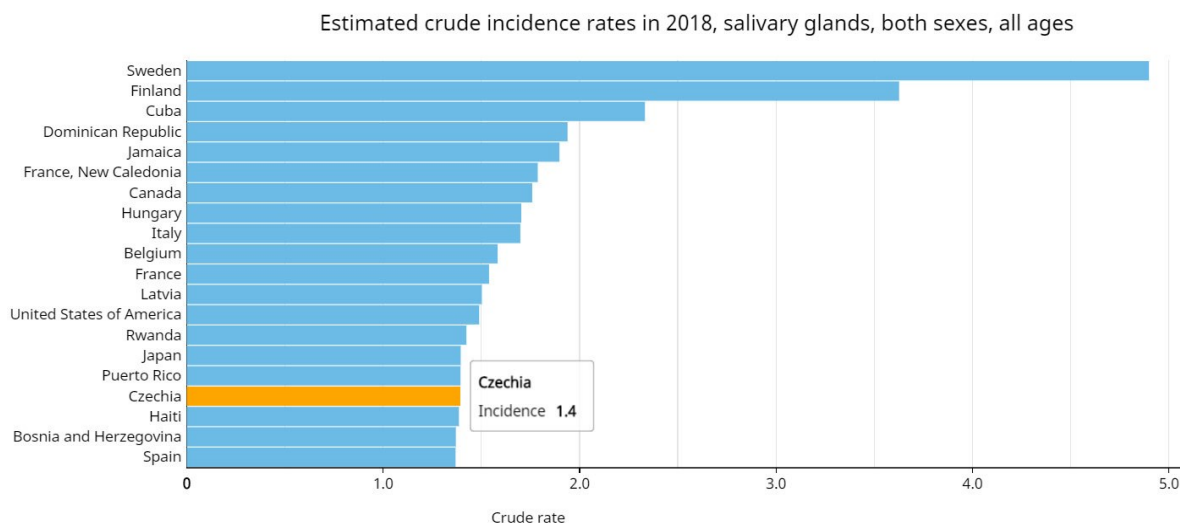


Obrázek 3 – Graf incidence benigních a maligních nádorů slinných žláz v souvislosti s věkem.

Celkově bylo v České republice podle GCO v roce 2018 diagnostikováno 65 456 nových zhoubných onemocnění různých lokalizací, což odpovídá incidenci 616 nových případů na 100 000 obyvatel (684 na 100 000 mužů, 550 na 100 000 žen). Tato čísla řadí ČR

na 19. místo na světě z hlediska incidence výskytu všech maligních novotvarů včetně nemelanomových zhoubných nádorů kůže. Mortalita v roce 2018 činila 26 980 úmrtí, což odpovídá 253 zemřelým na 100 000 obyvatel ČR (284 na 100 000 mužů, 224 na 100 000 žen) (1).

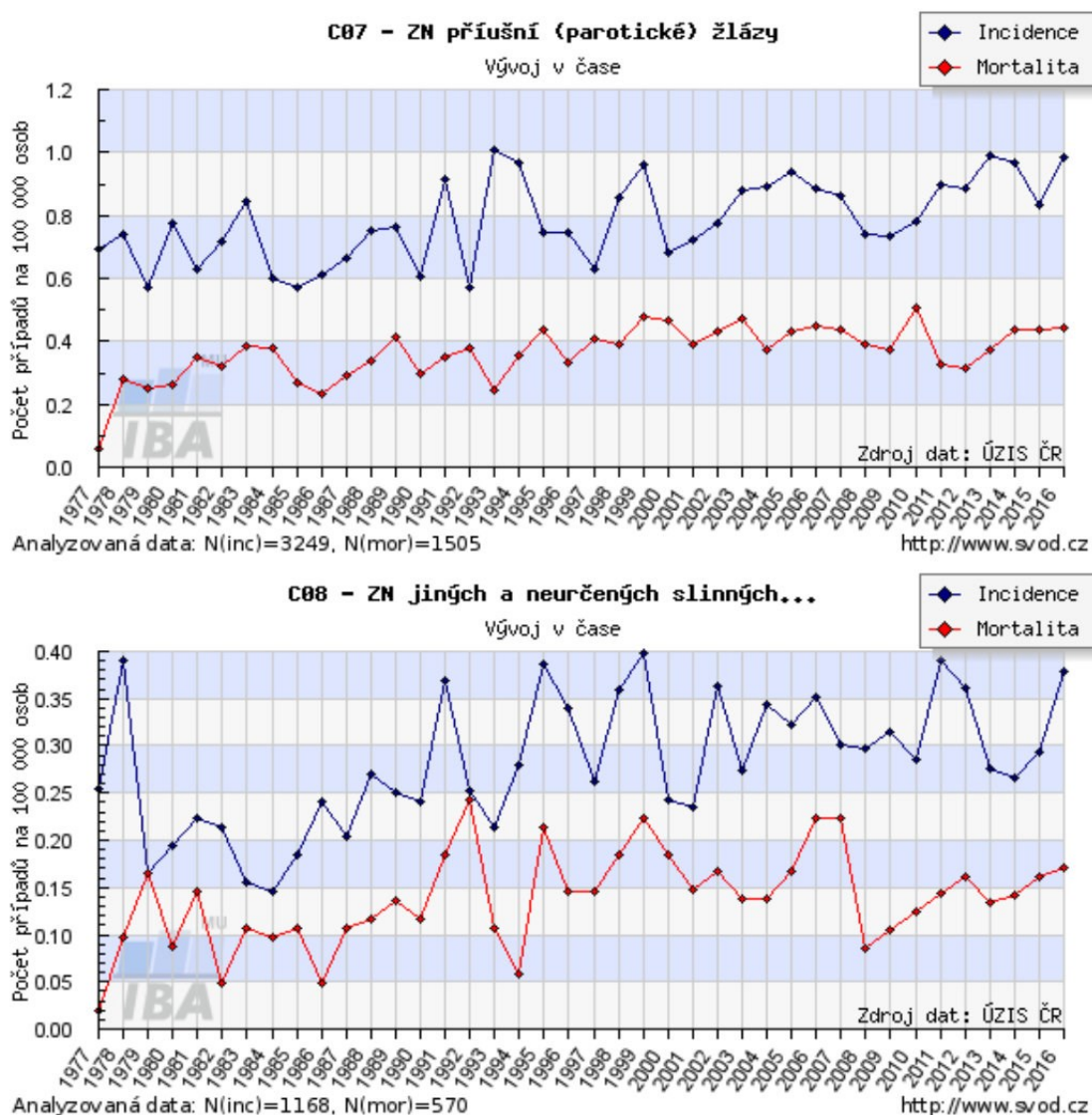
Incidence zhoubných novotvarů slinných žláz je v České republice 17. nejvyšší ve světě a 8. v Evropě (obrázek 4). V ČR bylo za minulý rok 2018 podle GCO diagnostikováno 148 nových případů ZN slinných žláz, přičemž 84 případů byli muži a 64 případů byly ženy. Incidence se souhrnně pohybuje okolo 1,4 nových případů na 100 000 obyvatel za rok (1,6 na 100 000 mužů, 1,2 na 100 000 žen). Zhoubné novotvary slinných žláz se lehce častěji vyskytují u mužů než u žen. Incidence přepočítaná na celosvětový věkový standard (ASR-W) je 0,66 na 100 000 obyvatel a mortalita přepočítaná na celosvětový průměr je 0,24 na 100 000 obyvatel (1).



Obrázek 4 – Žebříček států s nejvyšší incidencí maligních nádorů slinných žláz. (Zdroj: Global Cancer Observatory)

Z posledních údajů Ústavu zdravotnických informací a statistiky ČR (ÚZIS), které jsou dostupné z roku 2016, je patrné, že incidence ani mortalita nezaznamenala větších výkyvů v časové ose (19). Data jsou dostupná pro ZN parotické slinné žlázy (C07) a ostatních slinných žláz (C08) separátně. Podle nejaktuálnějších údajů ÚZIS byla za rok 2016 incidence pro diagnózu ZN parotické žlázy (C07) 0,98 na 100 000 obyvatel a mortalita činila 0,44 na

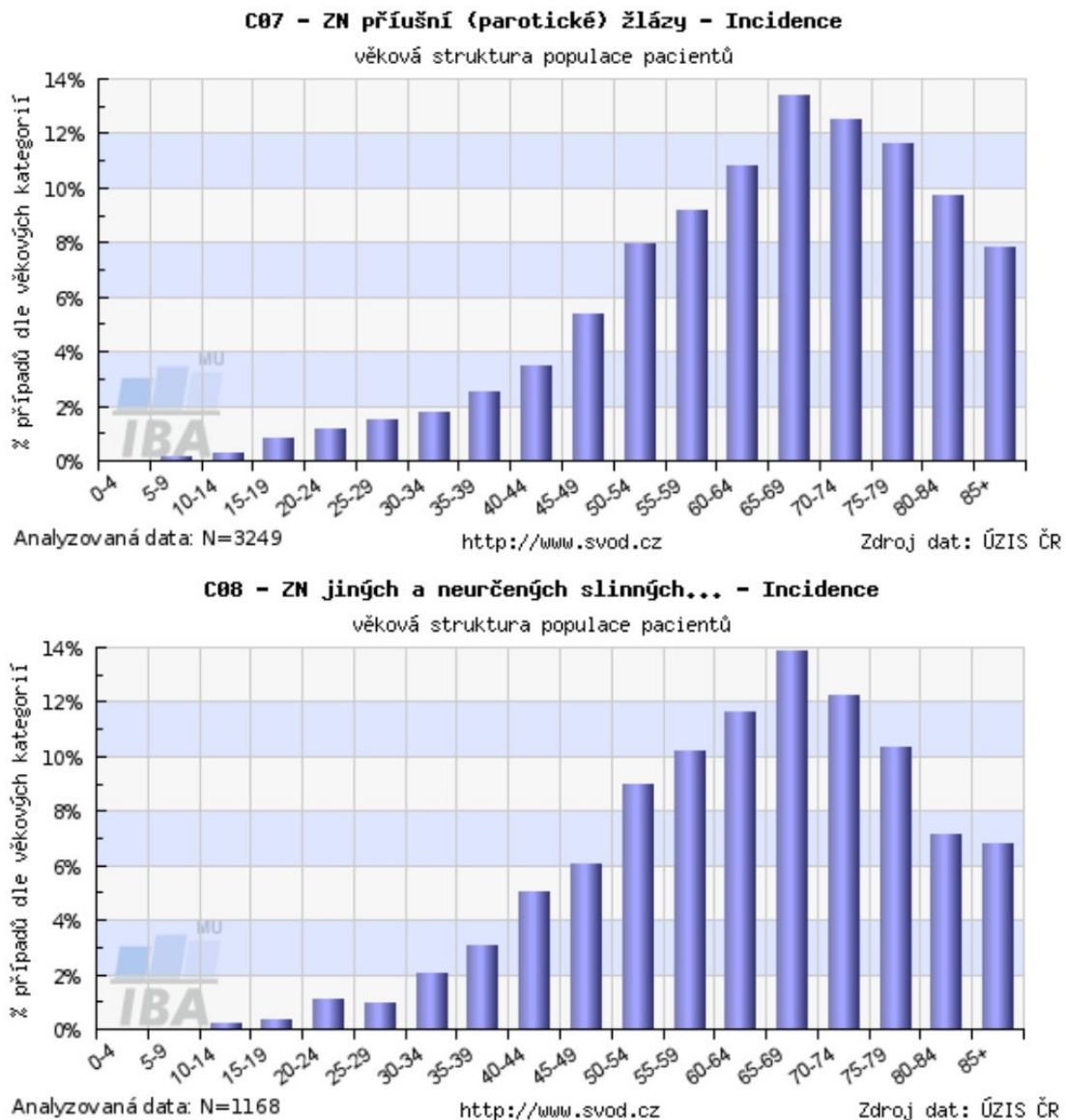
100 000 obyvatel. Pro ZN jiných a neurčených slinných žláz (C08) byla incidence 0,38 na 100 000 obyvatel a mortalita činila 0,17 úmrtí na 100 000 obyvatel (obrázek 5). V absolutních číslech to reprezentuje 104 případů ZN parotické žlázy a 40 případů ZN jiných a neurčených slinných žláz (19).



Obrázek 5 – Incidence a mortalita ZN slinných žláz v ČR mezi lety 1977 a 2016. (Zdroj: ÚZIS)

Věková struktura pacientů se ZN parotické žlázy i ostatních slinných žláz je téměř identická (obrázek 6). Riziko vzniku ZN slinných žláz stoupá s věkem. Více než polovina případů se vyskytuje ve věkové skupině 60 až 84 let pro ZN parotis (C07). Pro ZN jiných slinných žláz (C08) se více než polovina případů vyskytuje ve věkové skupině o 5 let mladších

pacientů, tedy 55 až 79 let. Maximum výskytu je u obou diagnóz ve věku 65–69 let, kdy je diagnostikováno téměř 14 % všech případů, poté incidence opět klesá. V dětském věku je výskyt ZN slinných žláz vzácný. V ČR bylo zaznamenáno 6 případů maligního novotvaru parotické žlázy u dětí mladších 10 let. V této věkové kategorii nebyl v ČR zaznamenán žádný případ ZN ostatních slinných (19).



Obrázek 6 – Věková struktura pacientů se ZN slinných žláz v ČR. (Zdroj: ÚZIS)

Souhrnná epidemiologická data týkající se zhoubných novotvarů slinných žláz jsou uvedena v tabulce 1 (tabulka 1).

Parametr	
Incidence	
Celkový počet salivárních ZN diagnostikovaných v roce 2018	52 799
Počet ZN na 100 000 obyvatel ve světě	0,69
Počet ZN na 100 000 obyvatel v Evropě	1,3
Počet ZN na 100 000 obyvatel v ČR	1,4
Pořadí ČR z hlediska výskytu ZN slinných žláz: celosvětově/v Evropě	17./8.
ASR (World)	0,66
Pořadí ZN slinných žláz mezi všemi ZN	30.
Mortalita	
Celkový počet zemřelých v souvislosti s ZN slinných žláz v roce 2018	22 176
Počet úmrtí na 100 000 ve světě	0,29
Počet úmrtí na 100 000 v Evropě	0,54
Počet úmrtí na 100 000 v ČR	0,56
Pořadí ČR z hlediska mortality: celosvětově/v Evropě	20./15.
ASR (World)	0,24
Pořadí mezi ZN jako příčina úmrtí v roce 2018	30.
Prevalence (pacienti žijící 5 let od diagnózy ZN slinných žláz)	
Celkový počet pacientů žijících s diagnózou ZN slinných žláz v roce 2018	123 460
Počet pacientů žijících s diagnózou ZN slinných žláz v roce 2018 v Evropě	24 890
Počet pacientů žijících s diagnózou ZN slinných žláz v roce 2018 v ČR	393

Tabulka 1 – Souhrnná epidemiologická data týkající se ZN slinných žláz. (Zdroj: Global Cancer Observatory)

Incidenci jednotlivých histologických typů nádorů slinných žláz je obtížné stanovit přesně, protože výsledky různých studií přicházejí s odlišnými údaji v závislosti na zeměpisné poloze a rase (tabulka 2). Dle WHO 2017 je nejčastějším zhoubným novotvarem velkých i malých slinných žláz mukoepidermoidní karcinom, který představuje 30–35 % všech zhoubných nádorů slinných žláz. Mukoepidermoidní karcinom je též nejčastějším maligním nádorem dětského věku a vyskytuje se nejčastěji ve skupině nemocných, kteří byli v dětském věku vystaveni kombinaci chemoterapie a radioterapie (20, 21). Na dalších pozicích je z hlediska výskytu zhoubných novotvarů slinných žláz adenoidně cystický karcinom (20 %),

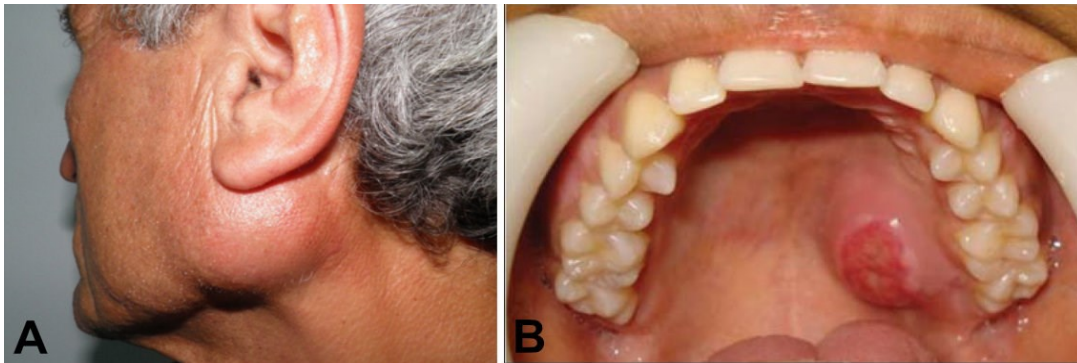
karcinom ex pleomorfní adenom (10–15 %), polymorfní adenokarcinom (10–15 %) a acinický karcinom (10 %), přičemž pokud jsou brány v úvahu pouze velké slinné žlázy, acinický karcinom je druhým nejčastějším zhoubným nádorem.

Studie	Stát	Počet případů ve studii/počet ZN	Období	Nejčastější ZN ve studii	Výskyt MEC (%)	Výskyt ADC (%)
Vuhahula EA, 2004 (22)	Uganda	268/125	1979-1988	ADC	20,3	29,3
Toida M, 2005 (23)*	Japonsko	82/27	1979-2003	ADC	37	29,6
Subhashraj K, 2008 (24)	Indie	684/262	1991-2006	ADC	19	25
Bjørndal K, 2011 (25)	Dánsko	871/871	1990-2005	ADC	15,7	25,6
Buchner A, 2007 (26)*	USA	380/156	1986-2005	MEC	35	15,4
Jones AV, 2008 (27)	Velká Británie	741/260	1974-2005	MEC	32,7	23,8
Abrahão AC, 2016 (28)*	Brazílie	170/81	1942-2012	MEC	28,8	24
Gao M, 2017 (29)	Čína	7190/2536	1963-2012	MEC	29,6	28,9

Tabulka 2 – Vybrané početné studie nádorů slinných žláz z různých kontinentů, které demonstrují odlišnosti ve výskytu nejčastějších zhoubných nádorů slinných žláz. *Intraorální tumory malých slinných žláz.

2.2. Klinické příznaky

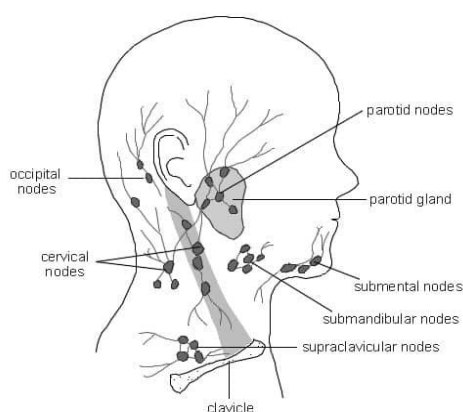
Klinické příznaky jsou rozdílné podle lokalizace a povahy tumoru. Nachází-li se nádor ve velkých slinných žlázách, projevují se jak benigní, tak maligní nádory nejčastěji nebolestivou hmatnou rezistencí, eventuálně i viditelným jednostranným zduřením v oblasti postižené žlázy (obrázek 7A). Benigní nádory se takto mohou projevovat i několik let a pacientovi prakticky nečiní větší obtíže až do doby, než expanzivně rostoucí nádor přeroste do rozměrů. Objeví-li se paréza lícního nervu periferního typu, je to téměř vždy známkou zhoubného nádoru, který se perineurálně propaguje, což může způsobovat bolest. Tento symptom je významným negativním prognostickým faktorem. Kůže v oblasti tumoru může být též zarudlá a fixovaná k nádoru. Diagnostické obtíže často způsobují LG malignity jako je acinický a LG mukoepidermoidní karcinom, které se klinicky manifestují právě jako nezhoubné nádory. Nejčastějším příznakem nádorů malých slinných žláz, které jsou většinou maligní povahy, jsou ulcerace sliznice různé velikosti (obrázek 7B).



Obrázek 7 – A: Tumorózní zduření v oblasti úhlu mandibuly; B: Rozsáhlá ulcerace sliznice patra způsobená maligním nádorem malých slinných žláz.

2.3. Diagnostika

Základem diagnostiky je odebrání pečlivé osobní anamnézy, ve které je důležitým údajem délka trvání obtíží a zda pacient pociťuje bolest či změny citlivosti v postižené oblasti. Z délky trvání symptomů se lze již domnívat, zda se jedná o zhoubný či nezhooubný nádor, neboť právě nezhooubné nádory mají tento údaj mnohem delší než nádory zhoubné. Z fyzikálních vyšetření je pak pohledem možno zhodnotit stranovou asymetrii a pohmatem konzistenci tumoru, jeho orientační velikost, pohyblivost vůči spodině a kůži, eventuálně i přítomnost fluktuujícího obsahu. Nutno neopomenout palpačně vyšetřit i spádové lymfatické uzliny, které jsou především preaurikulárně, podél jugulárních žil a supraclavikulárně (obrázek 8).

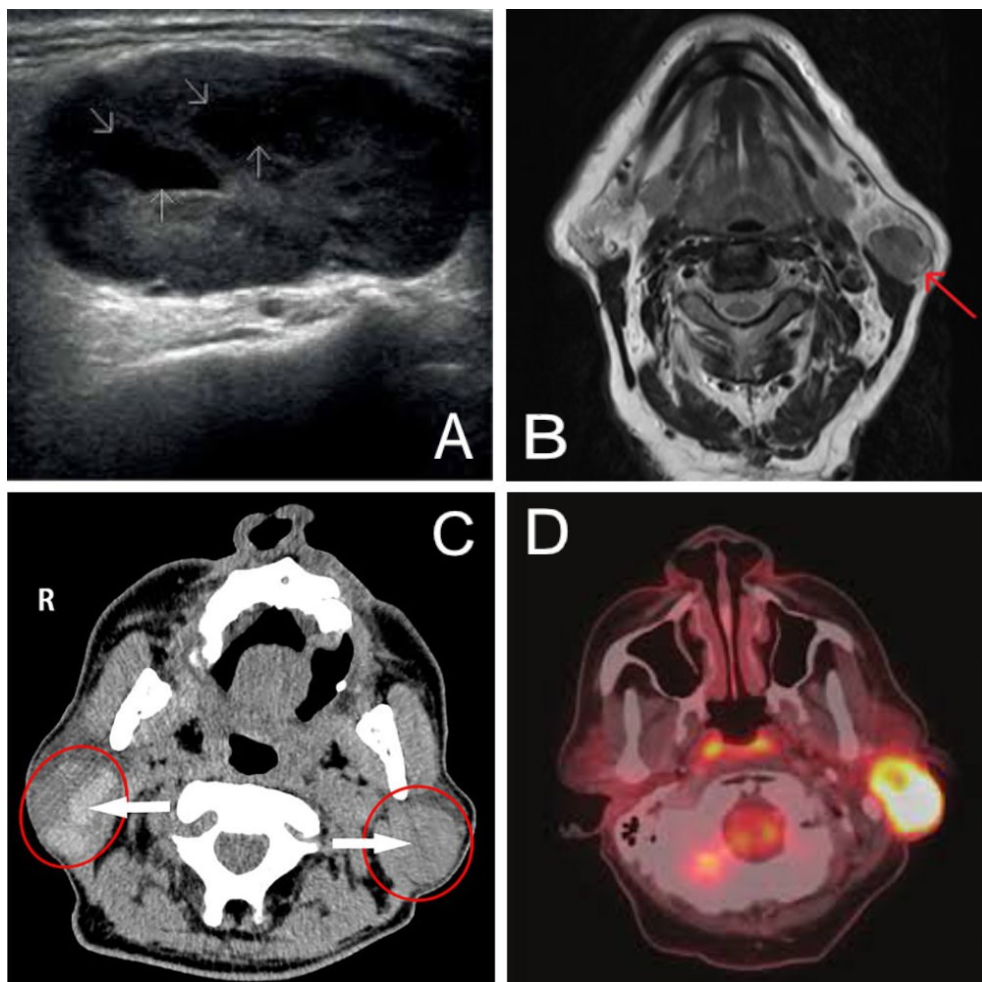


Obrázek 8 – Spádové lymfatické uzliny hlavy a krku.

2.3.1. Zobrazovací metody

Ultrasonografické vyšetření (USG) (obrázek 9A) je vzhledem ke své dostupnosti nejvyužívanější zobrazovací metodou v diagnostice nádorů slinných žláz. Vzhledem k tomu, že je vyšetření nebolestivé a pacient není vystaven radiační zátěži, je toto vyšetření pro pacienta téměř nezátěžující. USG vyšetření má vysokou senzitivitu, avšak nízkou specifitu pro diagnostiku konkrétního typu nádoru. Dobře odliší lézi cystickou od solidní, lézi dobře ohraničenou od infiltrativně rostoucí a s užitím Dopplerovského zobrazení je možno zhodnotit prokrvení léze. Sonograficky lze obdobným způsobem též zhodnotit eventuální postižení spádových lymfatických uzlin. Sonografická kontrola je dále hojně využívána při odběru diagnostického materiálu k cytologickému (FNA), eventuálně bioptickému vyšetření (CCB).

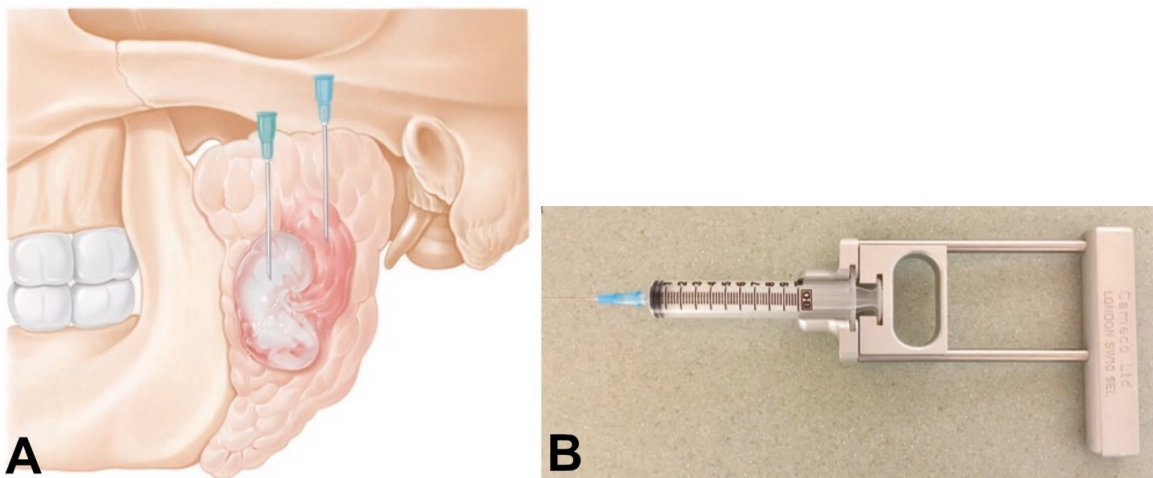
Až v dalším kroku, kdy není jasný rozsah tumoru či vztah k okolním strukturám, se přistupuje k sofistikovanějším zobrazovacím metodám, jako je **počítačová tomografie (CT)**, nebo **magnetická rezonance (MRI)** (obrázek 9B a 9C). I přes časovou i finanční náročnost se zpravidla dává přednost MRI a k CT vyšetření se pro nízký kontrast měkkých tkání přistupuje až u pacientů, kde nelze MRI provést, nebo je nutno zhodnotit případnou infiltraci kostí (30). Obě metody jsou vhodné k určení lokální pokročilosti a zhodnocení přítomnosti regionálních i vzdálených metastáz, k čemuž se využívají především v kombinaci s pozitronovou emisní tomografií **PET/CT**, eventuálně **PET/MRI**, při které je nitrožilně podán radioaktivní zářič, nejčastěji se využívá fluorodeoxyglukóza (FDG) značená radioizotopem ^{18}F (obrázek 9D).



Obrázek 9 – A: Ultrasonografické vyšetření Warthinova tumoru parotidis; B: MRI vyšetření Warthinova tumoru parotidis; C: CT vyšetření oboustranného Warthinova tumoru parotidis; D: PET/CT vyšetření Warthinova tumoru parotidis.

2.3.2. Cytologické vyšetření

Nedílnou součástí předoperační diagnostiky je dnes již rutinně zavedené cytologické vyšetření salivární léze. Jedná se o vyšetření prováděné metodou tzv. tenkojehlové aspirační cytologie/biopsie (FNAB/FNAC). Principem FNA je proniknutí jehly celou tloušťkou tumoru a nasátí dostatečného množství nádorových buněk do stříkačky a jejich následné zpracování k cytologickému vyšetření (obrázek 10A). Ideálně se k aspiraci užívá jehla (22-25 gauge) připojená ke stříkačce s držákem, který usnadňuje aspiraci (obrázek 10B).



Obrázek 10 – A: Schematické znázornění průniku jehly do patologického ložiska; B: 25G silná jehla připojená ke stříkačce o objemu 10 cm³ s držákem usnadňující aspiraci buněk. (Zdroj: The Milan System for Reporting Salivary Gland Cytopathology)

Vlastní postup při odběru materiálu se lehce liší u lézí, které jsou dobře palpovatelné a u lézí, které jsou malých rozměrů nebo hluboko uložené, a proto nehmatné. V těchto případech se užívá ultrazvukem naváděná FNA, která umožní přesné zaměření léze. Vzhledem k histologické heterogenitě nádorů slinných žláz je na místě, aby po proniknutí jehly do centra léze byl materiál aspirován z více punkčních kanálů a byla tak zajištěna maximální diagnostická výtěžnost vyšetření. Tento postup je důležitý především při vyšetření cystických lézí, u kterých je riziko nediagnostického vzorku nejvyšší.

Hodnoty senzitivity a specifity vyšetření FNA vyšetření jsou velmi vysoké. Senzitivita a specifita vztahující se k odlišení nádorové od nenádorové léze činí 79–100 %, respektive

71–100 %. Stejně tak odlišení benigní od maligní léze dosahuje vysokých čísel 81–100 %. Naproti tomu určení specifického histologického typu nádoru kolísá mezi 48 % a 94 %. Takovýto rozptyl je dán především tím, že nejčastější diagnózou, kterou cytopatolog diagnostikuje, je pleomorfní adenom a Warthinův tumor, s jejichž rozpoznáním nebývá větších problémů a specifická tedy dosahuje až 100 %. Naproti tomu specifická určení typu tumoru výrazně klesá při diagnostice jiných histologických typů než je pleomorfní adenom a Warthinův tumor (31). To je dáno především výrazným morfologickým překryvem jednotlivých histologických typů maligních nádorů slinných žláz.

2.3.2.1. Interpretace cytologických nálezů: The Milan System for Reporting Salivary Gland Cytopathology

Počátkem roku 2018 byl publikován nový klasifikační systém stanovující jednotná pravidla cytologické diagnostiky lézí slinných žláz. Práce na tomto klasifikačním systému započaly v roce 2015 na Evropském cytologickém kongresu v Miláně. Proto dostala tato klasifikace název **The Milan System for Reporting Salivary Gland Cytopathology** (MSRSGC), v češtině pak Milánský systém reportování cytologií slinných žláz. Tento systém navazuje na již zavedené Bethesda systémy pro cytologickou diagnostiku štítné žlázy či děložního čípku a na Pařížskou klasifikaci pro cytologie moče. Před přijetím Milánského systému nebyla v běžné praxi používána jednotná klasifikace ani nomenklatura cytologických nálezů u lézí slinných žláz. Jednotlivá pracoviště a někdy dokonce i lékaři v rámci oddělení, měli vlastní způsob reportování nálezů. Některá oddělení užívala zastaralou Papanicolaouovu klasifikaci, nebo byl protokol pouze deskriptivní bez kategorizace nálezů, což bylo pro klinika často matoucí. Nomenklatura též nebyla sjednocena a často byla používána nevhodná histologická terminologie. Tyto nesrovnalosti a nesourodosti řeší právě Milánská klasifikace, která přichází s jednotnou nomenklaturou a strukturou reportování cytologických nálezů.

Milánská klasifikace popisuje šest diagnostických kategorií: nedignostická, nenádorová, atypie nejistého významu (AUS – Atypia of Undetermined Significance), benigní nádory, suspektní z malignity a maligní (tabulka 3) (32). V návaznosti na již zavedené cytologické klasifikační systémy vydává i Milánská klasifikace klinická doporučení dalšího

postupu pro každou kategorii a procentuální vyjádření míry rizika malignity pro jednotlivé kategorie systému. Tyto aspekty dělají z Milánské klasifikace účinný diagnostický nástroj, který je vhodné začlenit do rutinní diagnostiky lézí slinných žláz na všech pracovištích.

Diagnostická kategorie	Riziko malignity (%)	Doporučený klinický postup
I. Nediagnostická	25	Nutná klinicko-patologická a radiologická korelace nebo opakovat FNA
II. Nenádorová	10	Sledování a radiologická korelace
III. Atypie nejistého významu (AUS)	20	Opakovat FNA nebo operovat
IV. Nádory		
A. Benigní	<5	Sledovat nebo operovat
B. Salivární nádory s nejistým maligním potenciálem (SUMP)	35	Vždy operovat
V. Podezření z malignity (SM)	60	Vždy operovat
VI. Maligní	90	Vždy operovat

Tabulka 3 – Diagnostické kategorie MSRSGC společně s procentuálním vyjádřením míry rizika malignizace a doporučeným klinickým postupem (32).

2.3.3. Bioptické vyšetření

Vedle FNA lze v rámci předoperačního vyšetření patologických ložisek nádorů slinných žláz využít též metodu core-cut biopsie (CCB/CNB), kterou je možno získat dostatečný materiál pro histologické, imunohistochemické či genetické vyšetření. Tato metoda je sice diagnosticky výtěžnější, ale ve srovnání s FNA je větší riziko komplikací spojených s odběrem (33). Mezi tyto komplikace patří především riziko poranění lícního nervu, implementace maligních nádorových buněk podél punkčního kanálu, riziko zanesení infekce, eventuálně iatrogeně indukovaná nekróza nádoru (32). Tyto komplikace se u FNA vyskytují v mnohem menší míře. Další metodou pro získání tkáně k bioptickému vyšetření je probatorní excize, která je z hlediska množství tkáně ještě přínosnější než CCB.

Po evaluaci předoperačních vyšetření je v případě prokázané neoplázie pacient indikován k chirurgickému zákroku různého rozsahu podle charakteru léze, tzn. enukleace, excize, či resekce tumoru. Vyoperovaný materiál je standardně fixován v pufrovaném 4% formaldehydu po dobu minimálně 24 hodin, makroskopicky popsán a rutinně zpracován k histologickému vyšetření. Běžně jsou vzorky barveny hematoxylinem-eosinem (HE), až v dalším kroku lze do diagnostického postupu zahrnout i doplňkové vyšetření imunohistochemické či molekulárně-genetické.

2.4. Histologické typy nádorů slinných žláz

Nádory slinných žláz jsou velmi rozmanitou a komplikovanou skupinou neoplázií, neboť jejich morfologie je značně variabilní a některé, především maligní nádorové jednotky se do jisté míry vzájemně překrývají jak v histologickém, tak imunohistochemickém obraze. To v praxi znamená, že některé histomorfologické a imunohistochemické charakteristiky jsou sdíleny různými nádorovými jednotkami.

Světová zdravotnická organizace (WHO) rozlišuje v nejaktuálnějším vydání Klasifikace nádorů hlavy a krku 21 histologických typů maligních salivárních nádorů, které mají specifický onkologický ICD-O kód (tabulka 4) (34).

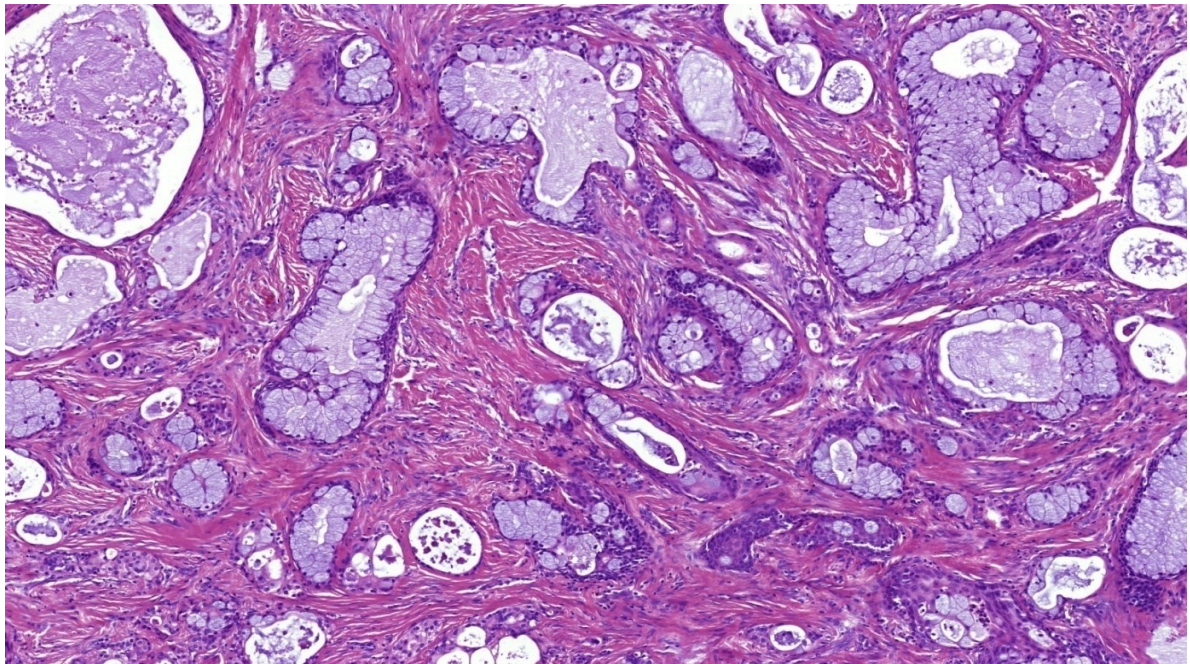
Maligní tumor	ICD-O
Mukoepidermoidní karcinom (MEC)	8430/3
Adenoidně cystický karcinom (ADC)	8200/3
Acinický karcinom (ACC)	8550/3
Polymorfni adenokarcinom (PAC)	8525/3
Světlobuněčný karcinom (CCC)	8310/3
Basocelulární karcinom (BC)	8147/3
Intraduktální karcinom (IC)	8500/2
Adenokarcinom, NOS	8140/3
Salivární duktální karcinom (SDC)	8500/3
Myoepiteliální karcinom	8982/3
Epiteliálně myoepiteliální karcinom	8562/3
Karcinom ex pleomorfni adenom (CaexPA)	8941/3
Sekreční karcinom (SC)	8502/3
Sebaceózní adenokarcinom	8410/3
Karcinosarkom	8980/3
Špatně diferencovaný karcinom	
Dediferencovaný karcinom	8020/3
Velkobuněčný neuroendokrinní karcinom	8013/3
Malobuněčný neuroendokrinní karcinom	8041/3
Lymfoepiteliální karcinom	8082/3
Skvamocelulární (dlaždicobuněčný) karcinom	8070/3
Onkocytický karcinom	8290/3

Tabulka 4 – WHO histologická klasifikace nádorů slinných žláz 2017 (34).

Nejčastějším maligním nádorem slinných žláz je dle WHO **mukoepidermoidní karcinom (MEC) (8430/3)** (35). MEC vychází z příušní žlázy a malých slinných žlázek sliznice patra a bukální sliznice a je nejčastější intraorální salivární malignitou. MEC je též

nejčastějším maligním nádorem dětí a pacientů, kteří byli v dětském věku léčeni kombinací chemoterapie a radioterapie (20, 21). Histologicky se tumor skládá ze třech typů buněk: epidermoidních, mucinózních a intermediárních. Pro diagnózu MEC je nutný průkaz extra- a intracelulárního mucinu, který je prokazatelný speciálním barvením, např. mucikarminem, alciánovou modří či metodou PAS (periodic acid Schiff).

Dle současné klasifikace WHO 2017 je MEC histologicky variabilní a dle převládajícího buněčného typu se dělí do tří stupňů diferenciaci (grade) (35). Nízce maligní (low-grade, LG) MEC je definován jako dobře ohraničený cystický tumor s převahou mucinózních buněk a jen s lehkými buněčnými atypii (obrázek 11). Středně diferencovaný (intermediate-grade, IG) MEC je hůře ohraničen, méně cystický s větším podílem solidní komponenty a menším počtem mucinózních buněk. Nízce diferencovaný (high grade, HG) MEC je charakterizován solidní strukturou s převahou epidermoidních a intermediárních buněk, které mohou být výrazně polymorfní a vykazují vysokou mitotickou i proliferační aktivitu (36). Přítomnost nekróz, perineurální a lymfovaskulární invaze či invaze do přilehlé kosti je podle modifikovaného systému důvodem pro upgradování nádoru (37, 38). Histologický grade je jedním z důležitých prognostických ukazatelů, neboť více než polovina pacientů s HG MEC nepřežije 5 let od první diagnózy (39).



Obrázek 11 – Low-grade MEC složen převážně z mucinózních buněk utvářející tubulární struktury a buněk intermediálních a epidermoidních.

V praxi se pro grading MEC uplatňuje především skórovací systém dle AFIP (37) a jeho modifikace podle Brandweínové (38), které jsou porovnány v tabulce 5 (tabulka 5). Oba systémy se lehce liší interpretací celkového skóre. Podle AFIP systému jsou jako low-grade tumory považovány ty MEC, které v konečném součtu dosahují 0–4 bodů, jako intermediate-grade tumory dosahující 5–6 bodů a jako high-grade tumory jsou hodnoceny MEC, které dosáhnou více než 7 bodů. V modifikovaném systému dle Brandweínové je bodové rozmezí 0 bodů pro low-grade MEC, 2–3 body pro intermediate-grade MEC a více než 4 body pro high-grade MEC.

AFIP systém	Body	Systém dle Brandweínové	Body
Intracystická komponenta < 20 %	2	Intracystická komponenta < 25 %	2
Neurální invaze	2	Perineurální šíření	3
Nekróza	3	Nekróza	3
> 4 mitózy na 10 HPF	3	> 4 mitózy na 10 HPF	3
Pleomorfie buněk a jader	4	Nukleární atypie	2
		Invaze tumoru v malých hnízdech	2
		Kostní invaze	3

Tabulka 5 – Porovnání nejčastěji používaných skórovacích systémů pro grading mukoepidermoidního karcinomu. Grading dle AFIP: Low-grade: 0–4 b., Intermediate-grade: 5–6 b., High-grade: 7–14 b. Grading dle Brandweínové: Low-grade: 0b., Intermediate-grade: 2–3 b. High-grade: 4–18 b. (40)

Vzhledem k tomu, že terapeutický přístup k pacientům s intermediate-grade a high-grade MEC je totožný, přiklání se stále někteří autoři ke dvoustupňovému skórovacímu systému (tabulka 6) (41).

Low-grade MEC	High-grade MEC
< 4 cm	> 4 cm
Dobře ohraničený, neopouzdržený	Špatně ohraničený, infiltrativní
Převážně cystický (> 20 %)	Převážně solidní (cystické prostory zaujímají < 20 %)
> 50 % buněk je mucinózního typu	< 10 % buněk je mucinózního typu
Expanzivní růst („pushing margins“)	Infiltrativní okraje
Výrazný lymfoidní infiltrát	Fibrotizace až skleróza stromatu
< 1–2 mitózy/HPF	> 3–4 mitózy/HPF
Lehké atypie	Těžké atypie
Bez nekróz, krvácení či vaskulární invaze	Nekrózy, krvácení a perineurální invaze, vaskulární invaze méně častá

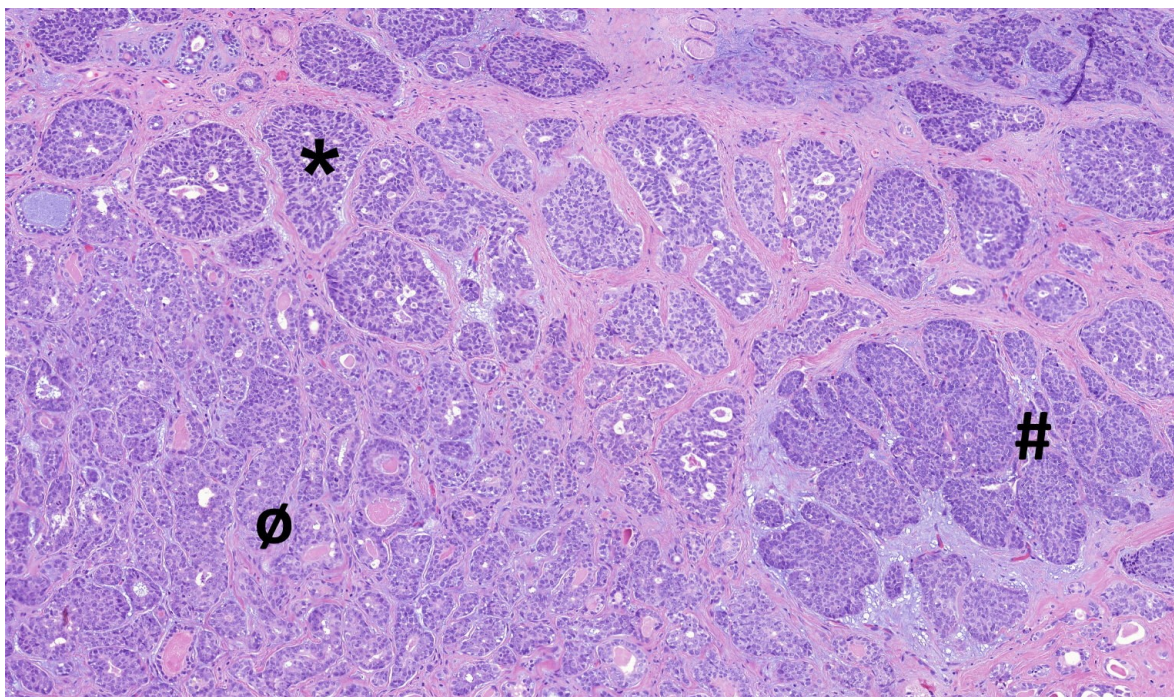
Tabulka 6 – Histologická kritéria pro alternativní dvoustupňový grading MEC (41).

Imunohistochemické vyšetření není pro diagnózu MEC ve většině případů nezbytné. MEC vykazuje expresi cytokeratinů (CK7, CK14 a dalších) a markerů p63 a p40, která je dána původem MEC v bazálních buňkách žíhaných vývodů. Myoepiteliální markery jako je calponin, hladkosvalový aktin jsou negativní stejně jako SOX10 a S100 protein.

Molekulárně-genetickými metodami lze prokázat translokaci t(11;19)(q21;p13) vedoucí k fúzi genů *CRTC1-MAML2*, až v 80 % případů MEC (42, 43, 44, 45). V malé podskupině MEC představující zhruba 5 % případů byla objevena translokace t(11;15)(q21;q26) vedoucí k fúzi genů *CRTC3-MAML2* (46). Původně byla přítomnost těchto translokací považována za pozitivní prognostický faktor, neboť translokované MEC se chovaly klinicky indolentně, s menším procentem recidiv a metastáz. Histologicky se jednalo především o low-grade MEC. Vzácné případy MEC s high-grade morfologií a příslušnou translokací, byly v původních studiích spojeny s příznivým klinickým průběhem i v pokročilých stádiích onemocnění (47, 48). Nověji se však ukazuje, že translokace *CRTC1/3-MAML2* se může vyskytovat také v klinicky agresivních HG MEC. Přítomnost *CRTC1/3-MAML2* není tedy zárukou indolentní povahy nádoru a detekce translokací je tedy dle Seethaly a spol. spíše diagnostickým, než prognostickým markerem (49). Naproti tomu v rozsáhlé molekulárně-genetické analýze MEC navrhuje autoři podle přítomnosti, či nepřítomnosti translokace *CRTC1/3-MAML2* a počtu kopií genových alterací rozdělit MEC do 3 odlišných prognostických skupin (50). Lze uzavřít, že přítomnost translokace *CRTC1/3-MAML2* je významným diagnostickým nálezem, který je stěžejní v diferenciálně diagnostické

rozvaze obtížných nádorů. Prognostický význam translokace je ale třeba ověřit v dalších studiích. Mutační profil MEC je dosud jen částečně objasněn a byly zaznamenány i jiné mutované geny, např. *TP53* a v menší míře pak alterace genů *PI3KCA*, *BAP1*, *BRCA1/2*, *ERBB2* či *CDKN2A* typicky se vyskytující v HG MEC (51).

Druhým nejčastějším maligním salivárním nádorem po MEC je v dutině ústní **adenoidně cystický karcinom (ADC) (8200/3)** (52). Tento karcinom je také nejčastější malignitou postihující submandibulární a sublingvální slinnou žlázu a je nejčastějším salivárním nádorem postihující horní respirační trakt (53, 54, 55). I přes pomalý růst se v dlouhodobém horizontu jedná o prognosticky velmi závažnou malignitu, která má výrazné tendence k infiltrativnímu růstu s perineurálním šířením, k lokálním recidivám a k pozdnímu zakládání vzdálených metastáz. ADC je charakterizován vysokou mortalitou. Při postižení příušní žlázy je klinicky častou manifestací paréza lícního nervu. Histologicky se jedná o bazaloidně vyhlížející nádor s bifazickou strukturou. Je složen ze dvou typů buněk, z tzv. modifikovaných myoepiteliálních buněk tvořící abluminální vrstvu a z duktálních buněk tvořící luminální vrstvu. Tyto dva typy buněk jsou uspořádány do tří růstových struktur: kribriformní, tubulární a solidní (obrázek 12), které se v různé míře vyskytují v rámci jednoho tumoru. Podíl solidní komponenty určuje míru diferenciacie tumoru a do určité míry i predikuje prognózu (56, 57). Nádory, které se skládají převážně z kribriformních a tubulárních struktur a neobsahují solidní komponentu, jsou hodnoceny jako grade 1. Jsou-li solidní okrsky přítomny v méně než 30 % tumoru, klasifikuje se jako grade 2, a pokud ve více než v 30 %, jedná se o ADC grade 3 (58). Perineurální a intraneurální propagace je v ADC běžně přítomna, přičemž pouze intraneurální invaze je nepříznivý prognostický faktor (59).

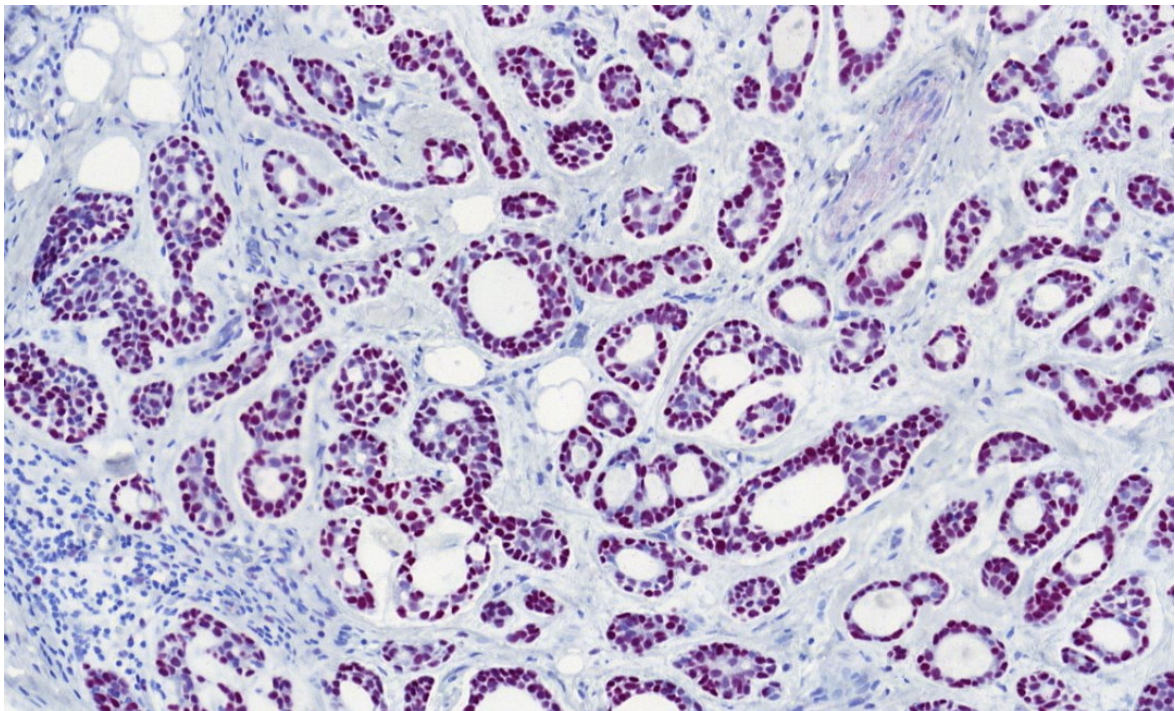


Obrázek 12 – Kribriformní (*), tubulární (∅) i solidní (#) růstová varianta ADC.

Imunohistochemické vyšetření je v případě adenoidně cystického karcinomu nespecifické a morfologie je vždy stěžejní pro finální diagnózu. Nápomocnou může být pozitivita CD117 (C-kit) (60, 61) a EMA v lumenální vrstvě buněk a myoepiteliálních markerů S100 proteinu, p63 a SMA v abluminální vrstvě buněk. Zároveň je v obou vrstvách přítomná difúzní silná pozitivita cytokeratin CK7 a markeru SOX10. CK14 je silně pozitivní v tubulárních a kribriformních strukturách, naopak v solidní komponentě je negativní (58).

V diagnosticky nejasných případech je možno využít přítomnosti rekurentní translokace t(6;9)(q22-23;p23-24) vedoucí ke vzniku fúzního genu *MYB-NFIB*, kterou lze detekovat až v 86 % případů ADC (62, 63). Tím dochází ke zvýšené expresi proteinu MYB, který může být imunohistochemicky detekován (64). Silná nukleární pozitivita především abluminálních buněk je senzitivní pro diagnózu ADC (obrázek 13) (65). Podle studie Poling a spol. je imunohistochemická detekce proteinu MYB dokonce senzitivnější i specifitější než cytogenetická detekce pomocí FISH (66). Dalším vyšetřováním bylo zjištěno, že až v 35 % *MYB-NFIB* negativních případů ADC je přítomna odlišná rekurentní translokace t(8;9) vedoucí k fúzi genů *MYBL1-NFIB* (67). Tyto translokace nebyly doposud popsány v žádném jiném salivárním karcinomu. Několik dalších studií popisuje poměrně rozsáhlý repertoár

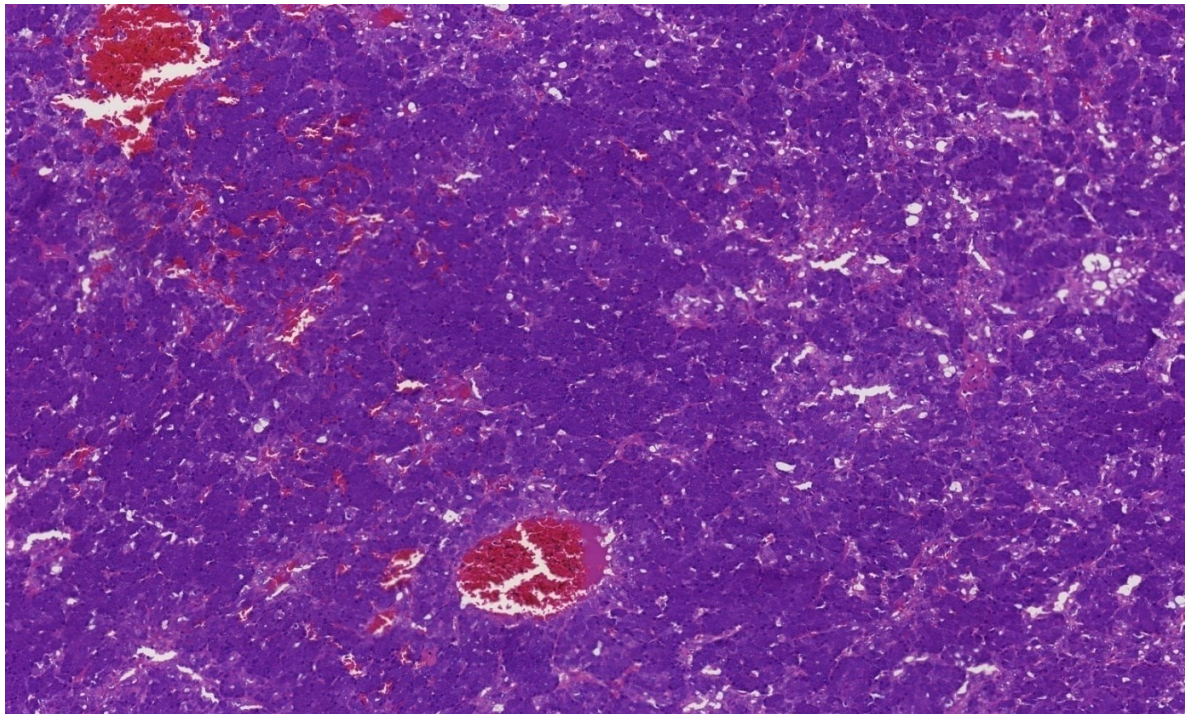
somatických mutací (68, 69). V centru zájmu je však především význam lokusu 1p36, na kterém se nachází řada tumor supresorových genů, jejichž delece byla popsána vedle ADC i v řadě jiných nádorů včetně prsu, plic, pankreatu či kolorektálního karcinomu (70). Z výsledků dvou rozsáhlých studií, které hodnotily vztah přítomnosti delece lokus 1p36 a prognózy jasně vyplývá, že ADC obsahující tuto deleci mají signifikantně horší prognózu (71, 72). Zároveň bylo zjištěno, že žádný ze studovaných případů, který byl pozitivní na přítomnost delece lokusu 1p36, neobsahoval zlom v genu *MYBL1*, a proto se lze domnívat, že se tyto dva nálezy vzájemně vylučují (72).



Obrázek 13 – Difúzní silná nukleární pozitivita protilátky MYB v tubulární komponentě ADC.

Další low-grade salivární malignitou, podle některých autorů čtvrtou nejčastější, je **acinický karcinom (ACC)** (8550/3) (73), který je dokonce druhou nejčastější malignitou slinných žláz v dětském věku (21, 74). Klinicky se jedná o pomalu rostoucí, dlouhou dobu asymptomatický nádor a jen velmi vzácně se může objevit bolest či paréza lícního nervu. Lokální recidivy se vyskytují až v jedné třetině případů. Vzdálené metastázy ACC vznikají sice pouze v 13 % případů, avšak mohou se objevit i mnoho let po první diagnóze. Pro morfologii ACC jsou charakteristické čtyři typy růstových struktur, microcystická, cystopapilární, solidní

a folikulární, jejichž poměr zastoupení v tumoru různě kolísá. Nejcharakterističtějším typem buněk jsou acinární buňky, které jsou podobné normálním acinárním buňkám serózní slinné žlázy a stejně tak obsahují i PAS-pozitivní zymogenní granula (obrázek 14). Dále se vyskytují vakuolizované buňky obsahující v cytoplasmě PAS-negativní mukopolysacharidy, nádorové buňky se světlou vodojasnou cytoplasmou a nespecifické buňky podobné duktálnímu epitelium vmezeřených vývodů. V některých případech může být ve stromatu hojná lymfoidní infiltrace s proliferací aktivovaných zárodečných center lymfatických folikulů. Dobře diferencovaný ACC s lymfoidním stromatem je charakterizován klinicky indolentním průběhem (75).

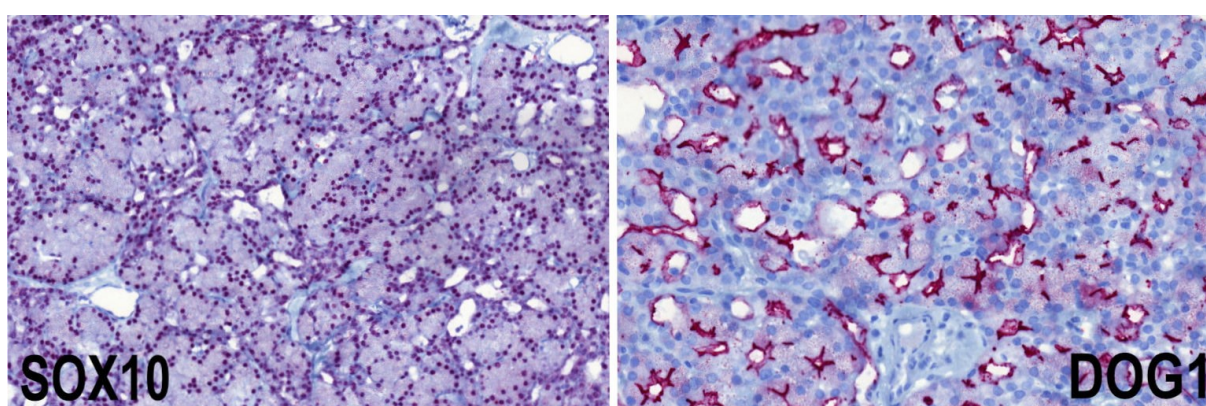


Obrázek 14 – Acinární buňky s tmavou bazofilní cytoplasmou obsahující zymogenní granula.

V diferenciální diagnóze ACC je na prvním místě sekreční karcinom (SC) slinných žláz. V období před objevem SC, jakožto samostatné nádorové jednotky v roce 2010, byl zpravidla klasifikovaný jako tzv. „na zymogenní granula chudý acinický karcinom“ (76). Tyto nádory byly později překlasifikovány jako SC (77). SC a ACC se liší nejenom morfologicky, ale i svým imunoprofilem (tabulka 7).

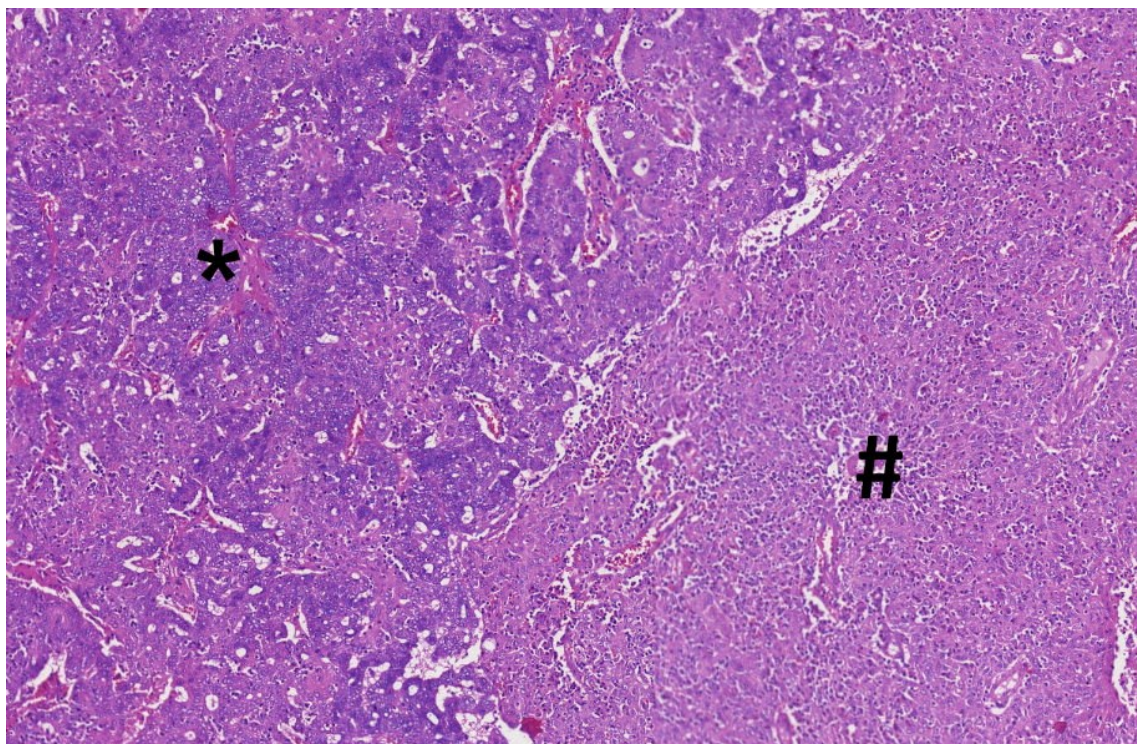
Protilátka	Acinický karcinom	Sekreční karcinom
DOG1	+ (obrázek 15)	-
SOX10	+ (obrázek 15)	-
P63	-	-/+
CK7	+	+
MGA	-	+
S100 protein	-	+
EMA	- (luminalně +)	+
Vimentin	-	+

Tabulka 7 – Porovnání imunoprofilu acinického a sekrečního karcinomu slinných žláz.



Obrázek 15 – Difúzní silná nukleární pozitivita SOX10 a membránová pozitivita DOG1 v ACC.

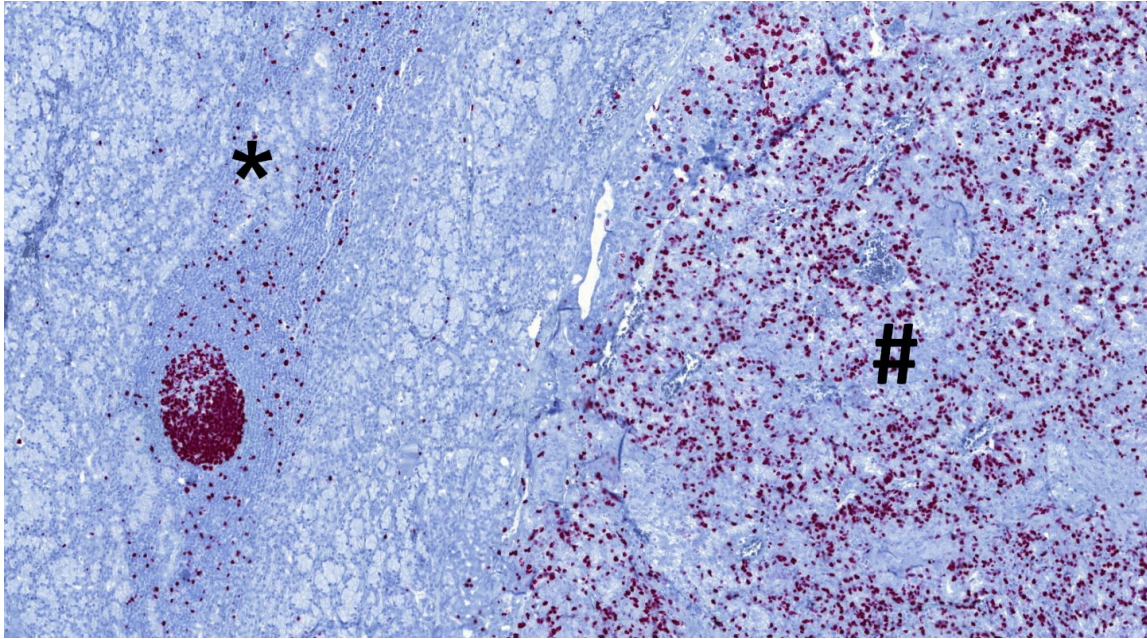
ACC může být vzácně spojen s tzv. high-grade transformací (HGT). Tento vzácný fenomén, známý též jako „dediferenciace“, byl poprvé popsán u sarkomů (78). HGT představuje zvrát původně nízce maligního nádoru ve vysoce maligní a agresivní formu, která postrádá svou původní histomorfologickou diferenciaci (obrázek 16) (79, 80). Přítomnost nekróz a vysoká proliferační aktivita jsou charakteristickými znaky HGT (obrázek 17). Vedle ACC (81), byla HGT popsána i u jiných salivárních karcinomů, např. u adenoidně cystického karcinomu (82, 83), epitheliálně-myoepitheliálního karcinomu (84, 85), polymorfního adenokarcinomu (86, 87) či u sekrečního karcinomu (88, 89). Podmínkou diagnózy HGT je přítomnost okrsků původního low-grade karcinomu i okrsků dediferencovaného high-grade karcinomu v rámci jednoho nádoru (80). Tyto dvě komponenty se liší u ACC nejen histomorfologicky, ale též imunohistochemicky (tabulka 8).



Obrázek 16 – High-grade transformace ACC, v levé části (*) je patrná low-grade komponenta a v pravé části (#) dediferencovaná, high-grade komponenta.

Protilátka	Low-grade komponenta	High-grade komponenta
SOX10	+	-
DOG1	+	-
CK7	+	-
GATA3	-	+
CK14	-	+
P63	-	+
S100	-	-
Ki-67	Nízká	Vysoká

Tabulka 8 – Porovnání imunoprofilu low-grade a high-grade komponenty HGT acinického karcinomu.



Obrázek 17 – Porovnání vysoké proliferační aktivity HG komponenty (#) a ojedinelých MIB1 pozitivních jader LG komponenty (*) ACC. Silná jaderná exprese buněk zárodečného centra lymfatických folikulu ve stromatu ACC slouží jako pozitivní vnitřní kontrola.

Jen velmi málo je známo o molekulárně-genetickém pozadí ACC. Na myším modelu byla demonstrována situace, kdy inaktivací tumor supresorových genů *APC* a *PTEN* došlo k aktivaci signálních drah mTOR a Wnt, což zanedlouho vedlo ke vzniku nádoru slinných žláz, který se morfoloicky velmi podobá lidskému ACC. Po aplikaci mTOR inhibitoru rapamycin došlo ke kompletní regresi tumoru (90). V jiné studii zabývající se analýzou signálních drah ve 272 případech různých ZN slinných žláz byla imunohistochemicky prokázána souvislost ACC se zvýšenou aktivací signálních drah mTOR, PI3K a AKT (91). Přínos těchto poznatků je však prozatím nejasný.

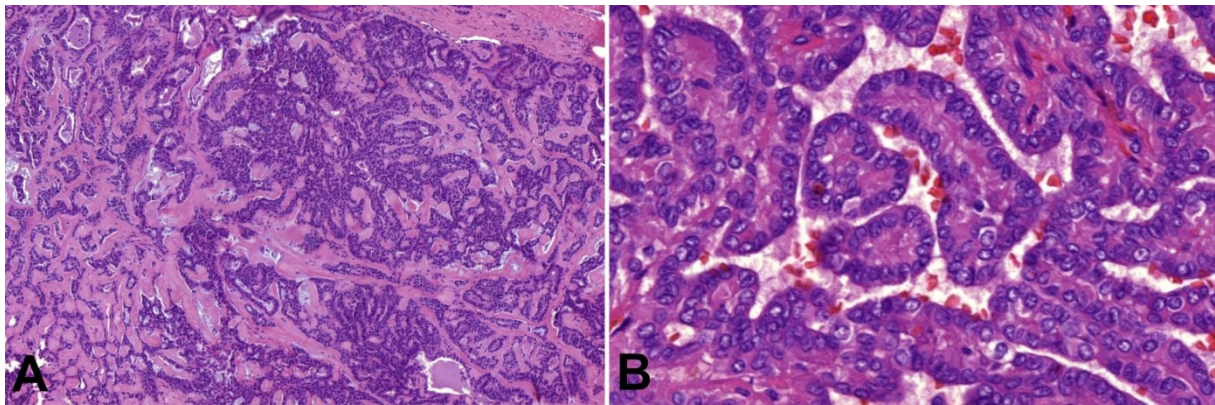
Polymorfní níže maligní adenokarcinom (PLGA) (92) byl v novém, čtvrtém vydání WHO klasifikace nádorů hlavy a krku překlasifikován jako **polymorfní adenokarcinom (PAC)** (8525/3) (93). Vyškrtnutím termínu „níže maligní“ z názvu tumoru, chtějí autoři WHO zdůraznit skutečnost, že se nádor ne vždy chová jako low-grade karcinom a může vykazovat

klinicky agresivnější růst, recidivy i high-grade transformaci (86, 87). Po adenoidně cystickém karcinomu je PAC druhým nejčastějším salivárním karcinomem postihující malé slinné žlázy patra, ve velkých slinných žlázách se vyskytuje velmi zřídka (94). Charakteristickým histologickým znakem je výrazná heterogenita růstových struktur v rámci jednoho tumoru (obrázek 18A). Tyto rozmanité růstové varianty byly definovány jako tubulární, trabekulární, solidní, kribriformní, pseudocystické, papilární a jiné (92, 95, 96, 97). Typickým znakem PAC je perineurální infiltrativní propagace nádorových buněk a koncentrické „terčovitě“ struktury. Cytologické znaky odpovídají svou uniformitou vzhledu téměř benignímu nádoru, neboť jsou typicky přítomny malé až středně velké buňky s oválným blandně vyhlížejícím jádrem a jen nečetnými jadrky. Mitózy a nekrózy jsou raritní a jejich přítomnost je spíše spojena s high-grade transformací, která je velmi vzácná (86, 87).

V nejnovější edice WHO „modré knížky“ je zařazena tzv. kribriformní varianta PAC (93). Vzhledem k odlišnostem od klasické varianty PAC ji někteří patologové pokládají za samostatnou nádorovou jednotku, tzv. **kribriformní adenokarcinom jazyka a malých slinných žláz (CATS/CAMSG)** (98). Od klasického PAC se liší predilekční lokalizací, způsobem růstu, biologickým chováním i molekulárně-genetickým pozadím. V první publikované práci byly všechny nádory lokalizované výlučně do oblasti jazyka, a proto byl tumor pojmenován jako *cribriform adenocarcinoma of the tongue* (CAT) (98, 99, 100, 101, 102, 103). Publikace popisovala soubor 8 případů adenokarcinomů jazyka, původně diagnostikovaných jako PLGA, které vykazovaly výraznou morfológickou podobnost se solidní a folikulární variantou papilárního karcinomu štítné žlázy (obrázek 18B), možná metastáza však byla vyloučena. Všichni pacienti měli v době diagnózy metastázy v cervikálních lymfatických uzlinách. Postupem času a s přibývajícímí nálezy se však ukázalo, že totožný nádor se solidně-kribriformní a papilární architekturou připomínající papilární karcinom štítné žlázy se může vyskytnout i jinde v dutině ústní mimo bázi jazyka, což vedlo ke změně názvu na *cribriform adenocarcinoma of minor salivary gland origin* (CAMSG) (99). Přestože má velká většina pacientů v době diagnózy již rozvinuté metastázy v regionálních lymfatických uzlinách, řadí se vzhledem ke své radiosenzitivitě stále ještě mezi nízce maligní karcinomy s dobrou prognózou (100).

Do diferenciální diagnostiky PAC spadají salivární nádory vyskytující se predilekčně v dutině ústní. Nejkomplikovanější se může zdát odlišení adenoidně cystického karcinomu

(ADC), se kterým sdílí především variabilní architekturu. K odlišení ADC a PAC je možno použít imunohistochemické barvení s protilátkou CD117 (C-kit). Tato protilátka je poměrně hojně užívána v diagnostice ADC, kde je popisována difúzní silná pozitivita, zatímco pro PAC je případná pozitivita tohoto imunomarkeru výrazně slabší (60, 61). Pro diagnózu PAC bude dále svědčit nízké Ki-67 (104). Dále je nezbytné odlišit PAC od benigních nádorů jako je pleomorfní, kanalikulární a jiné adenomy slinných žláz. Ačkoli jsou obě varianty PAC dobře diagnostikovatelné z hematoxylinu-eosinu, v pomocném imunohistochemickém barvení může být nápomocna pozitivita s cytokeratiny (AE1/3, CK7, CK8), S100 proteinem, p63, bcl2 či MGA. K vyloučení metastázy papilárního karcinomu slouží negativita thyreoglobulinu a TTF1 a pozitivita S100 proteinu.



Obrázek 18 – A: Klasická varianta polymorfního adenokarcinomu při malém zvětšení, ze kterého je patrný infiltrativní růst do stromatu a architektonická rozmanitost. Okolní matrix je hojně hyalinizovaná. V pravém horním rohu jsou patrné jednořadé sloupce buněk na periferii tumoru; B: Papilární uspořádání kribriformní varianty PAC, kde nukleární rysy připomínají papilární karcinom štítné žlázy.

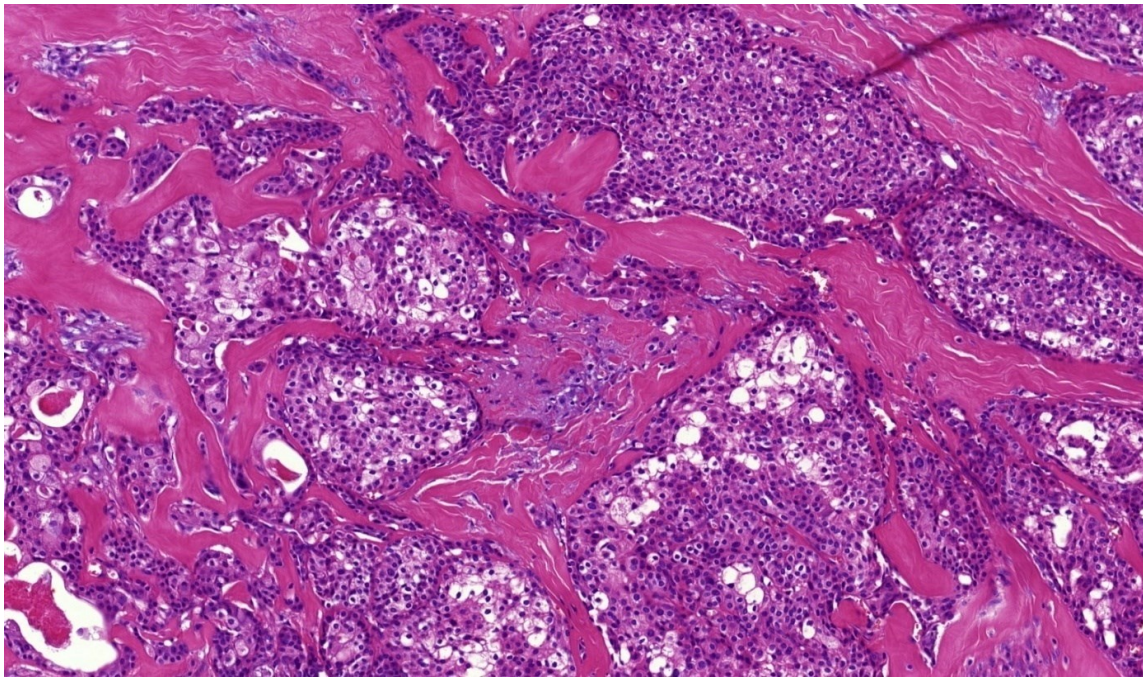
Molekulárně-genetické pozadí konvenční (klasické) a kribriformní varianty PAC je odlišné. Přestože v obou variantách byly popsány molekulární alterace v genové rodině *PRKD* ležící na 14. chromozomu, tyto alterace se liší. Až v 75 % případů klasického PAC (dříve PLGA) byla nalezena aktivační bodová mutace E710D genu *PRKD1* (105). V kribriformní variantě PAC (dříve CAMGS) byly až v polovině případů nalezeny rekurentní translokace týkající se jednoho z genů *PRKD1-3* s fúzními partnery *ARID1A* a *DDX3X*. V klasické variantě PAC však

doposud nebyly zaznamenány mutace genů *PRKD2* či *PRDK3* (106). Kompletní porovnání obou variant PAC je uvedeno v tabulce 9 (tabulka 9).

	Kribriformní varianta PAC	Klasická varianta PAC
Lokalizace	Malé slinné žlázy především při bázi jazyka	Malé slinné žlázy hlavně patra a tváře
Růst	Především kribriformní a glomeruloidní struktury, dále tubulární a solidní	Proudící jednořadé sloupce buněk nebo úzké trabekuly formující koncentrické spirály terčovitěho vzhledu. Přítomny jsou tubulární, trabekulární, papilární, solidní i kribriformní struktury
Jaderné znaky	Opticky prázdná, vesikulární jádra vzhledu jader papilárního karcinomu ŠŽ	Vesikulární ovoidní jádra
Klinické znaky	Časně metastazuje do krčních LU	Vzácně metastazuje do krčních LU
Molekulární alterace	Translokace genů <i>PRDK1-3</i> s fúzními partnery <i>ARID1A</i> a <i>DDX3X</i>	Hot spot aktivace <i>PRKD1</i> , somatická bodová mutace
Způsob invaze	Sklon k lymfatické invazi	Perineurální invaze

Tabulka 9 – Porovnání kribriformní a klasické varianty PAC (107).

Světlobuněčný karcinom (CCC) (8310/3) je nové pojmenování pro jednotku uváděnou v předchozí WHO klasifikaci jako „hyalinizující světlobuněčný karcinom“ (108). Vzhledem k tomu, že hyalinizace je variabilním znakem a nemusí být vůbec přítomna, bylo slovo „hyalinizující“ z názvu karcinomu v nejnovější WHO klasifikaci vypuštěno. CCC vykazuje predilekci pro ženské pohlaví (109). Jedná se o nízcí maligní karcinom vycházející hlavně z malých slinných žláz orofaryngu, patra a bukalní sliznice. Klinicky se manifestuje někdy jako bolestivé fixované zduření či ulcerace a může infiltrovat přilehlou kost. Mikroskopicky je tumor špatně ohraničený s širokou infiltrací okolních struktur včetně kosti a s častou intra- a perineurální propagací. Solidní hnízda a trabekulárně uspořádané nádorové pruhy bývají obklopeny hyalinizovaným až sklerotizovaným stromatem (obrázek 19). Nádorové buňky jsou jen s mírnými atypii, dobře ohraničené a s eosinofilní cytoplasmou, která je místy až vodojasná (109, 110).



Obrázek 19 – Solidní hnízda nádorových buněk s eosinofilní až vodojasnou cytoplasmou, která jsou oddělená pruhy hyalinizovaného stromatu.

Diferenciální diagnostika CCC zahrnuje nádory se světlobuněčnou diferenciací, včetně odontogenních nádorů. Do tohoto spektra lézí spadá mukoepidermoidní karcinom, světlobuněčná varianta skvamózního, epiteliálně-myoepiteliálního a myoepiteliálního karcinomu (111). Z odontogenních karcinomů pak připadají v úvahu především světlobuněčný odontogenní karcinom, se kterým sdílí též identickou genovou translokaci, a světlobuněčný kalcifikující epiteliální odontogenní karcinom (112). V neposlední řadě je nutno myslet i na možnost metastázy světlobuněčného renálního karcinomu. Diagnostické obtíže vyvstávají především u karcinomů s vyjádřenými skvamózními rysy, absencí hyalinizace, nízkým procentem světlých buněk a u nádorů zaujímající povrchový epitel (113). Ty mohou být chybně diagnostikovány jako high-grade skvamózní dlaždicobuněčné karcinomy (SqCC) a pacient by mohl být poškozen zbytečně extenzivním chirurgickým zákrokem, radioterapií eventuálně i chemoterapií (114). Všechny tyto nádory však lze podrobným vyšetřením morfolgie, použitím imunohistochemických a především molekulárně-genetických metod dobře rozlišit. Donedávna byla diagnóza CCC považována ještě jako „diagnóza per exclusionem“, při selhání diagnostických kritérií pro výše popsané karcinomy. Toto tvrzení však bylo opuštěno po objevení specifické rekurentní genové

translokace *EWSR1-ATF1*, které podpořilo tvrzení, že CCC je samostatná nádorová jednotka (115).

V imunohistochemickém barvení je patrná pozitivita s cytokeratiny CK7, CK17, CK14 a p63. Ostatní myoepiteliální markery jako jsou S100 protein, SMA, či calponin jsou negativní. Intracytoplasmatický materiál je PAS a mucikarmin pozitivní, což svědčí pro přítomnost glykogenu. Hyalinizované stroma je pozitivní pro průkaz kolagenu I a negativní pro kolagen IV (116). CCC mohou být i difúzně silně nukleo-cytoplazmaticky pozitivní s protilátkou proti p16 proteinu, což může být velmi zavádějící především u karcinomů s výraznými skvamózními rysy a mohlo by dojít k chybné diagnóze SqCC (113). Na rozdíl od p16 pozitivních dlaždicobuněčných karcinomů hlavy a krku, je však CCC negativní při následné HPV testaci (117, 118).

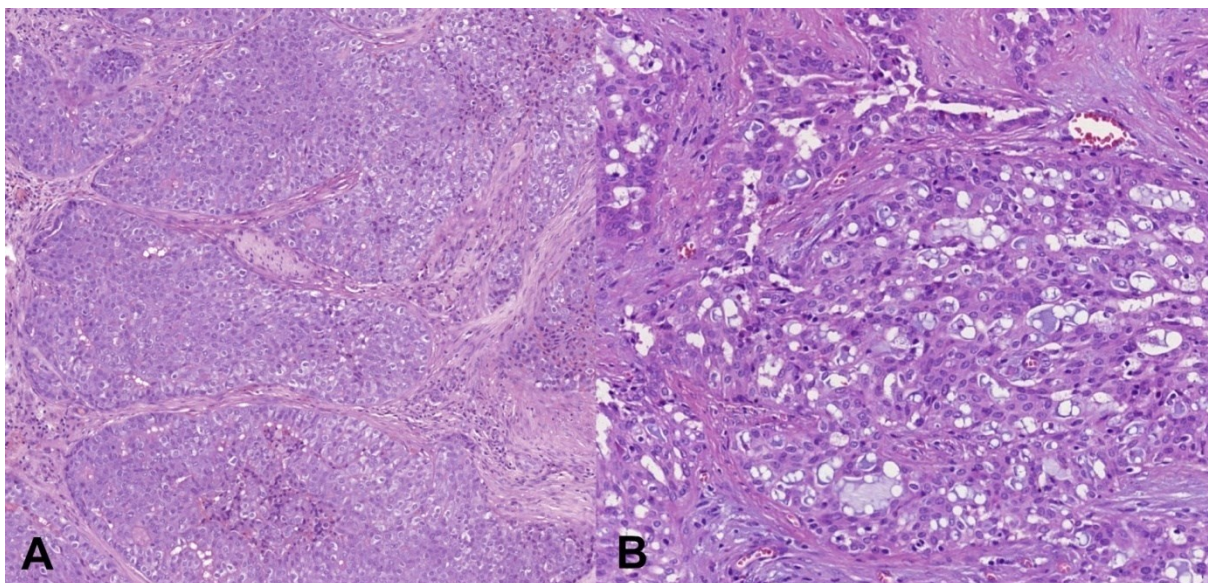
CCC je až v 90 % případů spojen s rekurentní translokací t(12;22) (q13;q12) vedoucí ke vzniku fúzního transkriptu *EWSR1-ATF1* (115). Tato translokace byla původně objevena ve světlobuněčném sarkomu měkkých tkání (119). Dále se tato translokace typická pro světlobuněčný odontogenní karcinom, což potvrzuje teorii, že tyto dva tumory spolu souvisejí (120). Autoři první práce se domnívali, že zlom genu *EWSR1* je pro salivární CCC specifická, avšak nedávno byl identický nález objeven ve velkém souboru 94 myoepiteliálních karcinomů se světlobuněčnou diferenciací (121). Zlom v genu *EWSR1* byl nalezen kromě CCC též ve 39 % de novo vzniklých světlobuněčných myoepiteliálních karcinomů, ve 24 % světlobuněčných myoepiteliálních karcinomů vzniklých v pleomorfním adenomu a v jednom případě (9 %) epitelio-myoepiteliálního karcinomu. V této studii bylo dále prokázáno, že pacienti se světlobuněčnou variantou myoepiteliálního karcinomu se zlomem *EWSR1* mají výrazně horší prognózu. Vedle typické translokace *EWSR1-ATF1* byla nedávno ve 3 případech světlobuněčných karcinomů s výraznou mucinozní komponentou popsána nová, méně častá translokace *EWSR1-CREM* (122).

Sekreční karcinom mamárního typu (mammary analogue secretory carcinoma - MASC) je nově popsán salivární karcinom (76). Jako jediná nová nádorová jednotka byl SC zařazen do nové WHO klasifikace nádorů slinných žláz z roku 2017 (123), a to pod názvem

sekreční karcinom (SC) (8502/3). Jde o low-grade salivární karcinom, který se svou histomorfologií, imunoprofilem a genetickým pozadím podobá sekrečnímu karcinomu prsu (124). Nejčastěji se vyskytuje v příušní žláze, dále pak v submandibulární žláze (125) a v malých slinných žlázách dutiny ústní a sinonasálního traktu (126, 127, 128). Z extrasalivární lokalizace byl sekreční karcinom kromě prsu popsán ve štítné žláze (129, 130), slzné žláze (131), či v kůži (132, 133). Před prvním popsáním tohoto karcinomu v roce 2010, byl SC zpravidla klasifikován jako acinický karcinom, adenokarcinom NOS, LG mukoepidermoidní karcinom či jako LG salivární duktální karcinom (134).

SC je ve většině případů dobře ohraničený, ale neopouzdržený tumor s infiltrativním charakterem růstu. Tumor mikroskopicky utváří různě velké lobuly oddělené vazivovými septy a formuje mikrocystické a tubulární struktury, uvnitř kterých je přítomen PAS pozitivní eosinofilní sekreční materiál (obrázek 20). Buňky jsou uniformní a mají pravidelná jádra kulatého až oválného tvaru s jemně granulovaným chromatinem a zřetelným centrálně uloženým jadérkem. Cytoplasma nádorových buněk je objemná, bledá a místy může být granulární a vakuolizovaná. Proliferační aktivita je většinou nízká a nekrózy nejsou přítomny. Někdy může být přítomna i perineurální invaze. Doposud bylo publikováno šest případů s prokázanou high-grade transformací s velice agresivním chováním, invazí do okolních orgánů, výraznou jadernou pleomorfií, vysokou mitotickou aktivitou a komedo nekrotizacemi (88, 89, 135, 136).

Imunohistochemicky je SC difúzně pozitivní s cytokeratiny CK7, CK8, CK 18, CK 19, S100 proteinem, vimentinem a STAT5a, příznačná je difúzní pozitivita s mammaglobinem (MGA), SOX10 a GATA3 a negativita s markerem DOG1, jehož pozitivita se typicky vyskytuje u acinického karcinomu (obrázek 15) (137). Myoepiteliální markery calponin, SMA, CK14, či CK5/6 jsou negativní. Nádorové buňky SC jsou negativní na průkaz p63 a p40, ale některé případy vykazují fokální abnormální p63 pozitivitu in situ komponenty SC (138, 139). Charakteristický imunoprofil v kombinaci s popsanou histomorfologií jsou stěžejní pro diagnózu SC (tabulka 7).



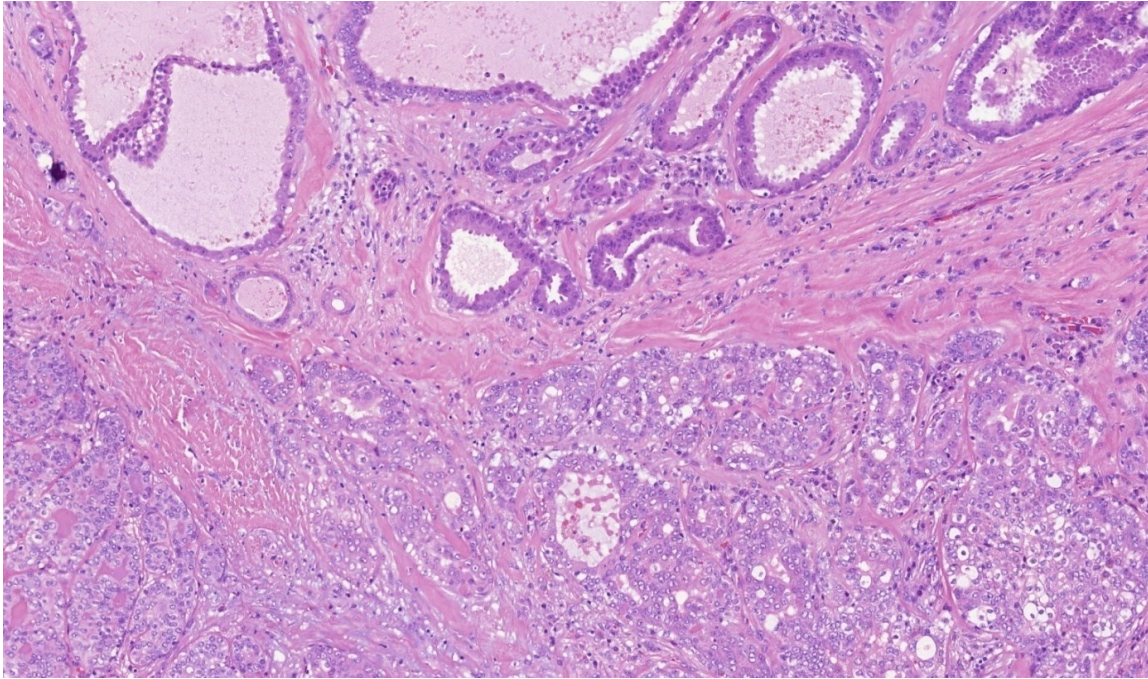
Obrázek 20 – A: Lobulárně uspořádané solidní nádorové čepy oddělené vazivovými septy; B: Detail mikrocystických a tubulárních struktur obsahující sekreční materiál a fokální vakuolizace cytoplasmy v SC.

Pro potvrzení diagnózy sekrečního karcinomu v nejistých a variantních případech je nutný průkaz některé z rekurentních genových translokací. V drtivé většině případů je SC spojen s onkogenní translokací $t(12;15)(q13;p25)$ vedoucí k fúzi mezi geny *ETV6-NTRK3* (76). V minoritní skupině má SC zlom genu *ETV6-*, avšak fúzní partner je jiný než *NTRK3* (140, 141). Nový fúzní partner byl nalezen až s použitím metody masivního paralelního sekvenování (NGS), která objevila fúzi genu *ETV6-RET* (142). Tato translokace je však mnohem vzácnější a vyskytuje se v méně než 5 % případů SC. Po zavedení NGS do běžné vyšetřovací praxe byla recentně objevena v jednom případě SC translokace *ETV6-MET* (143). SC, které obsahují atypické translokace, se většinou chovají agresivněji než SC s klasickou *ETV6-NTRK3* translokací. S rozvojem molekulárně-genetických metod se rozšiřuje i spektrum genových aberací SC.

Po objevení a publikování morfologických, imunohistochemických a molekulárně-genetických znaků SC byly ve velkém prohledávány registry patologických oddělení. Patologové pátrali po atypicky vyhlížejících acinických karcinomech, mukoepidermoidních karcinomech, adenokarcinomech NOS či jiných salivárních nádorových jednotkách, které by mohly být na podkladě prokázané specifické translokace překlasifikovány na SC. Tímto

způsobem byly překlasifikovány desítky karcinomů, které byly většinou původně diagnostikovány jako acinické karcinomy (144, 145). V současné době panuje mezi patology konsenzus, že diagnóza klasického SC může být stanovena na základě histomorfologie a imunoprofilu bez nutnosti molekulárně-genetického vyšetření. Pokud je však přítomna jakákoli odchylka od typických histomorfologických znaků či imunoprofilu, je molekulárně-genetické vyšetření nezbytné k potvrzení diagnózy.

Intraduktální karcinom (IC) (8500/2) je nově přijatý název pro nádory, které byly dříve označovány jako low-grade intraduktální karcinom, kribriformní cystadenokarcinom či low-grade salivární duktální karcinom (146). Jde o nízce maligní, zpravidla intraduktálně či intracysticky rostoucí karcinom. Jedná se o poněkud kontroverzní jednotku, ne jenom kvůli terminologii, ale také kvůli jejímu nejasnému vztahu k salivárnímu duktálnímu karcinomu (SDC) (147). SDC je morfologicky high-grade (HG), agresivně se chovající, invazivní a metastazující karcinom, přestože byly popsány vzácné případy čistě *in situ* SDC (148). Na druhou stranu byly reportovány případy invazivních IC s pozdním metastazováním (149). Klinicky se v naprosté většině případů IC jedná o dobře ohraničený, expanzivně rostoucí nádor, který je nízce maligní a má většinou dobrou prognózu. Histologicky má IC blandní vzhled a podobá se prekancerózním lézím prsu, jako jsou duktální karcinom *in situ* (DCIS), či atypická duktální hyperplázie (147). Při malém zvětšení je v IC patrná rozmanitá architektura s řadou růstových variant. Popisovány jsou solidní, cystické a kribriformní ostrůvky nádorových buněk, které mají na svém okraji zachovalou vrstvu myoepiteliálních buněk, které je možno imunohistochemicky ozřejmit barvením myoepiteliálními markery. Vlastní nádorové buňky jsou však s myoepiteliálními markery negativní. Při větším zvětšení jsou patrná uniformní oválná jádra s jemným chromatinem a eosinofilní cytoplasmou, větší nukleární polymorfie většinou chybí. Méně často může být patrná apokrinní diferenciace (obrázek 19) (149).



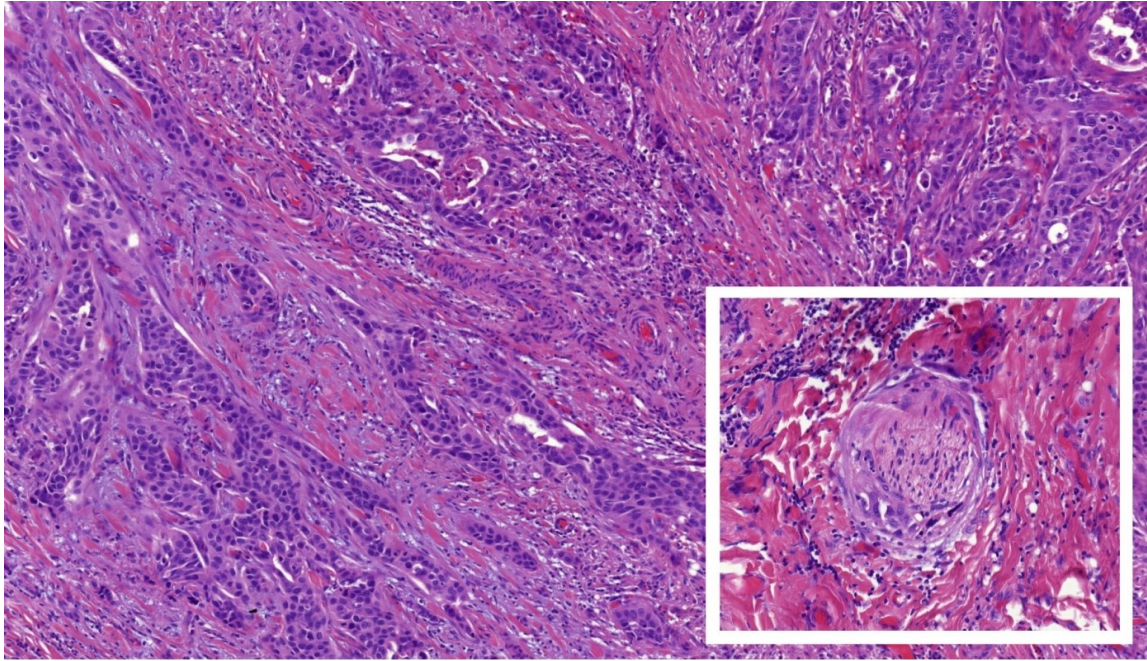
Obrázek 21 – V horní části obrázku je patrná apokrinní diferenciacie v IC.

V imunohistochemickém barvení je vedle positivity myoepiteliálních markerů (CK14, p63, calponin, SMA) na okraji neinvazivních nádorových ostrůvků, patrná pozitivita pro cytokeratiny (AE1/3, CK7, CK8, CK18), mamaglobin, S100 protein, SOX10 či EMA v duktálních buňkách. Partie s apokrinní diferenciací jsou pozitivní na přítomnost androgenních receptorů (AR). Pozitivita myoepiteliálních markerů však v invazivních částech tumoru zcela chybí (150). Imunoprofil IC včetně nízké proliferační aktivity, je tedy velmi podobný imunoprofilu SC. Navíc v některých případech je velmi podobná i histomorfologie. V takových to případech je finální diagnóza možná až na základě výsledků molekulárně-genetického testování.

Molekulárně-genetickým vyšetřením se v nedávné době podařilo objevit téměř v polovině (47 %) případů IC zlom genu *RET* a v jednom případě dokonce translokaci *NCOA4-RET* (151). Oba geny leží poměrně blízko sebe na stejném chromozomu 10, což znesnadňuje jejich detekci metodou FISH. Přítomnost translokace *NCOA4-RET* v IC byla pomocí NGS potvrzena v navazující studii skupiny prof. Skálové, která objevila ve dvou případech vyšetřovaných IC novou rekurentní translokaci *TRIM27-RET* v nádorech s apokrinní diferenciací (152). V žádném IC nebyl zatím nalezen zlom genu *ETV6*, a tím jej lze spolehlivě

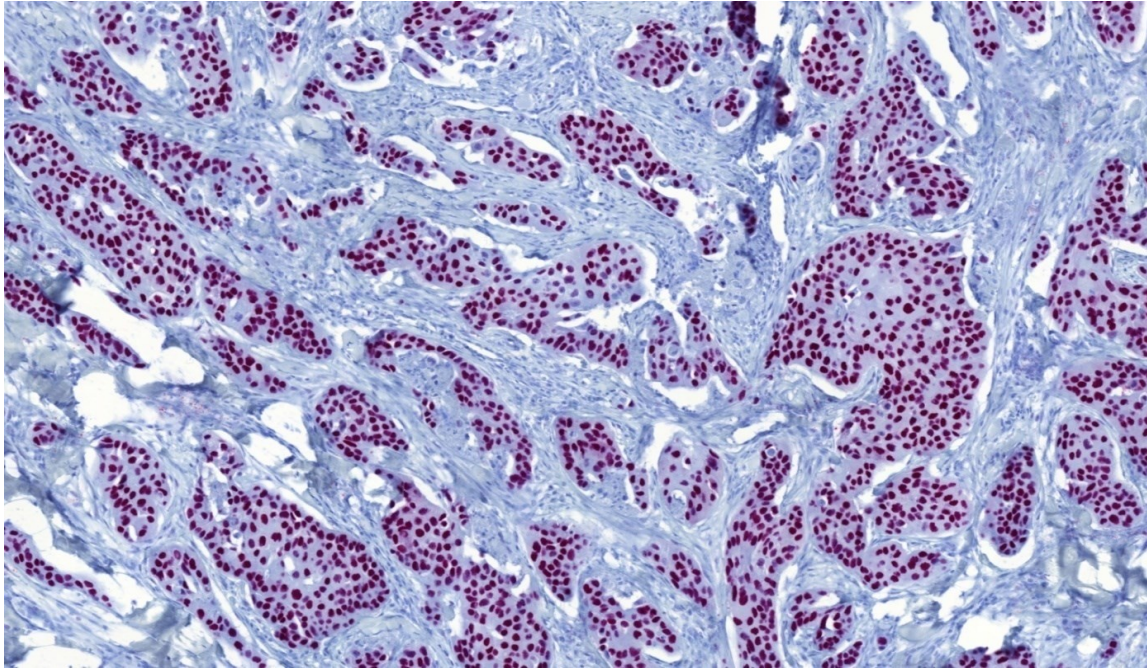
odlišit od sekrečního karcinomu, se kterým může sdílet jak histomorfologii, tak imunoprofil, což je přínosné například při FNA (153).

Salivární duktální karcinom (SDC) (8500/3) (154) je vysoce maligní karcinom, který se svou morfologií podobá duktálnímu karcinomu prsu (155). Tento agresivní karcinom vzniká buď de novo, nebo maligním zvratem původně benigního pleomorfního adenomu, tzv. karcinom ex pleomorfní adenom (156, 157). Pacienti jsou typicky starší muži s anamnézou rychle rostoucí rezistence především v příušní žláze, která může být i bolestivá a doprovázená periferní obrnou lícního nervu (158). Za předpokladu, že SDC vyrůstá z preexistujícího pleomorfního adenomu, je často v anamnéze dlouhotrvající nebolestivá rezistence, která se promptně zvětšila. SDC má ze všech salivárních malignit nejhorší krátkodobou prognózu, kdy 65 % pacientů umírá do 4 let od první diagnózy, lokální recidivy se vyskytují až v 1/3 případů a vzdálené metastázy až v polovině případů (159). Histologicky lze od sebe odlišit intraduktální komponentu napodobující IC, avšak s komedo nekrotizacemi, high-grade cytologickými znaky a s papilárně kribriformním způsobem růstu, od invazivní komponenty tvořené pruhy buněk infiltruující stroma a indukující výraznou desmoplastickou reakci (obrázek 22). Nádorové buňky jsou apokrinního a onkocytoidního vzhledu s abundantní eosinofilní cytoplasmou a velkými pleomorfními jádry s hrubým chromatinem, prominujícím jadérkem a vysokou mitotickou aktivitou. Hojně je přítomna lymfovaskulární a perineurální invaze (obrázek 22). Najdou-li se v materiálu okrsky vzhledu pleomorfního adenomu, je zřejmé, že se jedná o karcinom ex pleomorfní adenom, ze kterého vyrůstá zhruba polovina případů SDC (160).



Obrázek 22 – Trabekulární formace infiltrující stroma s výraznou desmoplastickou reakcí. V pravém dolním rohu je perineurální invaze, která je v SDC velmi častá.

V imunohistochemii je typický vysoký Ki-67 a pozitivita androgenních receptorů (AR) (obrázek 23) a overexprese *Her-2/neu* genu, jehož amplifikace je přítomna až u 30 % případů SDC a potvrzuje tak podobnost s duktálním karcinomem prsu (161, 162, 163). Geneticky potvrzená overexprese genu *Her-2/neu* je nepříznivým prognostickým markerem, avšak je léčebně ovlivnitelná látkou bevacizumab (164, 165). Dále je přítomná pozitivita cytokeratinů (CK7, CK19) a EMA a negativita myoepiteliálních markerů S100, p63, CK14, SMA či calponinu.



Obrázek 23 – Difúzní silná nukleární pozitivita androgenních receptorů v nádorových čepch SDC.

Molekulárně-genetické pozadí SDC je velmi heterogenní. Vedle amplifikace genu *Her-2/neu* bylo v literatuře popsáno široké spektrum molekulárních onkogenních aberací v genech *TP53*, *PIK3CA*, *HRAS*, *PTEN* (166, 167, 168). Méně často pak byly detekovány mutace v genech *BRAF*, *FBXW7*, *ATF1* či *NF1*. Recentně byly popsány solitérní případy obsahující translokace *ETV6-NTRK3*, *BCL6-TRADD* a *ABL1-PPP2R2C* (169). Jak již bylo zmíněno, zhruba polovina SDC vychází z preexistujícího pleomorfního adenomu, který je z molekulárně-genetického hlediska charakterizován až v 60 % přítomností zlomu v genu *PLAG1* a v 30 % zlom v genu *HMGA2* (170, 171). Fúze zaujímavý jeden z těchto dvou genů se tedy vyskytuje ve více jak 90 % pleomorfních adenomů a stejně tak i karcinomů z něj vznikajících. Tento nález je pro diagnózu specifický a může přispět v diferenciálně diagnostické rozvaze, kdy je v úvahu carcinoma ex pleomorphic adenoma, nebo jiný de novo vzniklý karcinom (172, 173). Mutace genů *PLAG1* i *HMGA2* mohou být vysoce specificky detekovány též imunohistochemicky (174, 175).

2.5. Genetické profily vybraných nádorů slinných žláz

Vzhledem k histomorfologické variabilitě maligních nádorů slinných žláz se jako slibný diagnostický nástroj jeví užití molekulárně-genetických metod ke stanovení rekurentních nádorových mutací. V posledních letech došlo k objevení mnoha významných genetických translokací, které jsou specifické pro určité typy salivárních nádorů (107). Tyto nově objevené rekurentní translokace postupně zcela mění pohled na diferenciální diagnostiku a dostávají se do popředí při utváření taxonomie nádorů. Nádorové mutace obecně mohou v některých případech sloužit i jako prognostický marker, kdy přítomnost nebo nepřítomnost určuje agresivitu onemocnění (73,121), nebo naopak mohou být čistě diagnostickým nástrojem bez prognostického významu (49,76). V neposlední řadě je nutno zmínit nádory s translokacemi, které jsou potenciálně léčebně ovlivnitelné moderními terapiemi (76, 124, 152). Doposud nalezené významné molekulární alterace v maligních nádorech slinných žláz jsou přehledně uvedeny v tabulce 10.

Typ nádoru	Chromozomální alterace	Fúzní partneři/ molekulární alterace	Prevalence (%)
Mukoepidermoidní karcinom (MEC)	t(11;19)(q21;p13) t(11;15)(q21;q26)	<i>CRTC1-MAML2</i> (43) <i>CRTC3-MAML2</i> (46)	40–80 5
Adenoidně cystický karcinom (ADC)	t(6;9)(q22-23;p23-24) t(8;9)	<i>MYB-NFIB</i> (62) <i>MYBL1-NFIB</i> (67)	25–80 10–20
Polymorfní adenokarcinom (PAC)			
Klasická varianta („PLGA“)	14q12	Hotspot activating <i>PRKD1</i> somatic point mutation (E710D) (105)	20
Kribriformní varianta (CAMGS)	t(1;14)(p36.11;q12) t(X;14)(p11.4;q12)	<i>ARID1A-PRKD1</i> <i>DDX3X-PRKD1</i> , <i>PRKD2</i> a <i>PRKD3</i> translokace (106)	24 13 16
Světlobuněčný karcinom (CCC)	t(12;22)(q21;q12)	<i>EWSR1-ATF1</i> (115) <i>EWSR1-CREM</i> (122)	80–90 1
Sekreční karcinom (SC)	t(12;15)(p13;q25) t(12;X)	<i>ETV6-NTRK3</i> (76) <i>ETV6-RET</i> (142) <i>ETV6-MET</i> (143)	95–98 2–5 1
Intraduktální karcinom (IC)	inv(10)(q11.21q11.22)	<i>NCOA4-RET</i> (151) <i>TRIM27-RET</i> (152)	<5 1
Salivární duktální karcinom (SDC)	17q21.1 3q26.32	amplifikace genu <i>Her2</i> mutace genu <i>PIK3CA</i>	20–40 20

Tabulka 10 – Prokázané klíčové molekulární alterace ve vybraných maligních nádorech slinných žláz.

2.6. WHO klasifikace & staging

V roce 2017 vyšla 4. WHO klasifikace nádorů hlavy a krku, která v kapitole nádorů slinných žláz doznala jen malých změn (34). Ač jsou tendence autorů „modré knihy“ v posledních letech spíše ve smyslu redukce počtu nádorových jednotek, jeden objev se přeci jen zasloužil o zvýšení počtu maligních nádorových jednotek na 21. Jedinou nově přidanou maligní nádorovou jednotkou ve 4. edici WHO klasifikace nádorů hlavy a krku je tumor známý jako MASC (*Mammary Analogue Secretory Carcinoma*), který byl do klasifikace zařazen pod názvem sekreční karcinom slinných žláz (123).

Další změny ve WHO jsou už menších rozsahů a týkají se především nomenklatury (176). Hyalizující světlobuněčný karcinom byl přejmenován pouze již na světlobuněčný karcinom vzhledem k možné absenci hyalinizace stromatu (108). Polymorfní nížce maligní karcinom byl přejmenován na polymorfní adenokarcinom (PAC), pod který byla zahrnuta i kontroverzní podjednotka, tzv. kribriformní varianta, též známá jako kribriformní adenokarcinom jazyka a malých slinných žláz (*Cribriiform adenocarcinoma of minor salivary gland origin - CAMSG*) (93). Název nádorové jednotky intraduktální karcinom byl sice poprvé použit v roce 1983 (177), avšak do WHO klasifikace se dostal až nyní a sdružuje pod sebe terminologicky nesourodou jednotku, pro kterou bylo v minulosti vyhrazeno několik názvů, jako například low-grade intraduktální karcinom, kribriformní cystadenokarcinom či low-grade salivární duktální karcinom (146).

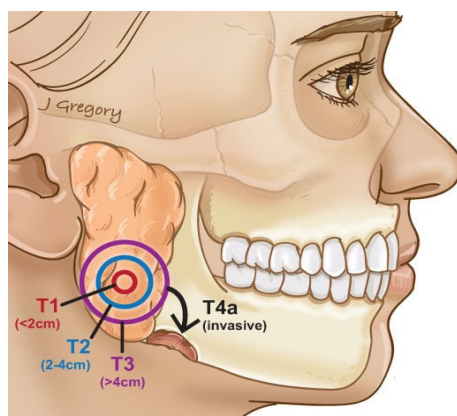
2.6.1. Staging nádorů slinných žláz

Pro určení pokročilosti nádorů slinných žláz se užívá klasické TNM klasifikace navržené v 8. vydání UICC (*Union for International Cancer Control*) z roku 2017 (178). Pooperační patologická TNM se využívá k určení dalšího terapeutického postupu a má i prognostický význam. Stejně jako k patologické evaluaci primárního nádoru (pT) je nutná jeho resekce, tak k hodnocení metastatického postižení regionálních mízních uzlin (pN) je nutná krční disekce. Stejně to platí i pro ohodnocení vzdálených metastáz (pM), které musí být mikroskopicky vyšetřeny. Klasifikace pokročilosti onemocnění, která byla vytvořena bez histologického vyšetření, na podkladě klinického nálezu, zobrazovacích metod či jinak, je považována za klinickou klasifikaci (cTNM). Určení primárního tumoru (pT) (obrázek 24),

regionálních mízních uzlin (pN) a vzdálených metastáz (pM) je uvedeno v tabulkách 11a, 11b a 11c.

Tx	Primární nádor nelze hodnotit
T0	Bez známek primárního nádoru
T1	Nádor do velikosti 2 cm v největším rozměru, bez šíření mimo parenchym
T2	Nádor větší než 2 cm, ne však více než 4 cm v největším rozměru. Bez šíření mimo parenchym
T3	Nádor větší než 4 cm a/nebo nádor se šíří mimo parenchym
T4a	Nádor invaduje kůži, mandibulu, zevní zvukovod a/nebo n. facialis
T4b	Nádor invaduje bázi lební a/nebo pterygoidní výběžky kosti klínové a/nebo obrůstá a. carotis

Tabulka 11a – Patologická evaluace primárního nádoru (pT). Grafické zobrazení pT (obrázek 22).



Obrázek 24 – Grafické vyobrazení pT. (Zdroj: Head and Neck Cancer Guide)

NX	Regionální mízní uzliny nelze hodnotit
N0	Regionální mízní uzliny bez metastáz
N1	Metastáza v jedné stejnostranné mízní uzlině, do 3 cm v největším rozměru
N2	Metastázy podle následujícího popisu:
N2a	Metastáza v jedné stejnostranné mízní uzlině větší než 3 cm, ne však více než 6 cm v největším rozměru
N2b	Metastázy ve více stejnostranných mízních uzlinách, žádná není větší než 6 cm v největším rozměru
N2c	Metastázy v oboustranných či druhostranných mízních uzlinách, žádná není větší než 6 cm v největším rozměru
N3	Metastáza/metastázy v mízní uzlině větší než 6 cm v největším rozměru

Tabulka 11b – Patologická evaluace regionálních mízních uzlin (pN). Pro histologické hodnocení vzorků ze selektivní krční disekce je nezbytné hodnotit minimálně 6 mízních uzlin. Pro hodnocení vzorků z radikální, či modifikované krční disekce je za potřebí minimálně 10 mízních uzlin.

MX	Vzdálené metastázy nelze hodnotit
M0	Bez vzdálených metastáz
M1	Vzdálené metastázy

Tabulka 11c – Patologická evaluace vzdálených metastáz (pM).

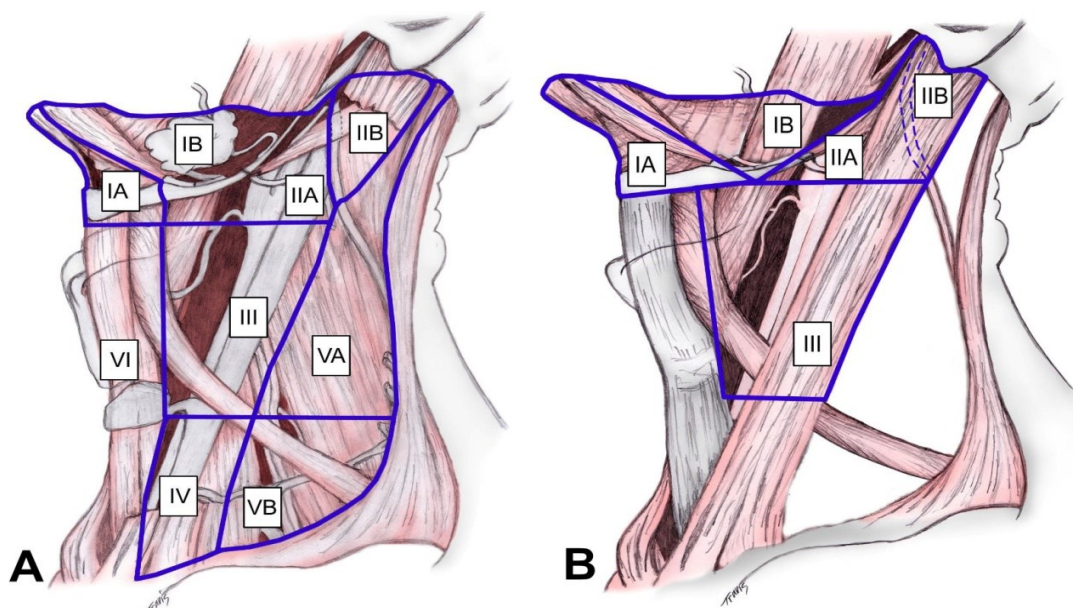
Dle výsledků pTNM se dále stanoví pokročilost onemocnění maligním nádorem slinných žláz. Kritéria pro určení stádia jsou uvedena v tabulce 12.

Stádium	T	N	M
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T3	N0	M0
	T1/T2/T3	N1	M0
IVA	T4a	N0/N1	M0
	T1/T2/T3/T4a	N2	M0
IVB	T4b	Jakékoliv N	M0
	Jakékoliv T	N3	M0
IVC	Jakékoliv T	Jakékoliv N	M1

Tabulka 12 – Určení stádia onemocnění na základě výsledků pTNM.

2.7. Léčba

Všechny nádory slinných žláz, benigní i maligní, jsou indikovány k chirurgickému odstranění. V případě postižení velkých slinných žláz se provádí úplné nebo částečné odstranění žlázy, eventuálně odstranění povrchového listu parotis. U jasně benigních a dobře ohraničených nádorů jako jsou monomorfní adenomy (bazocelulární adenom, onkocytom) a Warthinův tumor často postačí prostá enukleace léze. Ta se však nedoporučuje pro odstranění pleomorfního adenomu vzhledem k jeho tendencím k lokálním recidivám. V případě operabilního maligního nádoru se po odstranění primárního nádoru přistupuje k provedení krční disekce vždy, když jsou klinicky přítomny uzlinové metastázy (cN+). Při primárním postižení příušní žlázy je indikovaná krční disekce v rozsahu oblastí I–V (obrázek 25A) na postižené straně, přičemž nejčastěji je postižena oblast II. Při postižení podčelistní a podjazykové žlázy se provádí odstranění cervikálních struktur menšího rozsahu, tzv. selektivní krční disekce, která je v rozsahu oblastí I–III (obrázek 25B). Komplikovanější situace nastává při klinické nepřítomnosti metastáz v krčních lymfatických uzlinách (cN0). Přístup k těmto pacientům není jednotný, a proto je v současné době nejčastěji přistupováno k elektivní krční disekci za předpokladu přítomnosti rizikových faktorů, mezi které patří high-grade malignita, perineurální a perivaskulární šíření či pozitivní resekcční okraje primárního tumoru. V těchto případech je prováděna disekce v rozsahu úrovní II, III a Va při primárních karcinomech parotis a v úrovních I-III při postižení submandibulární a sublinguální žlázy (30).

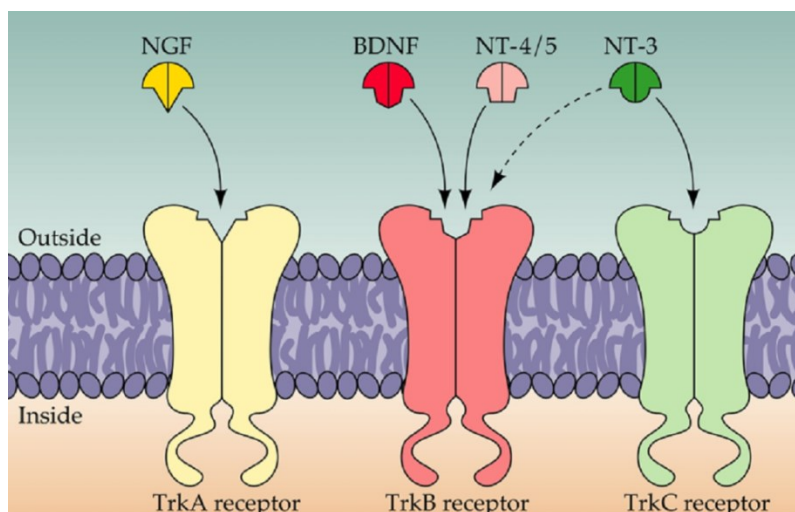


Obrázek 25 – A: Radikální krční disekce oblastí I–V; B: Selektivní krční disekce včetně oblasti IV při primárním postižení jazyka. (Zdroj: Medscape)

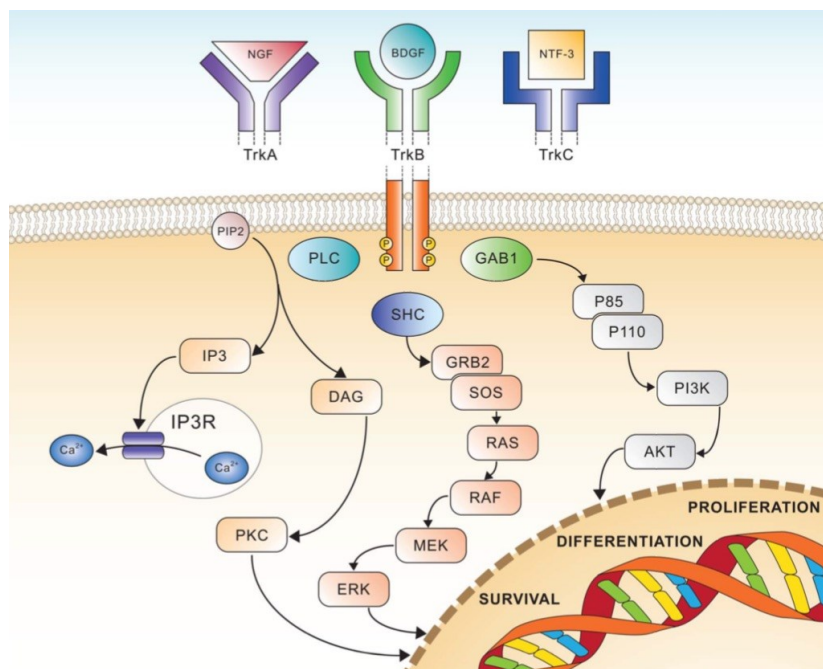
Vzhledem k tomu, že nádory slinných žláz jsou radiosenzitivní, je radioterapie metodou volby u inoperabilních nádorů z důvodu lokální pokročilosti, či celkových příčin. Samotná radioterapie však zdaleka nedosahuje takových výsledků jako v případech, kdy je kombinována s operačním řešením. Adjuvantní terapie je vždy indikována u high-grade karcinomů a pokročilých stádií (T3 a T4). Pro časná stadia malignity (T1 a T2) a low-grade karcinomy, je k ozařování přistupováno v případě mikroskopického dosahu do resekcčního okraje, přítomnosti cervikálních metastáz, lymfovaskulární invaze a perineurální propagace nádorových buněk. Chemoterapie je indikována pouze v rámci paliativní péče pokročilých stádií a má jen velmi omezený účinek.

Zvýšená pozornost se v posledních letech věnuje molekulárnímu pozadí nádorů a tomu, jak tyto poznatky využít ne jenom k diagnostickým, ale i k terapeutickým účelům. Zvýšená exprese některých receptorů či přítomnost specifických genových translokací je potencionálním terapeutickým cílem biologické léčby. Zatímco například v terapii karcinomu prsu je biologická léčba již dlouhá léta neodmyslitelnou součástí komplexní onkologické péče, v terapii nádorů slinných žláz se jedná o novinku. To je dáno nejenom nesrovnatelně nižší incidencí nádorů slinných žláz, ale i tím, že genové testování nádorů této lokalizace zažívá „boom“ až v posledních letech (107). Potenciál hledání nových genových aberací podpořil právě nedávný objev translokace *ETV6-NTRK3* (76) v sekrečním karcinomu mamárního typu, která se však nachází i v jiných lokalizacích (124, 128-132). Gen *NTRK3* patří společně s geny *NTRK1* a *NTRK2* do rodiny protoonkogenů *NTRK* (Neurotrophic Tyrosine Kinase), které kódují transmembránové receptory s tyrosinkinázovou aktivitou TrkA, TrkB a TrkC. Tyto receptory se od sebe liší pouze ve struktuře extracelulární komponenty, na které se váží lehce odlišné proteinové ligandy patřící mezi tzv. neurotrofiny (obrázek 26). Výsledkem fúze genu *ETV6* na chromozomu 12 a genu *NTRK3* na chromozomu 15 dochází v nádorových buňkách k onkogenní aktivaci transmembránového receptoru s tyrosinkinázovou aktivitou (TrkC) a zapříčiní tak aktivaci signálních drah, což vede k autonomní proliferaci a nesmrtelnosti nádorových buněk (obrázek 27). V současné době se blíží ke konci klinická studie selektivního inhibitoru tyrozinkinázové aktivity jménem **Entrectinib**, který navázáním na intracelulární doménu receptoru má potenciál cíleně zastavit proliferaci nádorových buněk. Vedle genů *NTRK1*, 2 a 3 tento lék cíleně inhibuje i geny kódující tyrosinkinázové receptory *ALK* a *ROS1*. Lék je užíván perorálně a prochází skrz

hematoencefalickou bariéru, proto jsou k léčbě indikováni právě pacienti v pokročilých stádiích onemocnění včetně těch s mozgovými metastázami (179, 180).



Obrázek 26 – Znárodnění struktury Trk receptorů, které se od sebe liší pouze vazebným místem pro neurotrofinový ligandy, zatímco intracelulární komponenta je u všech tří receptorů shodná. (Zdroj: NTRK fusions)



Obrázek 27 – Aktivace signálních drah vedoucí ke zvýšené proliferaci, diferenciaci a přežívání buněk, ke které je za normálních okolností nutná aktivace transmembránového receptoru TrkA, TrkB nebo TrkC navázáním ligandu ze skupiny neurotrofinů. (Zdroj: NTRK fusions)

Vedle klasické translokace genů *ETV6-NTRK3* byla mezi sekrečními karcinomy objevena podskupina s odlišnými fúzními partnery (142, 143). Malá část sekrečních karcinomů obsahuje specifickou translokaci *ETV6-RET* (142). Genové translokace, kde je gen *RET* jedním z fúzních partnerů, byly nově popsány i v intraduktálním karcinomu slinných žláz, kde téměř polovina případů obsahuje translokace genů *NCOA4-RET*, a nově byly popsány dva případy s translokací genů *TRIM27-RET* (151, 152). Aberace týkající se genu *RET* byly doposud objeveny minimálně v souvislosti se dvěma histologickými typy karcinomů slinných žláz, což z něj dělá potencionální cíl biologické léčby (181). Stejně jako geny *NTRK1-3* i gen *RET* kóduje transmembránový receptor s tyrosin kinázovou aktivitou. I tento receptor je potencionálně léčebně ovlivnitelný inhibitory tyrosinkinázové aktivity jménem **Loxo 292**, kterému byla na podzim roku 2018 udělena licence americké FDA.

Dalším možným terapeutickým postupem je využití hormonálních receptorů u nádorů, u kterých byla prokázána jejich přítomnost v imunohistochemickém vyšetření. Mezi nádory slinných žláz má z tohoto hlediska zásadní postavení salivární duktální karcinom, jehož nádorové buňky na svém povrchu zvýšeně exprimují androgenní receptory (AR) a jsou tedy hormon dependentním nádorem. Cílem hormonální terapie je navázání molekuly antiandrogenu (**Bicalutamid**) na povrchové androgenní receptory, spustit jejich degeneraci a tím zabránit jejich další vazbě s androgeny. Tím se zamezí další stimulaci růstu nádorových buněk. Tato terapie je rezervována pro pacienty s lokálně pokročilými nebo diseminovanými karcinomy.

Vedle hormonálních receptorů je SDC spojen jako jediný nádor slinných žláz s amplifikací genu *Her-2/neu* (*human epidermal growth factor receptor-2*), též známého jako c-erB-2. Jeho amplifikace je známá především v souvislosti s karcinomem prsu, kde se vyskytuje až ve 30 % invazivních lézí (182). Jedná se o protoonkogen, který je lokalizován na dlouhém raménku chromozomu 17 (q11.2-q12) a spadá do rodiny genů kódujících receptory pro epidermální růstové faktory. *Her-2/neu* gen kóduje transmembránový protein s tyrosinkinázovou aktivitou a následkem jeho amplifikace dochází přes řadu regulačních kaskád ke zvýšené proliferaci a přežívání nádorových buněk. Vzniklý protein je exprimovaný ve zvýšené míře na membránách nádorových buněk a lze jej imunohistochemicky i cytogeneticky detekovat (183). Přestože je amplifikace genu *Her-2/neu* nepříznivým prognostickým markerem (184, 185), může být cíleně terapeuticky ovlivněn monoklonálními

protilátkami. **Trastuzumab**, prodáváný pod jménem Herceptin, je rekombinantní humanizovaná IgG1 protilátka cílená proti extracelulární doméně transmembránového receptoru HER. Vazbou na subdoménu IV brání utváření homodimerů s dalším HER2 receptorem a takto inhibuje intracelulární signalizaci zprostředkovanou HER2 a stimuluje na protilátkách dependentní buněčnou cytotoxicitu. Léčba Trastuzumabem v kombinaci s chemoterapií (pacitaxel, carboplatina) přináší značný benefit a zvyšuje pacientovo celkové přežití (165).

3. Vlastní výzkum

Vlastní výzkum je rozdělen do tří částí. První část se zabývá diagnostikou nádorů slinných žláz s využitím tzv. „dvoustupňové screeningové metody“, která ve dvou na sebe navazujících krocích detekuje translokace v genech *NTRK1*, *NTRK2*, *NTRK3*, *ALK* a *ROS1*. Tento výzkum staví na znalostech z odvětví molekulární patologie, která v současné době prodělává obrovský rozvoj, a na objevení velkého množství nádorově specifických mutací (107), především pak na objevu sekrečního karcinomu slinných žláz (76). Druhá část je zaměřená na cytologickou diagnostiku nádorů slinných žláz, konkrétně pak na diagnostiku sekrečního karcinomu metodou tenkojehlové aspirace a na jeho kategorizaci podle Milánské klasifikace pro reportování salivárních cytologií. Ve třetí části jsou pak krátce komentovány další spoluautorské publikace přímo se týkající tématu disertační práce.

3.1. Specifický dvoustupňový screening rekurentních translokací karcinomů slinných žláz

3.1.1. Cíle

Ve světle nedávných objevů rekurentně se vyskytujících onkogenních translokací nejen v nádorech slinných žláz došlo i k velkému rozvoji v odvětví cílené terapie. Na základě objevu translokace *ETV6-NTRK3*, která se ukázala být diagnostická pro sekreční karcinom slinných žláz, započal v Bioptické laboratoři s.r.o. plošný screening maligních nádorů různějších lokalizací. Cílem tohoto prospektivního screeningu je vyhledat nádory, které obsahují doposud nepopsané translokace a které by mohly být potenciálně léčitelné inhibitory tyrosin-kinázové aktivity. Screening byl zacílen na translokace genů *NTRK1*, *NTRK2*, *NTRK3*, *ALK* nebo *ROS1*, jejichž onkogenní aktivace je právě terapeuticky ovlivnitelná lékem Entrectinib. Jejich hledání je však velmi náročné a šance, že některý nádor obsahuje konkrétní hledanou translokaci genů *NTRK1*, *NTRK2*, *NTRK3*, *ALK* nebo *ROS1* je velmi nepatrná. Podrobit všechny nádory molekulárně-genetickému testování by však bylo extrémně náročné, a to jak z ekonomického, tak personálního hlediska. Z těchto důvodů se jako nejvhodnější jeví tzv. dvoustupňový screening, který vychází z metodiky navržené Murphyho pracovní skupinou (186). Tento screening probíhá v Bioptické laboratoři od listopadu 2016.

3.1.2. Materiál a metodika

Do dvoustupňového screeningu byly zařazeny všechny invazivní maligní nádory z rutinní bioptické práce s výjimkou kolorektálního karcinomu, basocelulárního karcinomu kůže a lymfomů. Zvláštní důraz byl dán na vyšetření malignit z oblasti slinných žláz, štítné žlázy, plic, pankreatu, měkkých tkání a glioblastomu mozku, neboť v těchto lokalizacích byly v literatuře s větší četností popisovány nádory podmíněné onkogenní translokací genů *NTRK1*, *NTRK2* nebo *NTRK3* (obrázek 28).

Table 1 Reported gene fusions involving NTRK genes along with the corresponding tumour

Gene fusion	Cancer type	Authors (year)
NTRK1		
LMNA-NTRK1	Colorectal Soft tissue sarcoma Spitzoid melanomas AYA sarcoma Congenital infantile fibrosarcoma	Sartore-Bianchi <i>et al</i> (2016) Doebele <i>et al</i> (2015) Wiesner <i>et al</i> (2014) Morosini <i>et al</i> (2015) Wong <i>et al</i> (2015)
TPM3-NTRK1	Colorectal Papillary thyroid carcinomas Glioblastoma	Lee <i>et al</i> (2015), Créancier <i>et al</i> (2015), Ardini <i>et al</i> (2014) Bongarzone <i>et al</i> (1989), Butti <i>et al</i> (1995) Wu <i>et al</i> (2014)
SQSTM1-NTRK1	NSCLC	Farago <i>et al</i> (2015)
NTRK1-SQSTM1	NSCLC	Siena <i>et al</i> (2015)
NFASC-NTRK1	Glioblastoma multiforme	Frattini <i>et al</i> (2013), Kim <i>et al</i> (2014)
BCAN-NTRK1	Glioblastoma multiforme	Kim <i>et al</i> (2014), Frattini <i>et al</i> (2013)
PPL-NTRK1	Thyroid carcinoma	Farago <i>et al</i> (2015)
RFWD2-NTRK1	Large cell neuroendocrine tumour (lung)	Fernandez-Cuesta <i>et al</i> (2014)
CD74-NTRK1	Lung adenocarcinomas	Vaishnavi <i>et al</i> (2013)
MPRIP-NTRK1	Lung adenocarcinomas	Vaishnavi <i>et al</i> (2013)
RABGAP1L-NTRK1	ICC	Ross <i>et al</i> (2014)
TFG-NTRK1	Thyroid carcinomas	Greco <i>et al</i> (1995)
TP53-NTRK1	Spitzoid melanomas	Wiesner <i>et al</i> (2014)
NTRK2		
Unknown-NTRK1	Appendiceal adenocarcinoma	Braghiroli <i>et al</i> (2016)
AFAP1-NTRK2	Low-grade glioma	Stransky <i>et al</i> (2014)
AGBL4-NTRK2	Glioblastoma	Wu <i>et al</i> (2014)
NACC2-NTRK2	Pilocytic astrocytomas	Jones <i>et al</i> (2013)
PAN3-NTRK2	Head and neck squamous cell carcinoma	Wu <i>et al</i> (2014)
QKI-NTRK2	Pilocytic astrocytomas	Jones <i>et al</i> (2013)
TRIM24-NTRK2	Lung adenocarcinoma	Wu <i>et al</i> (2014)
VCL-NTRK2	Glioblastoma	Wu <i>et al</i> (2014)
NTRK3		
ETV6-NTRK3	Glioblastoma Glioblastoma MASC Ductal carcinoma Fibrosarcoma Congenital mesoblastic nephroma Radiation-associated thyroid cancer AML GIST MASC of salivary gland Papillary thyroid cancer Colorectal	Zhang <i>et al</i> (2013) Wu <i>et al</i> (2014) Tognon <i>et al</i> (2002), Ito <i>et al</i> (2015), Del Castillo <i>et al</i> (2015) Makretsov <i>et al</i> (2004), Arce <i>et al</i> (2005), Lagree <i>et al</i> (2011), Pinto <i>et al</i> (2014) Moreiro <i>et al</i> (2004), Punnett <i>et al</i> (2000) Watanabe <i>et al</i> (2002) Leeman-Neill <i>et al</i> (2014) Kralik <i>et al</i> (2011), Eguchi <i>et al</i> (1999), Knezevich <i>et al</i> (1998) Brenca <i>et al</i> (2015) Urano <i>et al</i> (2015), Skàlovà <i>et al</i> (2015) Leeman-Neill <i>et al</i> (2014), Seungbok Lee <i>et al</i> (2014) Hechtman <i>et al</i> (2015)
BTBD1-NTRK3	Glioblastoma	Wu <i>et al</i> (2014)

AFAP1, actin filament-associated protein 1; AGL4, ATP/GTP-binding protein-like 4; AML, acute myeloid leukaemia; AYA, adolescents and young adults; BCAN, brevican; BTBD1, BTB (POZ) domain containing 1; CD74, CD74 molecule; ETV6, ets variant 6; GIST, gastrointestinal stromal tumor; ICC, intrahepatic cholangiocarcinoma; LMNA, lamin A/C; MASC, mammary secretory breast carcinoma; MPRIP, myosin phosphatase Rho interacting protein; NACC2, NACC family member 2, BEN and BTB (POZ) domain containing; NFASC, neurofascin; NSCLC, non-small cell lung cancer; PAN3, PAN3 poly(A) specific ribonuclease subunit; PPL, periplakin; QKI, KH domain containing RNA binding; RABGAP1L, RAB GTPase activating protein 1-like; RFWD2, ring finger and WD repeat domain 2, E3 ubiquitin protein ligase; SQSTM1, sequestosome 1; TFG, TRK-fused gene; TP53, tumour protein p53; TPM3, tropomyosin 3; TRIM24, tripartite motif containing 24; VCL, vinculin.

Obrázek 28 – Doposud reportované onkogenní fúze týkající se *NTRK* genů v konkrétních nádorech (187).

Principem dvoustupňové metody screeningu terapeuticky relevantních genových aberací je vyšetřování nádorové tkáně ve dvou na sebe navazujících krocích. V prvním kroku se všechny nádory, splňující výše popsaná kritéria, imunohistochemicky testují směsí protilátek. Tento imunohistochemický koktejl nespecificky detekuje aberace v genech kódujících *NTRK1*, *NTRK2*, *NTRK3*, *ALK* a *ROS1*. Případná imunopozitivita imunohistochemického vyšetření je však značně nespecifická a není vždy dána přítomností

hledané translokace. Proto je nezbytné všechny imunopozitivní případy v druhém kroku screeningu podrobit vysoce specifickému i vysoce senzitivnímu vyšetření metodou masivního paralelního sekvenování (NGS), která spolehlivě ozřejmí eventuální přítomnost hledané genové aberace. Pokud je výsledek NGS pozitivní ve smyslu nálezu translokace v některém z genů *NTRK1*, *NTRK2*, *NTRK3* či *ROS1* a *ALK*, musí tento nález být ještě potvrzen jinou molekulárně-genetickou metodou, což je FISH nebo RT-PCR.

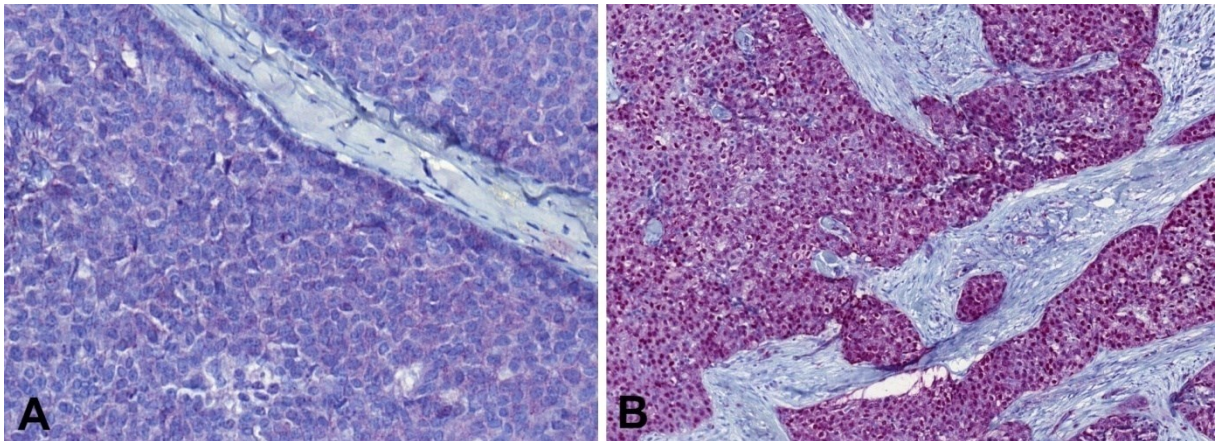
Imunohistochemická analýza užitím koktejlu protilátek byla provedena na tkáni, která byla fixovaná 10% formalinem a zalita do parafinových bloků. Z bloků byly ukrojeny řezy o síle 2 µm a přeneseny na pozitivně nabitá skla (TOMO, Matsunami Glass IND, Japan). Řezy byly deparafinizovány xylenem a zavodněny v sestupné řadě etanolu. Demaskování antigenních epitopů bylo provedeno ponořením do CC1 roztoku (EDTA pufr) o pH 8,6 a zahřátím na teplotu 95°C po dobu 64 minut. Endogenní aktivita peroxidázy byla zablokována ponořením řezů do 3% roztoku peroxidu vodíku v absolutním methanolu na dobu 5 minut. Následně byly přidány primární protilátky, jejichž vlastnosti jsou uvedeny v tabulce 13 a inkubovány v autosteineru Ventana BenchMark ULTRA (Ventana Medical System, Tucson, AZ, USA) při teplotě 37°C na dobu 40 minut. Pro vizualizaci primárních protilátek byla použita alkalická fosfatáza (Ventana Medical Systems). Řezy byly nakonec dobarveny Mayerovým hematoxylinem. Pro každé vyšetření byly použity vhodné pozitivní vnější kontroly.

Protilátka	Klon	Ředění	Zdroj
Pan-Trk	A7H6R	1:20	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
ALK	D5F3	1:50	Cell Signaling, Danvers, MA, USA
ROS1	D4D6	1:50	Cell Signaling, Danvers, MA, USA

Tabulka 13 – Imunohistochemická směs protilátek použitá v prvním kroku dvoustupňové screeningové metody.

Pro hodnocení výsledku imunohistochemického vyšetření byl vytvořen dvou až třístupňový **skórovací systém**, který zohledňuje jednak intenzitu barvení, jednak lokalizaci vyšetřovaného nádoru vzhledem k preferenčním lokalizacím uvedeným výše. Jako skóre 0, tedy negativní, byly vyhodnoceny případy, které nevykazovali žádnou imunoreaktivitu. Skóre 1+ popisuje imunoreaktivitu nádorových buněk, ve kterých je patrná pouze slabá granulární

cytoplasmatická pozitivita alespoň v 70 % nádorových buněk (obrázek 29A). Jako skóre 2+ byly vyhodnoceny vzorky, které vykazovaly silnou jadernou pozitivitu alespoň v 5 % nádorových buněk (obrázek 29B). V případě, že vzorky pocházejí z preferenčních lokalizací (slinné a štítná žláza, měkké tkáně, plíce, slinivka břišní a glioblastom mozku) je jim v případě positivity automaticky přidělen 1 skórovací bod navíc, takže slabě se barvící vzorky odebrané z preferenční lokalizace jsou ohodnoceny jako 2+ a silně se barvící vzorky jako 3+. Všechny případy, které byly jakkoli vyhodnoceny jako pozitivní v imunohistochemickém barvení koktejlem protilátek, byly naskenovány do registru nádorů, včetně příslušného hematoxylinu-eosinu.



Obr 29 – A: Slabá granulární cytoplasmatická pozitivita nádorových buněk; B: silná jaderná pozitivita nádorových buněk.

V druhém kroku dvoustupňového screeningu byly všechny imunopozitivní případy podrobeny molekulárně-genetickému testování vysoce senzitivní a specifickou metodou **masivního paralelního sekvenování (NGS)**:

Příprava vzorku pro NGS

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

CO). Nukleové kyseliny byly kvantifikovány s použitím Qubit Broad Range RNA Kitu (Thermo Fisher Scientific).

Hodnocení integrity RNA a příprava sekvenační knihovny

Pro přípravu knihovny bylo použito 250ng RNA. Aby byla generována míra pro integritu RNA, kontrola kvality RNA byla provedena pomocí PreSeq RNA QC Assay použitím iTaq Universal SYBR Green Supermix (Biorad, Hercules, CA) u všech vyšetřovaných vzorků. Integrita se měří ve formě prahové hodnoty cyklu (Ct value) a nejnižší povolená hodnota Ct byla stanovena na 30 cyklů. Příprava knihovny a kontrola kvality RNA byla provedena podle Archer Fusion Plex protokolu pro platformu Illumina (ArcherDX Inc.). Finální knihovna byla zředěna v poměru 1:100 000 a kvantifikována v 10 μ L směsi podle protokolu Library Quantification pro Illumina knihovny, kdy byla předpokládána délka fragmentů 200 párů bází (KAPA, Wilmington, MA). Koncentrace finální knihovny by se měla pohybovat kolem 200nM. Limit minimální koncentrace, při které může být sekvenování úspěšně provedeno byl stanoven na 50nM.

NGS sekvenování a analýza

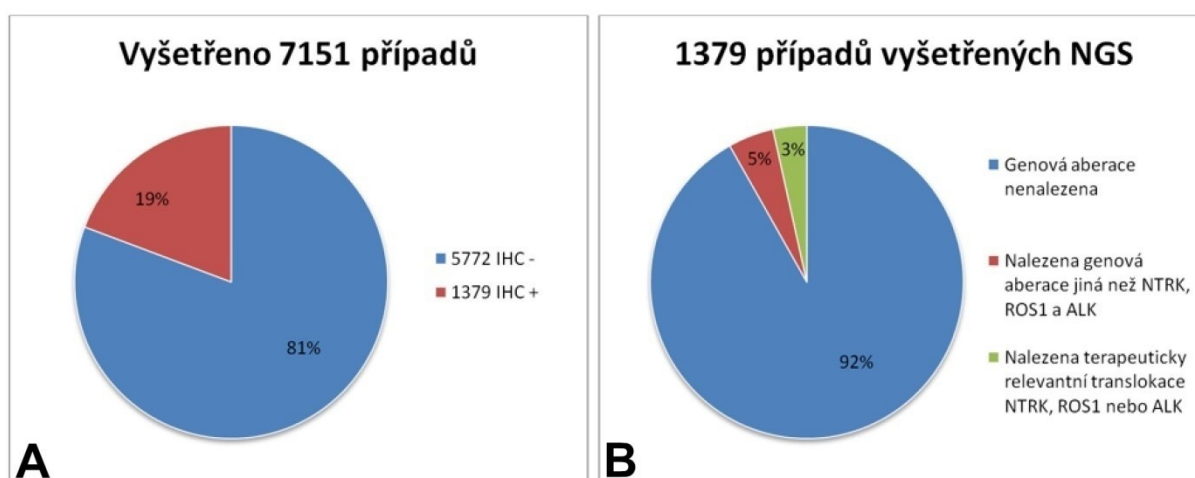
Knihovny byly sekvenovány na sekvenátoru Nextseq 500 (Illumina, San Diego, CA). Knihovny byly ředěny na 4nM a stejné množství všech knihoven bylo smícháno a vloženo do jednoho sekvenačního běhu. Doporučené minimální množství klastrů na jeden vzorek bylo stanoveno na 500 000. Sekvenační knihovna byla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

V případě potvrzení genové translokace v jednom z hledaných genů, je obratem kontaktován klinik odesílající biopsii, kterému je sdělena informace, že nádor jeho pacienta obsahuje terapeuticky ovlivnitelnou nádorovou translokaci a je požádán o sdělení klinických dat ve smyslu klinického stádia onemocnění, podané terapie, či možné recidivy. Po obdržení relevantních klinických informací o stavu pacienta se zhodnotí, zda je vhodný pro zařazení do

klinické studie STARTRK2. Je-li pacient vhodný k zařazení do studie, je mu nabídnuta možnost léčby perorálním inhibítorem tyrosin-kinázové aktivity, Entrectinib (188).

3.1.3. Výsledky

Prospektivní dvoustupňový screening terapeuticky relevantních genových aberací probíhá v Biopstické laboratoři s.r.o. od listopadu 2016. K 22.12.2018 bylo v tomto časovém období vyšetřeno imunohistochemickým koktejlem protilátek detekující aberace v genech *NTRK1*, *NTRK2*, *NTRK3*, *ROS1* a *ALK*, 7151 případů z rutinní biopstické práce i konzultačních biopsií. Imunohistochemické vyšetření bylo pozitivní bez ohledu na skóre v 1379 případech (obrázek 30A). Po provedení molekulárně-genetické analýzy bylo objeveno 109 různých genových aberací v různých lokalizacích a z nich bylo 44 terapeuticky relevantních translokací (obrázek 30B).

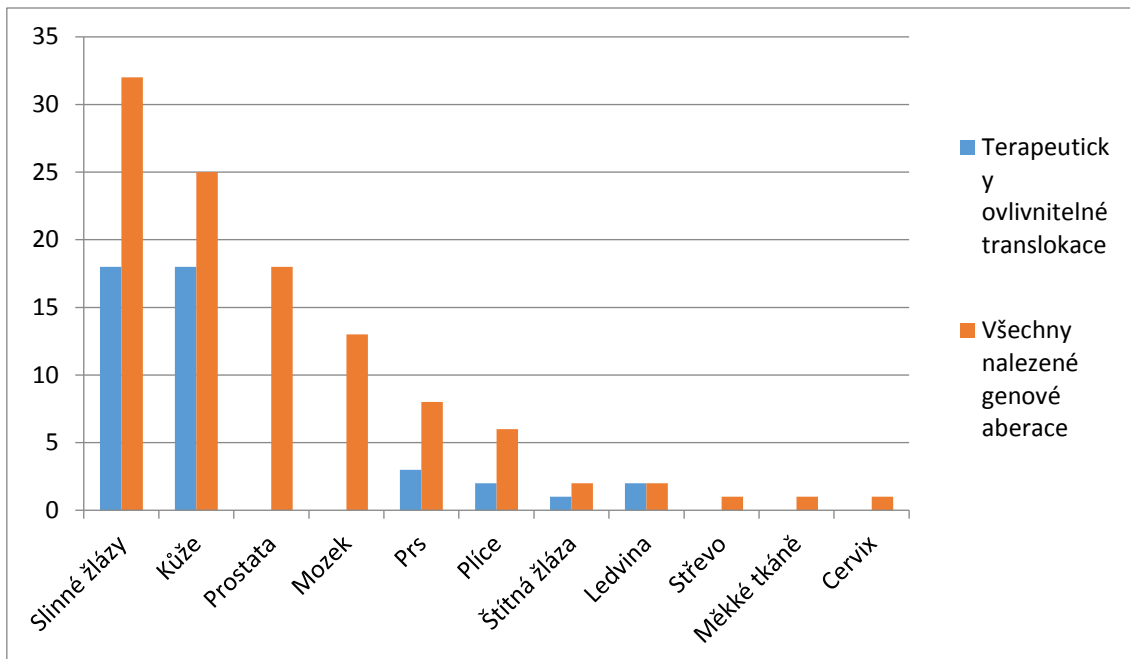


Obrázek 30 – A: Graf vyjadřující poměr imunoreaktivních a imunonegativních vyšetření z celkového počtu 7151 vyšetření. Imunoreaktivních případů bylo 1379 (19 %); B: Z celkového počtu 1379 imunoreaktivních vyšetření, které byly podrobeny molekulárně-genetické analýze metodou NGS, bylo 92 % případů bez nálezu genové aberace. Ve 109 případech (8 %), byla nalezena genová aberace, avšak pouze v 44 případech (3 %) z celkového počtu molekulárně-geneticky vyšetřených případů, byla nalezena terapeuticky relevantní translokace.

Nalezené aberace se nejvíce vyskytovaly ve slinných žlázách a v kůži, kde bylo objeveno 32, respektive 25 různých mutací. V těchto lokalizacích bylo nalezeno shodně 18 nádorů obsahující terapeuticky ovlivnitelnou translokaci. Dále následovala prostata s 18 nalezenými mutacemi, avšak žádná z nich nepředstavovala hledané translokace. Stejně tak tomu bylo u vzorků mozku, kde bylo nalezeno 13 mutací, ve střevě, děložním čípku i měkkých tkáních, kde bylo nalezeno shodně po jedné mutaci. V prsu bylo nalezeno 8 různých mutací a z toho 3 byly terapeuticky relevantní. Ve vzorcích z plic bylo nalezeno 6 genových aberací a z toho 2 byly terapeuticky relevantní. Ve štítné žláze byly detekovány 2 genové aberace a z toho 1 byla terapeuticky ovlivnitelnou translokací. Obě nalezené translokace v ledvinách spadaly mezi terapeuticky ovlivnitelné genové fúze. Výsledky podle lokalizace a relevantnosti nalezené mutace jsou shrnuty v tabulce 14 a obrázku 31 (tabulka 14, obrázek 31). Všechny nalezené genové aberace včetně lokalizace, a diagnózy jsou sepsány v příloze (tabulka 19).

Lokalizace	Nalezené genové aberace	Terapeuticky relevantní translokace	%
Slinné žlázy	32	18	56
Kůže	25	18	72
Prostata	18	0	0
Mozek	13	0	0
Prs	8	3	37,5
Plíce	6	2	33,3
Štítná žláza	2	1	50
Ledvina	2	2	100
Střevo	1	0	0
Měkké tkáně	1	0	0
Děložní čípek	1	0	0

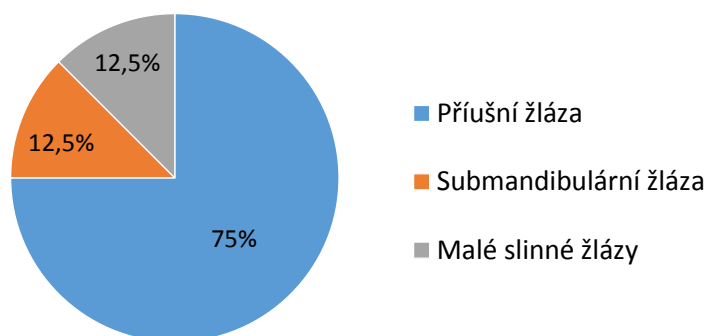
Tabulka 14 – Množství nalezených genových aberací v různých lokalizacích.



Obrázek 31 – Graf znázorňující celkové počty nalezených genových aberací v poměru k aberacím spadajícím do terapeuticky ovlivnitelných.

Pomocí dvoustupňové screeningové metody bylo vyšetřeno 185 případů maligních nádorů slinných žláz různých lokalizací. 102 (55,1 %) případů vykazovalo imunopozitivitu různého stupně a bylo podrobena v druhém kroku molekulárně-genetickému vyšetření metodou NGS. Zbýlých 83 (43,9 %) případů bylo imunohistochemicky negativních a nebyly proto dále vyšetřovány. Provedením molekulárně-genetické analýzy 102 imunoreaktivních nádorů slinných žláz bylo objeveno 32 (31,4 %) různých genových translokací, z nichž 18 (17,6 %) je považováno za terapeuticky ovlivnitelné. Konkrétně se jednalo o translokaci *ETV6-NTRK3*, která je specifická pro sekreční karcinom a tímto způsobem byla i potvrzena diagnóza. 24 (75 %) nádorů pocházelo z příušní žlázy a shodně 4 (12,5 %) případy vycházely ze submandibulární žlázy a malých slinných žláz, přičemž 2 z dutiny ústní, 1 z dutiny nosní a 1 případ pocházel z malých slinných žláz orofaryngu (obrázek 32).

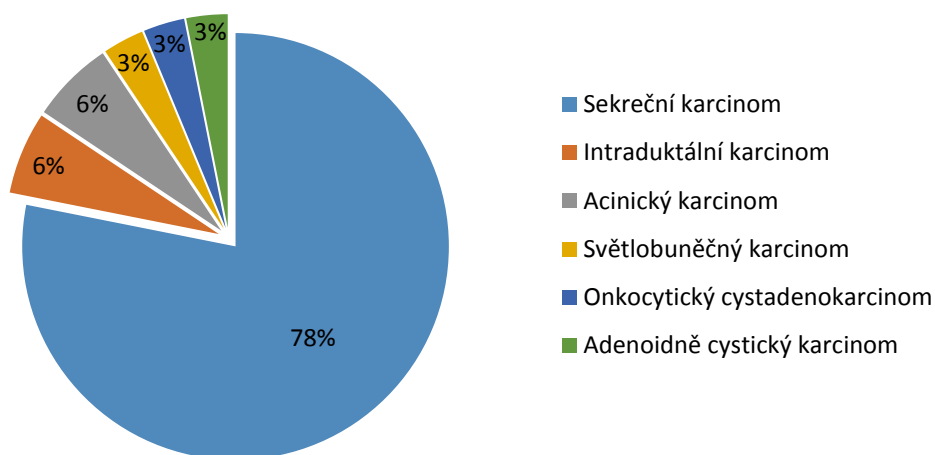
Lokalizace translokovaných nádorů slinných žláz



Obrázek 32 – Graf znázorňující lokalizace translokovaných nádorů slinných žláz.

V drtivé většině translokovaných nádorů se jednalo o sekreční karcinom, který byl diagnostikován ve 25 (78,1 %) případech. Z tohoto počtu byly 4 (16 %) SC diagnostikovány jako high-grade varianty a 2 z nich byly vyšetřovány již jako recidiva. Dále byly nalezeny 2 (6,3 %) intraduktální karcinomy a 2 (6,3 %) acinický karcinomy, jeden dokonce s high-grade transformací. Dále pak byl shodně po 1 (3,1 %) případu diagnostikován světlobuněčný karcinom, onkocytický cystadenokarcinom a adenoidně cystický karcinom (obrázek 33).

Spektrum diagnóz malignit slinných žláz



Obrázek 33 – Graf znázorňující spektrum diagnóz ZN slinných žláz, ve kterých byly nalezeny translokace různých genů.

Sekreční karcinomy obsahovaly typickou, terapeuticky ovlivnitelnou translokaci *ETV6-NTRK3* v 18 (72 %) případech, v 6 (24 %) případech byla prokázána méně častější fúze genů *ETV6-RET* a v jednom (4 %) případě byla objevena doposud nepopsaná fúze genů *VIM-RET*. V jednom případě recidivujícího high-grade SC submandibulární žlázy byla nalezena vedle klasické translokace *ETV6-NTRK3* ještě *MYB-SMR3B*. Identická koexprese byla nalezena i v jednom případě intraduktálního karcinomu, kde byla vedle typické translokace *NCOA4-RET* nalezena právě nízkofrekvenční fúze genů *MYB-SMR3B*. Druhý případ intraduktálního karcinomu obsahoval již pouze klasickou fúzi *NCOA4-RET*, avšak tento případ byl unikátní tím, že byla nalezena metastáza v lymfatické uzlině, což pro IC není běžné. Další onkogenní translokací, která byla pomocí dvoustupňového screeningu nalezena je *EWSR1-ATF1*, která definuje světlobuněčný karcinom a *MYB-NFIB*, která je specifická pro adenoidně cystický karcinom. Vedle těchto do značné míry tradičních translokací, které se rekurentně v daných karcinomech nacházejí, byly objeveny i poněkud netradiční fúzní partneři. *SYN2-PPARG* translokace byla nalezena v klasickém low-grade acinickém karcinomu a v onkocytickém low-grade cystadenokarcinomu, který by však podle nejnovější, 4. Edice WHO klasifikace spadl do kategorie adenokarcinom NOS. V jednom případě high-grade transformovaného acinického karcinomu byla zastižena velmi atypická translokace *EWSR1-HYOU1*. Tyto dvě atypické translokace nebyly doposud v salivární patologii publikovány a jejich význam bude dále zkoumán. Kompletní seznam salivárních karcinomů včetně lokalizace a nalezené translokace je uveden v tabulce 15 (tabulka 15).

No.	Lokalizace	Diagnóza	Nalezena relevantní translokace	Fúzní partneři
1	Malé slinné žlázy dutiny nosní	Sekreční karcinom	Ano	<i>ETV6-NTRK3</i>
2	Příušní žláza	Sekreční karcinom	Ano	<i>ETV6-NTRK3</i>
3	Příušní žláza	Sekreční karcinom	Ano	<i>ETV6-NTRK3</i>
4	Příušní žláza	Sekreční karcinom	Ano	<i>ETV6-NTRK3</i>
5	Příušní žláza	Sekreční karcinom	Ano	<i>ETV6-NTRK3</i>
6	Příušní žláza	Sekreční karcinom	Ano	<i>ETV6-NTRK3</i>
7	Příušní žláza	Sekreční karcinom	Ano	<i>ETV6-NTRK3</i>
8	Příušní žláza	Sekreční karcinom	Ano	<i>ETV6-NTRK3</i>
9	Příušní žláza	Sekreční karcinom	Ano	<i>ETV6-NTRK3</i>
10	Příušní žláza	Sekreční karcinom	Ano	<i>ETV6-NTRK3</i>
11	Příušní žláza	Sekreční karcinom	Ano	<i>ETV6-NTRK3</i>
12	Příušní žláza	Sekreční karcinom	Ano	<i>ETV6-NTRK3</i>
13	Submandibulární žláza	Sekreční karcinom	Ano	<i>ETV6-NTRK3</i>
14	Submandibulární žláza	Sekreční karcinom	Ano	<i>ETV6-NTRK3</i>
15	Příušní žláza	Sekreční karcinom HG	Ano	<i>ETV6-NTRK3</i>
16	Submandibulární žláza	Sekreční karcinom HG	Ano	<i>ETV6-NTRK3</i>
17	Malé slinné žlázy dutiny ústní	Recidivující HG Sekreční karcinom	Ano	<i>ETV6-NTRK3</i>
18	Submandibulární žláza	Recidivující HG Sekreční karcinom	Ano	<i>ETV6-NTRK3, MYB-SMR3B</i>
19	Příušní žláza	Sekreční karcinom	Ne	<i>ETV6-RET</i>
20	Příušní žláza	Sekreční karcinom	Ne	<i>ETV6-RET</i>
21	Příušní žláza	Sekreční karcinom	Ne	<i>ETV6-RET</i>
22	Příušní žláza	Sekreční karcinom	Ne	<i>ETV6-RET</i>
23	Příušní žláza	Sekreční karcinom	Ne	<i>ETV6-RET</i>
24	Příušní žláza	Sekreční karcinom	Ne	<i>ETV6-RET</i>
25	Příušní žláza	Sekreční karcinom	Ne	<i>VIM-RET</i>
26	Příušní žláza	LG intraduktální ca s meta v 1 lu	Ne	<i>NCOA4-RET</i>
27	Příušní žláza	LG intraduktální karcinom	Ne	<i>NCOA4-RET, MYB-SMR3B</i>
28	Malé slinné žlázy orofaryngu	Světlobuněčný karcinom	Ne	<i>EWSR1-ATF1</i>
29	Příušní žláza	HGT acinického karcinomu	Ne	<i>EWSR1-HYOU1</i>
30	Příušní žláza	Acinický karcinom	Ne	<i>SYN2-PPARG</i>
31	Příušní žláza	Onkocytický cystadenokarcinom	Ne	<i>SYN2-PPARG</i>
32	Malé slinné žlázy dutiny ústní	Adenoidně cystický karcinom	Ne	<i>MYB-NFIB</i>

Tabulka 15 – Seznam všech nalezených translokací v karcinomech slinných žláz.

* lu: lymfatická uzlina, ca: karcinom, meta: metastáza, HGT: high-grade transformace.

3.1.4. Diskuze

Nově objevené rekurentní genové translokace zcela mění současný přístup ne jenom k diagnostice a klasifikaci nádorů, ale i k terapii. V současné době jsou již k terapeutickým účelům schválené inhibitory tyrosin-kinázové aktivity cílené proti mutacím v genech *NTRK1*, *NTRK2*, *NTRK3*, *ALK* a *ROS1*. Vyhledáváním onkogenních translokací v těchto genech se zabývala i tato studie využívající metodu dvoustupňového screening, která vyšetřuje tkáň ve dvou na sebe navazujících krocích (186). V prvním kroku je tkáň nespecificky testována imunohistochemickým koktejlem protilátek detekující aberace ve výše zmíněných genech. Přestože studie Hechtmena a spol. a Rudzinské a spol. uvádí IHC vyšetření užitím pan-Trk

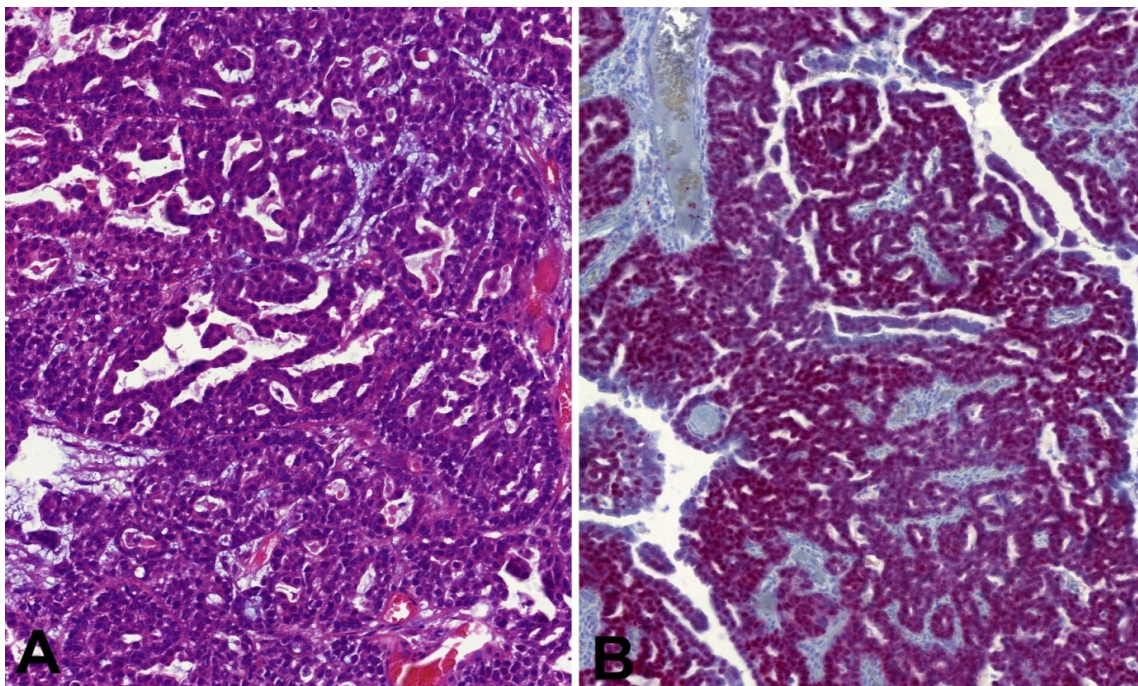
protilátky jako vysoce senzitivní (95 %, resp. 97 %) i specifické (100 %, resp. 98 %) (189, 190), naše zkušenosti jsou odlišné. Z výsledků naší studie vyplývá, že samostatné IHC vyšetření je nespecifické, neboť se do určité míry přibarvují nenádorové i nádorové buňky v tumorech, které nejsou podmíněny mutacemi v hledaných genech (191, 192). Proto je nezbytné, aby všechny imunoreaktivní vzorky byly v druhém kroku podrobeny vysoce specifické i senzitivní metodě NGS, která s jistotou tyto aberace detekuje. Negativní výsledek IHC s jistotou potvrdí pouze to, že námi hledané translokace nejsou ve tkáni přítomny. IHC vyšetření má tedy spíše negativní prediktivní hodnotu. K totožnému závěru došla i pracovní skupina Murphy a spol., která dokonce hodnotila jako imunopozitivitu jakoukoliv pozitivitu ve více než 5 % nádorových buněk (186). Vzhledem k tomu, že z případů, které byly v našem souboru imunoreaktivní a byly vyšetřovány NGS (1379 případů), byla pouze 3 % (44 případů) pozitivních na jednu z hledaných genových aberací (obrázek 30B), je nemožné, aby byla indikována terapie inhibitory tyrozin-kinázové aktivity pouze na podkladě výsledků IHC. Aplikace dvoustupňové screeningové metody je značně výhodná, neboť s jistotou a velmi rychle eliminuje případy neobsahující relevantní translokace. Podrobit všechny nádory molekulárně-genetickému vyšetření a „naslepo“ pátrat po genových aberacích, které by byly terapeuticky ovlivnitelné, by bylo finančně, časově i personálně náročné.

Pomocí NGS bylo nalezeno v naší laboratoři značné množství genových aberací v nádorech slinných žláz, které potvrzují výskyt konkrétní rekurentně se objevující mutace, ale byly nalezeny i zcela nové, doposud nepopsané onkogenní fúze, které byly publikovány v mezinárodních časopisech s impact factorem:

Sekreční karcinom mamárního typu nazální dutiny: Charakteristika 2 případů a jejich odlišení od ostatních níže maligních sinonazálních adenokarcinomů

V této studii „*Mammary Analog Secretory Carcinoma of the Nasal Cavity: Characterization of 2 Cases and Their Distinction From Other Low-grade Sinonasal Adenocarcinomas*“ byly popsány 2 unikátní případy sekrečního karcinomu mamárního typu lokalizované v dutině nosní (128). Bylo analyzováno 17 případů low-grade sinonazálních adenokarcinomů non-intestinálního typu (SNAC), které svou morfologií napodobovaly sekreční karcinom slinných žláz. Byla provedena imunohistochemická a molekulárně-genetická analýza metodou NGS, FISH a RT-PCR. Molekulárně-genetickými metodami byla ve

dvou případech nalezena translokace *ETV6-NTRK3* specifická pro sekreční karcinom. Jeden z těchto dvou případů (případ č. 1) byl vyšetřen i imunohistochemickým koktejlem protilátek detekující aberace v genech *NTRK1-3*, *ALK* a *ROS1* s pozitivním výsledkem (obrázek 34). Dva případy tohoto studovaného souboru byly následně reklasifikovány jako SC. Studie se zabývá především diferenciální diagnostikou SNAC a SC. Oba případy SC vykazovaly typické histomorfologické i imunohistochemické znaky, tzn. imunopozitivitu v markerech CK7, MGA, GATA3, S100 proteinu, STAT5, SOX10 a negativitu v p63 a DOG1. Naproti tomu zbylých 15 případů low-grade SNAC tubulopapilární architektura a IHC bylo ve 14 případech negativní pro průkaz MGA. V jednom případě byla nalezena jen fokální pozitivita MGA, S100 proteinu, GATA3 a SOX10. Celý soubor byl negativní na průkaz CDX2, CK20 a SATB2, čímž byla vyloučena diagnóza intestinálního typu adenokarcinomu (ITAC). Studie dále varuje před diagnostickým pitfallem, který představuje záměna tzv. *ETV6*-rearanžovaného low-grade SNAC (193) za sinonazální SC. Tyto dvě jednotky je nutno odlišit vzhledem k rozdílnému klinickému chování. Zatímco *ETV6*-rearanžovaný SNAC se chová spíše jako benigní nádor, SC je již plnohodnotná malignita, která je potenciálně léčitelná a pacienti mohou profitovat z léčby tyrosin-kinázovými inhibitory. Tato publikace tak odhalila další lokalizaci vedle slinných žláz, kůže a štítné žlázy, ve které se může vyskytovat sekreční karcinom.



Obrázek 34 – A: Obrázek sinonazálního SC v barvení HE; B: Difúzní silná jaderná pozitivita v IHC barvení koktejlem protilátek na průkaz přítomnosti aberací v genech *NTRK1-3*, *ALK* a *ROS1*.

Mammary Analog Secretory Carcinoma of the Nasal Cavity Characterization of 2 Cases and Their Distinction From Other Low-grade Sinonasal Adenocarcinomas

Martina Baneckova, MD,*† Abbas Agaimy, MD,‡ Simon Andreassen, MD,§||
Tomas Vanecek, PhD,¶|| Petr Steiner, Mgr,*¶|| David Slouka, MD, MBA, PhD,#
Tomas Svoboda, MD, PhD,** Marketa Miesbauerova, MD,*† Michael Michal Jr, MD,*†
and Alena Skálová, MD, PhD*†

Abstract: Secretory carcinoma, originally described as mammary analog secretory carcinoma (MASC), is a low-grade salivary gland tumor characterized by a t(12;15)(p13;q25) translocation, resulting in an *ETV6-NTRK3* gene fusion. Most MASCs are localized to the parotid gland and intraoral minor salivary glands. Moreover, *ETV6*-rearranged carcinomas with secretory features have been reported recently in the thyroid (with and without a history of radiation exposure), skin, and in very rare instances in the sinonasal tract. Here, we describe 2 cases of primary MASC in the sinonasal tract and provide a detailed clinical and histopathologic characterization of their morphology, immunohistochemical profile, and genetic background and highlight features allowing for its separation from its recently described molecular mimicker, *ETV6*-rearranged low-grade sinonasal adenocarcinoma.

Key Words: nasal cavity, mammary analog secretory carcinoma, MASC, low-grade sinonasal adenocarcinoma, *ETV6-NTRK3*

(*Am J Surg Pathol* 2018;42:735–743)

Secretory carcinoma (SC), originally described as mammary analog secretory carcinoma (MASC), is a low-grade salivary gland tumor characterized by a t(12;15)(p13;q25) translocation, resulting in an *ETV6-NTRK3* gene fusion.¹ In addition to having identical genetics with SC, MASC expresses S100 and mammaglobin while being

negative for DOG-1 and p63, thus highly resembling SC of the breast.² However, these features are unique among tumors of the salivary gland.

Most MASCs are localized in the parotid gland, submandibular gland, and minor salivary glands of the oral cavity, such as soft palate, lips, base of the tongue, and buccal mucosa. Since its description in the major and minor salivary glands,¹ MASC has been described in several other locations, such as skin,^{3–5} thyroid,^{6–8} and the sinonasal tract.^{9,10} The first case of MASC of the sinonasal tract was reported by Lurquin et al.⁹ and, very recently, another case with high-grade transformation was reported in the maxillary sinus.¹⁰

Primary sinonasal adenocarcinomas (SNACs) are uncommon and morphologically heterogeneous.¹¹ These tumors are divided into nonsalivary and salivary types. Nonsalivary-type SNACs are further classified into 2 broad categories: intestinal-type adenocarcinoma (ITAC) and the non-intestinal-type adenocarcinoma (non-ITAC).¹² The non-intestinal-type SNAC is of presumed surface epithelium/seromucinous gland origin and accounts for <1% of head and neck cancers.^{11–13} It is morphologically a very diverse group, as it can show high-grade or low-grade features, as determined by the proliferative activity and pattern of growth.^{14–17} An increasing number of distinct types of non-ITAC has been recognized recently, including a subset with rearrangement of the *ETV6* gene, the so-called *ETV6* gene-rearranged sinonasal low-grade SNAC.¹⁸

By screening a series of low-grade SNACs with fluorescence in situ hybridization (FISH) and/or reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), we identified 2 cases of primary MASC arising in the nasal cavity, and herein we provide a detailed clinical, histopathologic, and molecular characterization. Recognizing MASC in the sinonasal tract among other SNACs of the salivary type, as well as *ETV6*-rearranged low-grade SNAC, is important, as the correct diagnosis is prognostically relevant, and *ETV6*-related fusions serve as therapeutic targets.^{19,20}

MATERIALS AND METHODS

Patient Material

Fifteen cases of low-grade non-intestinal-type SNAC with secretory features resembling MASC were identified in a review of the Salivary Gland Tumor Registry, at the

From the Departments of *Pathology; #Otorhinolaryngology; **Oncology and Radiotherapy, Oncological Clinic, Faculty of Medicine in Plzeň, Charles University; †Bioptic Laboratory Ltd; ‡Department of Molecular Pathology, Bioptic Laboratory Ltd, Plzeň, Czech Republic; ‡Institute of Pathology, Friedrich-Alexander-University, Erlangen, Germany; §Department of Otorhinolaryngology and Maxillofacial Surgery, Køge University Hospital; and ||Department of Otolaryngology Head & Neck Surgery, Rigshospitalet, Denmark.

Conflicts of Interest and Source of Funding: Supported by the National Sustainability Program I (NPU I) Nr. LO1503 and by the grant SVV-2017 No. 260 391 provided by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic. The authors have disclosed that they have no significant relationships with, or financial interest in, any commercial companies pertaining to this article.

Correspondence: Alena Skálová, MD, PhD, Siki's Department of Pathology, Medical Faculty of Charles University, Faculty Hospital, E. Benese 13, Plzeň 305 99, Czech Republic (e-mail: skalova@fnplzen.cz). Copyright © 2018 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

TABLE 1. Antibodies Used for Immunohistochemical Study

Antibody Specificity	Clone	Dilution	Antigen Retrieval/Time (min)	Source
S100 protein	Polyclonal	RTU	CC1/20	Ventana Medical Systems
Mammaglobin	304-1A5	RTU	CC1/36	DakoCytomation
CK7	OV-TL 12/30	1:200	CC1/36	DakoCytomation
CK20	Ks20.8	1:100	CC1/36	DakoCytomation
CDX2	EPR2764Y	RTU	CC1/64	Cell Marque
GCDFP-15	EP1582y	RTU	CC1/64	Cell Marque
p63	4A4	RTU	CC1/64	Ventana Medical Systems
DOG-1	SP31	RTU	CC1/36	Cell Marque
GATA-3	L50-823	1:200	CC1/52	BioCareMedical
SOX10	Polyclonal	1:100	CC1/64	Cell Marque
Pan-TRK	A7H6R	1:20	CC1/64	Cell Signaling
SATB2	Polyclonal	1:100	CC2/68	Sigma Aldrich
STAT5a	Polyclonal	1:400	CC1/36	AssayDesigns Inc.
MIB1	30-9	RTU	CC1/64	Ventana Medical Systems

CC1 indicates EDTA buffer, pH 8.6; RTU, ready to use.

Department of Pathology, Faculty of Medicine in Plzen, and Biopsticka Laboratory Ltd, Plzen, Czech Republic. Two additional cases with features mimicking MASC were retrieved from the files of the Institute of Pathology, Friedrich-Alexander University, Erlangen, Germany, thus amounting to a total of 17 cases. Clinical follow-up was obtained from the patients, their physicians, or from referring pathologists.

Histology and Immunohistochemistry

For conventional microscopy, tissues were fixed in formalin, routinely processed, embedded in paraffin (FFPE), cut, and stained with hematoxylin and eosin. In most cases, additional stains were also performed, including periodic acid-Schiff with and without diastase, mucicarmine, and alcian blue at pH 2.5.

For immunohistochemistry, 4- μ m-thick sections were cut from paraffin blocks and mounted on positively charged slides (TOMO; Matsunami Glass Ind., Japan). Sections were processed on a BenchMark ULTRA (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ), deparaffinized, and subjected to heat-induced epitope retrieval by immersion in a CC1 solution (pH 8.6) at 95°C. Following antigen retrieval, sections were stained with a pan-TRK antibody cocktail consisting of rabbit monoclonal antibodies, all obtained from Cell Signaling (Danvers, MA), targeting pan-TRK (clone A7H6R, active against TrkA, TrkB, and TrkC, 1:50 dilution), ROS1 (clone D4D6, 1:50), and ALK (clone D5F3, 1:50), as described elsewhere.²¹

All other primary antibodies used are summarized in Table 1. Visualization was performed using the ultraView Universal DAB Detection Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and ultraView Universal Alkaline

Phosphatase Red Detection Kit (Roche Diagnostics). The slides were counterstained with Mayer hematoxylin. Appropriate positive and negative controls were used.

Molecular Genetic Study

Detection of *ETV6-NTRK3* Fusion Transcript by RT-PCR

RNA was extracted using the RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion, Austin, TX). cDNA was synthesized using the Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (RNA input 500 ng) (Roche Diagnostics). All procedures were performed according to the manufacturer's protocols. Amplification of a 105 bp product and a 133 bp product of the β 2-microglobulin gene, and a 247 bp product of the *PGK* gene was used to test the quality of the extracted RNA, as previously described.²²⁻²⁴ This resulted in the detection of the classic fusion transcript of exon 5 of the *ETV6* gene and exon 15 of the *NTRK3* gene.²⁵

For PCR, 2 μ L of cDNA was added to the reaction, which consisted of 12.5 μ L of HotStar Taq PCR Master Mix (Qiagen, Hilden, Germany), 10 pmol of each primer (Table 2), and distilled water up to 25 μ L.^{26,27} The amplification program comprised denaturation at 95°C for 14 minutes followed by 45 cycles of denaturation at 95°C for 1 minute; annealing at temperatures shown in Table 2 was carried out for 1 minute and extension at 72°C for 1 minute. The procedure was completed by incubation at 72°C for 7 minutes.

Successfully amplified PCR product was purified with magnetic particles using Agencourt AMPure (Agencourt

TABLE 2. Primers for Detection of *ETV6-NTRK3* Fusion Transcripts

Original Primer Name	Sequence	Annealing Temperature (°C)	Localization
TEL971* (<i>ETV6A</i> †)	ACCACATCATGGTCTCTGTCTCCC	65	<i>ETV6</i> exon 5 outer
TRK1059* (<i>NTRK3A</i> †)	CAGTTCTCGCTTCAGCACGATG	65	<i>NTRK3</i> exon 15 outer

*Bourgeois et al.²⁵

†Ito et al.,²⁶ Skalova et al.²⁷

Bioscience Corporation, A Beckman Coulter Company, Beverly, MA). The product was then bidirectionally sequenced using Big Dye Terminator Sequencing Kit (PE/ Applied Biosystems, Foster City, CA) and purified with magnetic particles using Agencourt CleanSEQ (Agencourt Bioscience Corporation); all this was carried out according to the manufacturer's protocols and run on an automated sequencer ABI Prism 3130xl (Applied Biosystems) at a constant voltage of 13.2 kV for 11 minutes.

Detection of *ETV6* and *NTRK3* by FISH Method

Four- μ m-thick FFPE sections were placed onto positively charged slides. Hematoxylin and eosin-stained slides were examined for determination of areas for cell counting.

The unstained slides were routinely deparaffinized and incubated in the 1 \times Target Retrieval Solution Citrate pH 6 (Dako, Glostrup, Denmark) at 95°C/40 minutes and subsequently cooled for 20 minutes at room temperature in the same solution. The slides were washed in deionized water for 5 minutes and digested in protease solution with Pepsin (0.5 mg/mL) (Sigma Aldrich, St Louis, MO) in 0.01 M HCl at 37°C/25 to 60 minutes according to the sample conditions. The slides were then placed in deionized water for 5 minutes, dehydrated in a series of ethanol solution (70%, 85%, 96% for 2 min each), and air-dried.

For the detection of *ETV6* rearrangement, a commercial probe, Vysis *ETV6* Break Apart FISH Probe Kit (Vysis/Abbott Molecular, Illinois), was used. The *ETV6* probe was mixed with water and LSI/WCP (Locus-Specific Identifier/Whole Chromosome Painting) Hybridization buffer (Vysis/Abbott Molecular) in a 1:2:7 ratio, respectively.

The probe for the detection of the rearrangement of the *NTRK3* gene region was mixed from custom-designed SureFISH probes (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA). Chromosomal regions for *NTRK3* break-apart probe oligos are chr15:87501469-88501628 and chr15:88701444-89700343. The probe mixture was prepared from corresponding probes (each color was delivered in a separated well), deionized water, and LSI Buffer (Vysis/Abbott Molecular) in a 1:1:1:7 ratio, respectively.

An appropriate amount of mixed probe was applied on specimens, covered with a glass coverslip, and sealed with rubber cement. The slides were incubated in the ThermoBrite instrument (StatSpin/Iris Sample Processing, Westwood, MA) with codenaturation at 85°C/8 minutes and hybridization at 37°C/16 hours. The rubber-cemented coverslip was then removed, and the slide was placed in posthybridization wash solution (2 \times SSC/0.3% NP-40) at 72°C/2 minutes. The slide was air-dried in the dark, counterstained with 4', 6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Vysis/Abbott Molecular), coverslipped, and immediately examined.

FISH Interpretation

The sections were examined with an Olympus BX51 fluorescence microscope (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) using a \times 100 objective and filter sets Triple Band Pass

(DAPI/SpectrumGreen/SpectrumOrange), Dual Band Pass (SpectrumGreen/SpectrumOrange), and Single Band Pass (SpectrumGreen or SpectrumOrange).

For each probe, 100 randomly selected non-overlapping tumor cell nuclei were examined for the presence of yellow or green and orange fluorescent signals. Yellow signals were considered negative, and separate orange and green signals were considered as positive.

Cutoff values were set to >10% of nuclei with chromosomal breakpoint signals (mean, +3 SD in normal non-neoplastic control tissues).

Sample Preparation for Next-generation Sequencing

For next-generation sequencing (NGS) studies, 2-3 FFPE sections (10 μ m thick) were macrodissected to isolate tumor-rich regions. The samples were extracted for total nucleic acid using Agencourt FormaPure Kit (Beckman Coulter, Brea, CA), following the corresponding protocol with overnight digestion and an additional 80°C incubation, as described in the modification of the protocol by ArcherDX (ArcherDX Inc., Boulder, CO). Total nucleic acid was quantified using the Qubit Broad Range RNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) and 2 μ L of sample.

RNA Integrity Assessment and Library Preparation for NGS

Unless otherwise indicated, 250 ng of FFPE RNA was used as an input for NGS studies. To assess RNA quality, the PreSeq RNA QC Assay using iTaq Universal SYBR Green Supermix (Biorad, Hercules, CA) was performed on all samples during library preparation to generate a measure for the integrity of RNA (in the form of a cycle threshold value). Library preparation and RNA QC were performed following the Archer Fusion Plex Protocol for Illumina (ArcherDX Inc.). A custom primer set with 28 primers spanning regions on 3 specific genes of interest including *ETV6* was used. Final libraries were diluted 1:100,000 and quantified in a 10 μ L reaction following the Library Quantification for Illumina Libraries protocol and assuming a 200 bp fragment length (KAPA, Wilmington, MA). The concentration of the final libraries was around 200 n. The threshold representing the minimum molar concentration for which sequencing can be robustly performed was set at 50 nM.

NGS and Analysis (Archer)

The libraries were sequenced on an MiSeq sequencer (Illumina, San Diego, CA). The libraries were diluted to 4 nM, and equal amounts of up to 16 libraries were pooled per run. The recommended number of raw reads per sample was set to 500,000. Library pools were diluted to 16 pM library stock with 10% 12.5 pM PhiX and loaded in the MiSeq cartridge. Analysis of sequencing results was performed using the Archer Analysis software (version 5; ArcherDX Inc.). Fusion parameters were set to a minimum of 5 valid fusion reads with a minimum of 3 unique start sites within the valid fusion reads.

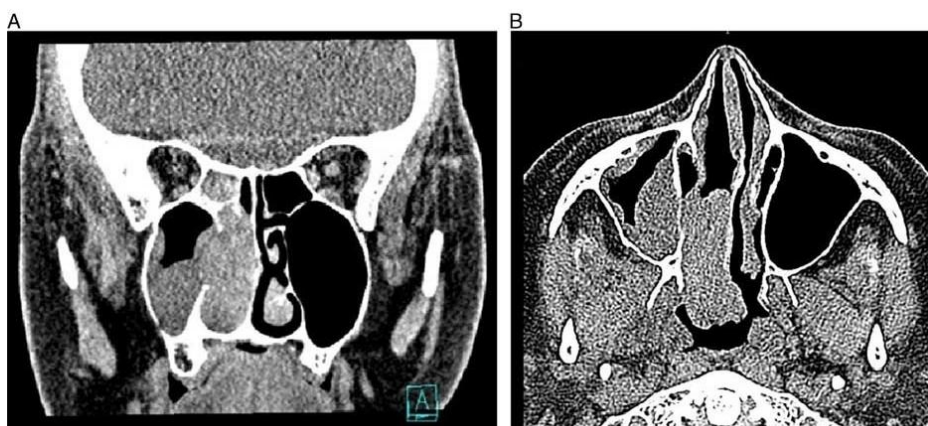


FIGURE 1. Representative imaging of case 2. A, Coronal computed tomography of case 2 demonstrating a right-sided nasal mass. B, The mass extends into the nasopharynx. There was no involvement of the maxillary sinus.

RESULTS

Case Histories

Case 1

A 51-year-old woman, nonsmoker without a prior history of breast cancer, presented with intermittent tenderness or pain behind the right eye and occasional forehead discomfort. A mass was identified on the right side of the nasal septum, and the patient was referred to surgical resection. The resected specimen measured 1.5×1.5×0.4 cm, and the patient was staged as T1N0M0. The patient was alive and showed no evidence of recurrent disease after >10 years of follow-up.

Case 2

A 65-year-old woman, nonsmoker without prior history of breast cancer, presented with right-sided nasal obstruction, nasopharyngeal secretion, and occasional retrobulbar pain. Past medical history was unremarkable except for a pleomorphic adenoma of the palate 5 years previously. Computed tomography identified a mass in the right nasal cavity extending into the nasopharynx. The patient underwent surgical excision of the mass including the middle turbinate along with maxillary sinus anastomosis, right ethmoidectomy, and partial resection of the nasal septum. The tumor measured 4×4×1.5 cm, and

the patient was staged as T2NxM0. The patient received adjuvant radiotherapy and is alive with no evidence of disease after 4 years of follow-up (Figs. 1A, B).

Detailed clinicopathologic findings in these 2 patients are presented in Table 3.

Histopathology and Immunohistochemical Findings

Cases 1 and 2 had histologic features and immunoprofiles identical to salivary gland MASC. The tumors were unencapsulated and composed of tubular, papillary, and microcystic growth patterns with invasive margins (Fig. 2A). The tumor cells had low-grade vesicular and round to oval nuclei with fine, granular chromatin. Abundant eosinophilic homogenous extracellular periodic acid-Schiff with diastase-positive material (Fig. 2B) was present in both cases. The tumors were composed of solid microcystic growth patterns, in places divided by thick hyalinized fibrous septa (Fig. 2C). Focal necrotic areas were present in case 2 (Fig. 2D). In contrast to acinic cell carcinoma (AciCC), both tumors lacked cytoplasmic periodic acid-Schiff with diastase-positive zymogen granules. Mitoses were few, and there was no lymphovascular invasion or perineural growth.

In contrast, cases 3 to 17 displayed histologic features of low-grade tubulopapillary adenocarcinomas or

TABLE 3. Clinical Findings in 2 MASCs of the Nasal Cavity

Cases	Age (y)/Sex	Site	Size (cm)	Stage (TNM)	Local Recurrence	Duration of Symptoms (y)	Treatment	Follow-up (y)	Outcome
1	51/F	Right nasal septum	1.5×1.5×0.4	T1N0M0	No	1-2	Surgery	14	Alive NED
2	65/F	Right nasal cavity	4×4×1.5	pT2pNxM0	No	1	Surgery+RT	4	Alive NED

F indicates female; NED, no evidence of disease; RT, radiotherapy.

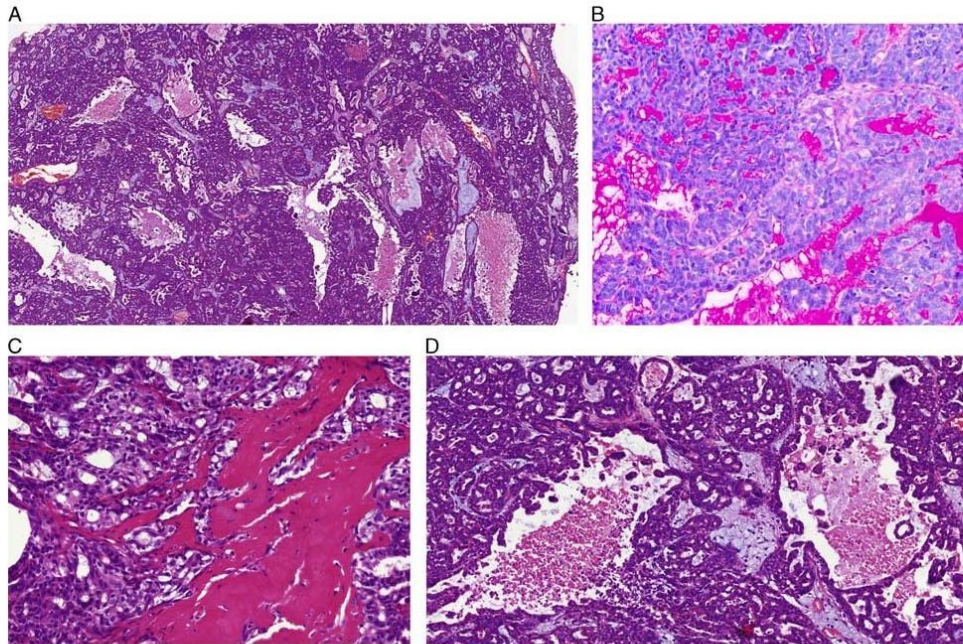


FIGURE 2. Histologic findings of sinonasal MASC. A, MASC shows admixed tubular, papillary, and microcystic growth patterns. B, Abundant periodic acid-Schiff with diastase-positive extracellular material within tubular and cystic spaces. C, The tumors were composed of solid, microcystic growth patterns, occasionally divided by thick hyalinized fibrous septa. D, Focal necrosis was present in case 2.

low-grade non-intestinal-type SNAC, not otherwise specified.^{13,16,17}

The immunohistochemical findings are summarized in Tables 4 and 5. Both MASCs were positive for CK7,

TABLE 4. Immunohistochemical Results of 2 Cases of MASC in the Nasal Cavity

Antibody	Case 1	Case 2
CK7	+(D)	+(D)
S100	+(D)	+(F)
Mammaglobin	+(D)	+(F)
GATA3	+(D)	+(D)
SOX10	+(D)	+(D)
Pan-TRK	+	+
Stat5	+	+
p63	Neg	Neg
CK20	Neg	Neg
CDX2	Neg	Neg
DOG-1	Neg	Neg
GCDFP*	+(F)*	+(E)*
MIB1	5%	40%

*Immunohistochemistry performed at Department of Otorhinolaryngology and Maxillofacial Surgery, Koge University Hospital, and Department of Otorhinolaryngology Head & Neck Surgery Rigshospitalet.

D indicates diffuse staining; E, staining of extracellular material; F, focal staining.

SOX10, GATA3, STAT5, and S100 (diffuse and strong staining in all tumor cells). Immunohistochemical staining for mammaglobin was diffusely positive in case 1 and focally positive in case 2 (Figs. 3A–D). Both cases were negative for p63 protein, CK20, CDX2, SATB2, and DOG-1 (Table 4). The remaining 15 cases, except for case 13, were negative for mammaglobin. Case 13 was S100 protein/SOX10/GATA3-positive with focal staining for mammaglobin in <5% of the tumor cells. Data from all 17 cases are summarized in Table 5.

Genetic Findings

After histologic and immunohistochemical characterization, all 17 cases were characterized for the presence of the *ETV6-NTRK3* fusion transcript and/or rearrangement of *ETV6*. These findings are summarized in Table 6. Two cases, cases 1 and 2, showed *ETV6* gene rearrangement by FISH. Case 1 was negative with RT-PCR, but a product was identified with RT-PCR in case 2, and sequencing confirmed an exon 5 to 15 junction. In case 1, NGS identified an atypical exon 5-13 fusion. Cases 3 to 17 were negative or not analyzable with either RT-PCR or FISH, or were negative for both methods (Table 6 and Figs. 4A–C).

TABLE 5. Immunohistochemical Results of All 17 Cases

Case No.	Final Diagnosis	CK7	CK20	DOG-1	GATA3	SOX10	S100	MGA	p63	STAT5	MIB1	CDX2	SATB2
1	MASC	+	Neg	Neg	+	+	+	+	Neg	+	5%	Neg	Neg
2	MASC	+	Neg	Neg	+	+	+	+	Neg	+	40%	Neg	Neg
3	LG SNAC	+	Neg	Neg	+	+	+	Neg	Neg	ND	ND	Neg	ND
4	LG SNAC	Neg	Neg	Neg	+	+	+	Neg	Neg	ND	ND	Neg	ND
5	LG SNAC	+	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	ND	20%	Neg	Neg
6	LG SNAC	+	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	+	3%	Neg	Neg
7	LG SNAC	+	Neg	Neg	+	+	Neg	Neg	Neg	+	3%	Neg	Neg
8	LG SNAC	+	Neg	Neg	ND	+	+	Neg	Neg	ND	5%	Neg	ND
9	LG SNAC	+	Neg	Neg	Neg	+	+	Neg	Neg	+	3%	Neg	Neg
10	LG SNAC	+	Neg	NA	NA	NA	Neg	NA	NA	NA	NA	NA	Neg
11	LG SNAC	+	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	ND	90%	Neg	ND
12	LG SNAC	+	Neg	Neg	Neg	Neg	+	Neg	+	+	5%	Neg	ND
13	LG SNAC	+	Neg	Neg	+	+	+	+(F) 5%	Neg	+	10%	Neg	ND
14	LG SNAC	+	Neg	Neg	Neg	Neg	+(F)	Neg	+	+(F)	2%	Neg	Neg
15	LG SNAC	+	Neg	Neg	Neg	Neg	+	Neg	Neg	Neg	2%	Neg	Neg
16	LG SNAC	+	Neg	Neg	ND	+(F)	+	Neg	Neg	ND	2%	Neg	Neg
17	LG SNAC	+	Neg	Neg	Neg	+	Neg	Neg	Neg	ND	0%	ND	Neg

F indicates focally; LG, low grade; NA, not analyzable; ND, not done; Neg, negative.

DISCUSSION

In contrast to the sinonasal tract, diagnosing MASC in the major salivary glands as well as the oral minor glands is not difficult in most cases. MASC is well characterized not only by histologic and immunohistochemical features but also by the *ETV6-NTRK3* gene fusion.¹ However, if MASC is present in unexpected locations, the differential diagnosis is more challenging. MASC can be confused with other salivary gland tumors, including AcicCC and adenocarcinoma not otherwise specified.²⁸

More than half of cases previously diagnosed as zymogen granule-poor AcicCC were positive for *ETV6* translocation on rereview and therefore classified as MASC, and most tumors previously diagnosed as AcicCC of the minor salivary glands also represent MASC.^{29,30} In contrast to AcicCC, MASC shows no basophilic granularity in the cytoplasm of any of the constituent cells, this being the hallmark of the serous acinar cells of AcicCC. Moreover, MASC has a completely different immunohistochemical profile than AcicCC, almost always strongly expressing

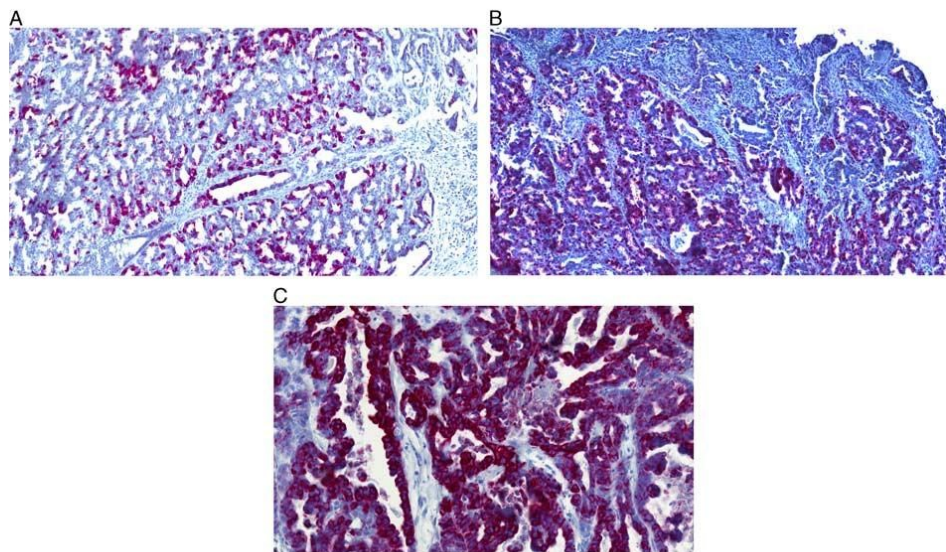


FIGURE 3. Immunohistochemical characteristics of MASC in the sinonasal tract. In both MASCs, tumor cells were intensely and diffusely positive for mammaglobin (A), S100 (B), and CK7 (C).

TABLE 6. Results of Molecular Analysis of 17 Cases of Sinonasal Carcinomas

Cases	Final Diagnosis	FISH		RT-PCR		Archer NGS	Gene Status
		<i>ETV6</i>	<i>NTRK3</i>	Exons 5-15	Fusion Transcript		
1	MASC	Break	NA		Neg	<i>ETV6-NTRK3</i> exons 5-13	<i>ETV6-NTRK3</i>
2	MASC	Break	Break		+	ND	<i>ETV6-NTRK3</i>
3	LG SNAC	NA	Intact		NA	ND	Neg
4	LG SNAC	Intact	Intact		Neg	ND	Neg
5	LG SNAC	Intact	ND		Neg	ND	Neg
6	LG SNAC	Intact	ND		Neg	ND	Neg
7	LG SNAC	Intact	ND		Neg	ND	Neg
8	LG SNAC	NA	ND		Neg	ND	Neg
9	LG SNAC	Intact	ND		ND	ND	Neg
10	LG SNAC	Intact	ND		ND	ND	Neg
11	LG SNAC	Intact	ND		Neg	ND	Neg
12	LG SNAC	NA	ND		NA	ND	NA
13	LG SNAC	NA	ND		Neg	ND	Neg
14	LG SNAC	Intact	ND		Neg	ND	Neg
15	LG SNAC	Intact	ND		Neg	ND	Neg
16	LG SNAC	NA	ND		NA	ND	NA
17	LG SNAC	Intact	ND		Neg	ND	Neg

LG indicates low grade; NA, not analyzable; ND, not done.

S100 protein and mammaglobin,^{1,31,32} and lacking DOG-1 expression.³³

Low-grade SNACs represent a histologically heterogeneous group of tumors, including non-ITAC and ITAC subtypes.¹³ In recent years, an increasing number of distinct types of SNACs have been recognized, including HPV-related multiphenotypic sinonasal carcinoma, SMARCB1-deficient sinonasal carcinoma, and tubulopapillary low-grade SNAC.^{16,34-37} Recently, Andreasen et al¹⁸ reviewed a series of low-grade SNACs of non-ITAC

type with tubulopapillary growth pattern and found a subset of tumors harboring *ETV6* rearrangements and the *ETV6-NTRK3* fusion in 2 of 3 cases. From a strictly genetic perspective, *ETV6*-rearranged low-grade SNAC represents a pitfall for identifying true sinonasal MASC. However, despite the identical genetic features of sinonasal MASC and *ETV6*-rearranged low-grade SNAC, the following features allow for accurate separation. First, all 3 *ETV6*-rearranged low-grade SNACs reported were predominantly tubular, composed of cylindrical to cuboidal

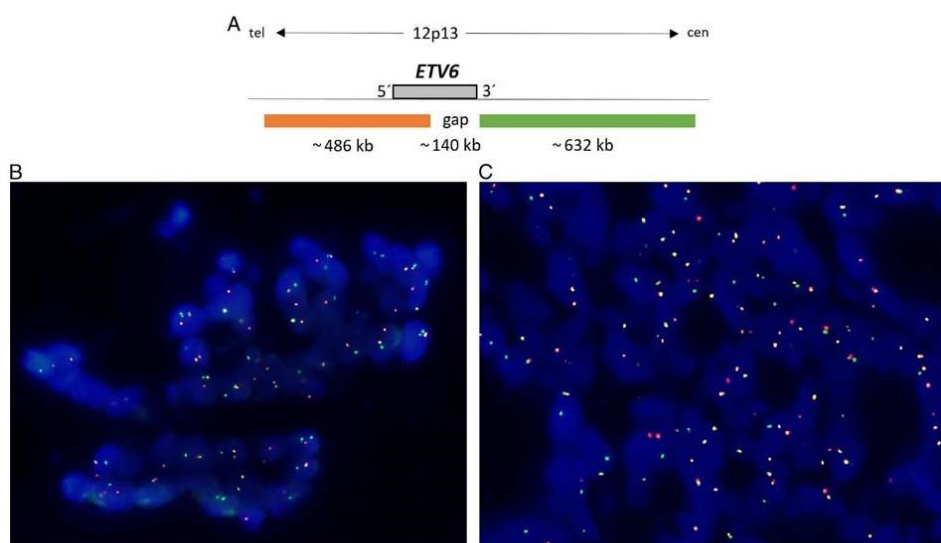


FIGURE 4. FISH. A, Design of the *ETV6* break-apart probe. B, Case 1 showing separate green and orange signals for *ETV6*. C, *NTRK3* indicating concomitant rearrangement of both genes.

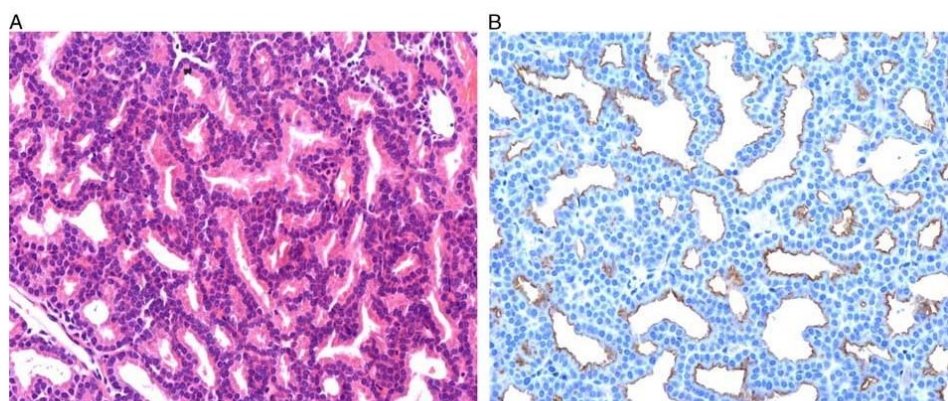


FIGURE 5. Histologic and immunohistochemical findings in *ETV6*-rearranged low-grade SNACs. A, *ETV6*-rearranged low-grade SNACs are composed of glands arranged back-to-back with little intervening stroma and minimal to absent secretory features. B, Tumors are focally DOG-1 positive.

tumor cells with occasional apocrine features and focal trabecular areas, which were not prominent features of sinonasal MASC. Second, tumor cells in *ETV6*-rearranged low-grade SNAC were arranged back-to-back with little intervening stroma with minimal or absent secretory features (Fig. 5A).¹⁸ In contrast, both our MASCs showed abundant hyalinized septae and pronounced secretory features. Third, *ETV6*-rearranged low-grade SNAC is positive for DOG-1, negative for mammaglobin, and negative or patchy positive for S100, with the opposite being the case in MASC (Fig. 5B). Fourth, both MASCs presented here were invasive, whereas this was not seen in *ETV6*-rearranged low-grade SNAC.

The most important reason for separating these 2 entities is the difference in clinical behavior. While low-grade non-ITAC, including *ETV6*-rearranged low-grade SNAC, behaves in an essentially benign manner, MASC is a bona fide malignancy. Awareness of the existence of MASC within this anatomic region is important not only for separating these from the recently described *ETV6*-rearranged low-grade SNAC but also for separating MASC from more aggressive SNACs of non-ITAC and ITAC types.

In conclusion, we report 2 cases of sinonasal MASC and describe its unique features, which are valuable in its separation from *ETV6*-rearranged low-grade SNAC and other low-grade SNACs. Importantly, this separation is merited not only for academic reasons, as the more aggressive nature of MASC could necessitate treatment with TRK inhibitors.^{19,20}

REFERENCES

- Skalova A, Vanecek T, Sima R, et al. Mammary analogue secretory carcinoma of salivary glands, containing the *ETV6-NTRK3* fusion gene: a hitherto undescribed salivary gland tumor entity. *Am J Surg Pathol.* 2010;34:599–608.
- Tognon C, Knezevich SR, Huntsman D, et al. Expression of the *ETV6-NTRK3* gene fusion as a primary event in human secretory breast carcinoma. *Cancer Cell.* 2002;2:367–376.
- Amin SM, Beattie A, Ling X, et al. Primary cutaneous mammary analog secretory carcinoma with *ETV6-NTRK3* translocation. *Am J Dermatopathol.* 2016;38:842–845.
- Bishop JA, Taube JM, Su A, et al. Secretory carcinoma of the skin harboring *ETV6* gene fusions: a cutaneous analogue to secretory carcinomas of the breast and salivary glands. *Am J Surg Pathol.* 2017;41:62–66.
- Hyrca MD, Ng T, Crawford RI. Detection of the *ETV6-NTRK3* translocation in cutaneous mammary-analogue secretory carcinoma. *Diagn Histopathol.* 2015;21:481–484.
- Dogan S, Wang L, Ptashkin RN, et al. Mammary analog secretory carcinoma of the thyroid gland: a primary thyroid adenocarcinoma harboring *ETV6-NTRK3* fusion. *Modern Pathol.* 2016;29:985–995.
- Dettloff J, Seethala RR, Stevens TM, et al. Mammary analog secretory carcinoma (MASC) involving the thyroid gland: a report of the first 3 cases. *Head Neck Pathol.* 2017;11:124–130.
- Stevens TM, Kovalovsky AO, Velosa C, et al. Mammary analog secretory carcinoma, low-grade salivary duct carcinoma, and mimickers: a comparative study. *Mod Pathol.* 2015;28:1084–1100.
- Lurquin E, Jorissen M, Debiec-Rychter M, et al. Mammary analogue secretory carcinoma of the sinus ethmoidalis. *Histopathology.* 2015; 67:749–751.
- Xu B, Aryeequaye R, Wang L, et al. Sinonasal secretory carcinoma of salivary gland with high grade transformation: a case report of this under-recognized diagnostic entity with prognostic and therapeutic implications. *Head Neck Pathol.* 2017; DOI:10.1007/s12105-017-0855-5.
- Slootweg PJ, Chan JKC, Stelow EB, et al. Tumours of the nasal cavity, paranasal sinuses and skull base. In: El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ, eds. *WHO Classification of Head and Neck Tumours*, 4th ed. Lyon: IARC Press; 2017:11–76.
- Leivo I. Sinonasal adenocarcinoma: update on classification, immunophenotype and molecular features. *Head Neck Pathol.* 2016;10:68–74.
- Skalova A, Bell D, Bishop JA, et al. Secretory carcinoma. In: El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ, eds. *WHO Classification of Head and Neck Tumours*, 4th ed. Lyon: IARC Press; 2017:177–178.
- Heffner DK, Hyams VJ, Hauck KW, et al. Low-grade adenocarcinoma of the nasal cavity and paranasal sinuses. *Cancer.* 1982;50: 312–322.
- Wenig B, Hyams VJ, Heffner DK. Nasopharyngeal papillary adenocarcinoma. A clinicopathologic study of a low-grade carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 1988;12:946–953.

16. Skálová A, Cardesa A, Leivo I, et al. Sinonasal tubulopapillary low-grade adenocarcinoma. Histopathological, immunohistochemical and ultrastructural features of poorly recognised entity. *Virchows Arch*. 2003;443:152–158.
17. Luna MA. Sinonasal tubulopapillary low-grade adenocarcinoma. A specific diagnosis or just another seromucous adenocarcinoma? *Adv Anat Pathol*. 2015;12:109–115.
18. Andreassen S, Skálová A, Agaimy A, et al. *ETV6* Gene rearrangements characterize a morphologically distinct subset of sinonasal low-grade non-intestinal-type adenocarcinoma. A novel translocation-associated carcinoma restricted to the sinonasal tract. *Am J Surg Pathol*. 2017;41:1552–1560.
19. Drilon A, Li G, Dogan S, et al. What hides behind the MASC: clinical response and acquired resistance to entrectinib after *ETV6-NTRK3* identification in a mammary analogue secretory carcinoma (MASC). *Ann Oncol*. 2016;27:920–926.
20. Skalova A, Stenman G, Simpson RHW, et al. The role of molecular testing in the differential diagnosis of salivary gland carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2018;42:e11–e27.
21. Murphy DA, Ely HA, Shoemaker R, et al. Detecting gene rearrangements in patient populations through a 2-step diagnostic test comprised of rapid the enrichment followed by sensitive next-generation sequencing. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2017;25:513–523.
22. Viswanatha DS, Foucar K, Berry BR, et al. Blastic mantle cell leukemia: an unusual presentation of blastic mantle cell lymphoma. *Mod Pathol*. 2000;13:825–833.
23. Gaffney R, Chakerian A, O'Connell JX, et al. Novel fluorescent ligase detection reaction and flow cytometric analysis of SYT-SSX fusions in synovial sarcoma. *J Mol Diagn*. 2003;5:127–135.
24. Antonescu CR, Kawai A, Leung DH, et al. Strong association of SYT-SSX fusion type and morphologic epithelial differentiation in synovial sarcoma. *Diagn Mol Pathol*. 2000;9:1–8.
25. Bourgeois JM, Knezevich SR, Mathers JA, et al. Molecular detection of the *ETV6-NTRK3* gene fusion differentiates congenital fibrosarcoma from other childhood spindle cell tumors. *Am J Surg Pathol*. 2000;24:937–946.
26. Ito Y, Ishibashi K, Masaki A, et al. Mammary analogue secretory carcinoma of salivary glands: a clinicopathological and molecular study including 2 cases harboring *ETV6-X* fusion. *Am J Surg Pathol*. 2015;39:602–610.
27. Skalova A, Vanecek T, Simpson RHW, et al. Mammary Analogue Secretory Carcinoma of Salivary Glands. Molecular Analysis of 25 *ETV6* Gene Rearranged Tumors With Lack of Detection of Classical *ETV6-NTRK3* Fusion Transcript by Standard RT-PCR: Report of 4 Cases Harboring *ETV6-X* Gene Fusion. *Am J Surg Pathol*. 2016; 40:3–13.
28. Chiosea SI, Griffith C, Assaad A, et al. Clinicopathological characterization of mammary analogue secretory carcinoma of salivary glands. *Histopathology*. 2012;61:387–394.
29. Chiosea SI, Griffith C, Assaad A, et al. The profile of acinic cell carcinoma after recognition of mammary analog secretory carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2012;36:343–350.
30. Bishop JA, Yonescu R, Batista D, et al. Most nonparotid “acinic cell carcinomas” represent mammary analog secretory carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2013;37:1053–1057.
31. Skálová A. Mammary analogue secretory carcinoma of salivary gland origin: an update and expanded morphologic and immunohistochemical spectrum of recently described entity. *Head Neck Pathol*. 2013;7: S30–S36.
32. Bishop JA. Unmasking MASC: bringing to light the unique morphologic, immunohistochemical and genetic features of the newly recognized mammary analogue secretory carcinoma of salivary glands. *Head Neck Pathol*. 2013;7:35–39.
33. Chenevert J, Duvvuri U, Chiosea S, et al. *DOG1*: a novel marker of salivary acinar and intercalated duct differentiation. *Mod Pathol*. 2012;25:919–929.
34. Bishop JA. Newly described tumor entities in sinonasal tract pathology. *Head Neck Pathol*. 2016;10:23–31.
35. Bishop JA, Andreassen S, Hang JF, et al. HPV-related multiphenotypic sinonasal carcinoma: an expanded series of 49 Cases of the tumor formerly known as HPV-related carcinoma with adenoid cystic carcinoma-like features. *Am J Surg Pathol*. 2017;41:1690–1701.
36. Andreassen S, Bishop JA, Hansen TV, et al. Human papillomavirus-related carcinoma with adenoid cystic-like features of the sinonasal tract: clinical and morphological characterization of six new cases. *Histopathology*. 2017;70:880–888.
37. Agaimy A, Hartmann A, Antonescu CR, et al. *SMARCB1* (*INI-1*)-deficient sinonasal carcinoma: a series of 39 cases expanding the morphologic and clinicopathologic spectrum of a recently described entity. *Am J Surg Pathol*. 2017;41:458–471.

Molekulární profilování intraduktálního karcinomu slinných žláz odhalilo podskupinu tumorů nesoucí fúze NCOA4-RET a novou fúzi TRIM27-RET: Report 17 případů.

V této publikaci „*Molecular Profiling of Salivary Gland Intraductal Carcinoma Revealed a Subset of Tumors Harboring NCOA4-RET and Novel TRIM27-RET Fusions: A Report of 17 cases*“, byla věnována pozornost nově zavedené entitě v salivární patologii, a to intraduktálnímu karcinomu, který až v polovině případů nese translokaci *NCOA4-RET* (151). Tato studie, která je se svými 17 případy doposud nejrozsáhlejší, měla za cíl pomocí molekulárně-genetické analýzy detekovat nejčastěji se vyskytující genové fúze v intraduktálním karcinomu, eventuálně objevit fúze nové. Ze salivárních registrů bylo vybráno 17 případů intraduktálních karcinomů, z toho 7 případů bylo zasláno ke konzultačnímu vyšetření s původní diagnózou sekrečního karcinomu, se kterým sdílí nejenom velmi podobnou histomorfologii, ale i imunoprofil, který se liší prakticky pouze v expresi p63/CK14/calponinu na periférii neinvazivní komponenty nádoru. Pomocí NGS bylo objeveno 8 (47 %) případů nesoucí fúzi v genu *RET*. U 6 případů byla prokázána typická translokace *NCOA4-RET* a ve 2 případech s výraznými apokrinními rysy byl nalezen nový, doposud nepopsaný fúzní partner *TRIM27*. Tyto nálezy byly potvrzeny i pomocí FISH a RT-PCR a byla tak vyloučena přítomnost translokace *ETV6-NTRK3*. K tomuto souboru byl pomocí dvoustupňové metody screeningu přiřazen ještě 1 případ tumoru parotis 35letého muže, který je unikátní přítomností metastázy v regionální lymfatické uzlině (případ č. 26). Tento tumor vykazoval granulární cytoplasmatickou pozitivitu v IHC koktejlu protilátek detekující aberace v genech *NTRK1-3*, *ALK* a *ROS1* a byl proto indikován k molekulárně-genetické analýze metodou NGS, kde byla objevena typická translokace *NCOA4-RET*. Tento rozsáhlý soubor IC byl prezentován na Kongresu amerických a kanadských patologů USCAP 2019 ve formě posteru.

Molecular Profiling of Salivary Gland Intraductal Carcinoma Revealed a Subset of Tumors Harboring *NCOA4-RET* and Novel *TRIM27-RET* Fusions

A Report of 17 cases

Alena Skálová, MD, PhD,* Tomas Vanecek, PhD,*† Emmanuelle Uro-Coste, MD, PhD,‡§
Justin A. Bishop, MD, PhD,|| Ilan Weinreb, MD,¶ Lester D.R. Thompson, MD,#
Stefano de Sanctis, MD, PhD,** Marco Schiavo-Lena, MD,†† Jan Laco, MD, PhD,‡‡
Cécile Badoual, MD, PhD,§§ Thalita Santana Conceição, DDS, MSc, PhD,¶¶
Nikola Ptáková, MSc,† Martina Baněčková, MD,* Marketa Miesbauerová, MD,*
and Michal Michal, MD*

Abstract: Intraductal carcinoma (IC) is the new World Health Organization designation for tumors previously called “low-grade cribriform cystadenocarcinoma” and “low-grade salivary duct carcinoma.” The relationship of IC to salivary duct carcinoma is controversial, but they now are considered to be distinct entities. IC is a rare low-grade malignant salivary gland neoplasm with features similar to mammary atypical ductal hyperplasia or ductal carcinoma in situ, that shows diffuse S100 protein and mammaglobin positivity and is only partially defined genetically. (Mammary analogue) secretory carcinoma harboring *ETV6-NTRK3*, and in rare cases *ETV6-RET* fusion, shares

histomorphologic and immunophenotypical features with IC. Recently, *RET* rearrangements and *NCOA4-RET* have been described in IC, suggesting a partial genetic overlap with mammary analogue secretory carcinoma. Here, we genetically characterize the largest cohort of IC to date to further explore this relationship. Seventeen cases of IC were analyzed by next-generation sequencing using the FusionPlex Solid Tumor kit (ArcherDX). Identified fusions were confirmed using fluorescence in situ hybridization break apart and, in some cases, fusion probes, and a reverse transcription polymerase chain reaction designed specifically to the detected breakpoints. All analyzed cases were known to be negative for *ETV6* rearrangement by fluorescence in situ hybridization and for *ETV6-NTRK3* fusion by reverse transcription polymerase chain reaction. Next-generation sequencing analysis detected a *NCOA4-RET* fusion transcript joining exon 7 or 8 of *NCOA4* gene and exon 12 of *RET* gene in 6 cases of intercalated duct type IC; and a novel *TRIM27-RET* fusion transcript between exons 3 and 12 in 2 cases of salivary gland tumors displaying histologic and immunohistochemical features typical of apocrine IC. A total of 47% of IC harbored a fusion involving *RET*. In conclusion, we have confirmed the presence of *NCOA4-RET* as the dominant fusion in intercalated duct type IC. A novel finding in our study has been a discovery of a subset of IC patients with apocrine variant IC harboring a novel *TRIM27-RET*.

Key Words: salivary gland neoplasm, intraductal carcinoma, cystadenocarcinoma, mammary analogue secretory carcinoma, MASc, *NCOA4-RET*, *TRIM27-RET*, *RET*-targeted therapy

(*Am J Surg Pathol* 2018;42:1445–1455)

Secretory carcinoma of the salivary glands, also known as mammary analogue secretory carcinoma (MASc), was originally described by Skálová et al, in 2010.¹ Most of these tumors were previously categorized as acinic cell carcinoma,^{2–4} adenocarcinoma not otherwise specified or low-grade cystadenocarcinoma, but were recognized as a

From the *Department of Pathology, Charles University, Faculty of Medicine in Plzen; †Molecular and Genetic Laboratory, Biopitcká Laboratory Ltd, Plzen; ‡‡The Fingerland Department of Pathology, Charles University, Faculty of Medicine and University Hospital, Hradec Kralove, Czech Republic; ‡Department of Pathology, Toulouse University Hospital; §INSERM U1037, Cancer Research Center of Toulouse (CRCT), Toulouse; §§Department of Pathology, G. Pompidou Hospital, Paris, APHP, Paris Descartes University, Paris, France; ||Department of Pathology, UT Southwestern Medical Center, Dallas, TX; ¶Department of Pathology, University Health Network, Toronto, ON, Canada; #Southern California Permanente Medical Group, Woodland Hills, CA; **Histopathology Department, Addenbrooke Hospital, Cambridge University Hospitals NHS Trust, Cambridge, UK; ††Department of Pathology, IRCCS San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy; and |||Department of Oral Pathology, Faculty of Dentistry, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

The preliminary results of the study were presented as a platform presentation at USCAP Meeting 2018, Vancouver, Canada, March 17–22, 2018 (A.S.).

Conflicts of Interest and Source of Funding: Supported in parts by the grant SVV-2018 No. 260 391 provided by the Ministry of Education Youth and Sports of the Czech Republic. The authors have disclosed that they have no significant relationships with, or financial interest in, any commercial companies pertaining to this article.

Correspondence: Alena Skálová, MD, PhD, SIKL's Department of Pathology, Medical Faculty of Charles University, Faculty Hospital, E. Benese 13, Plzen 305 99, Czech Republic (e-mail: skalova@fnplzen.cz).

Copyright © 2018 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

Am J Surg Pathol • Volume 42, Number 11, November 2018

www.ajsp.com | 1445

Copyright © 2018 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

distinct entity based on their morphologic and molecular resemblance to secretory carcinoma of the breast,¹ and subsequently adopted by the World Health Organization (WHO) Classification of Head and Neck Tumours in 2017 as secretory carcinoma of salivary glands.⁵ MASCs are characterized by abundant eosinophilic cytoplasm and secretions, consistent immunohistochemical positivity for S100 and mammaglobin, and recurrent *ETV6-NTRK3* gene fusions. Increasing experience with MASCs, however, has also highlighted a small subset of cases that demonstrate divergent molecular findings.^{6,7} Most notably, Skálová et al,⁸ recently characterized 10 cases with alternate *ETV6-RET* fusion.

Intraductal carcinoma (IC) is the new WHO designation for tumors previously called “low-grade cribriform cystadenocarcinoma” and “low-grade salivary duct carcinoma.”⁹ The relationship of IC to salivary duct carcinoma (SDC) has been controversial, but recently they are considered to be distinct entities. IC is a rare low-grade malignant salivary gland neoplasm with features similar to mammary atypical ductal hyperplasia or ductal carcinoma in situ, that shows diffuse S100 protein and mammaglobin positivity and an intact myoepithelial cell layer decorated by p63 protein, calponin, and cytokeratin 14.

MASC has many architectural and immunophenotypic features similar to, or identical with IC. Both tumors may share diffuse S100 protein and mammaglobin positivity and similar architectural features, such as cribriform-like secretory spaces, multicystic architecture and papillary growth pattern.¹ These 2 morphologically similar entities should be, however, strictly separated. Pure IC is an in situ lesion with no capacity for metastasizing while MASC does not have any significant intraductal component and may metastasize. Most importantly, the neoplastic nests and cysts of IC are completely surrounded by a rim of non-neoplastic myoepithelial cells, which are positive for p63 protein, and other myoepithelial cell-related markers such as smooth muscle actin, CK14, and calponin. Thus, immunohistochemistry is helpful in differential diagnosis between IC and MASC; with p63 protein expression providing evidence of intact myoepithelial layer in IC while virtually negative in MASC.

Weinreb et al,¹⁰ recently demonstrated recurrent rearrangements involving *RET* in 47% of ICs with an intercalated duct phenotype and confirmed *NCOA4-RET* fusion in one such case using next-generation sequencing (NGS) and direct sequencing. Dogan et al,¹¹ presented, however, at the USCAP Annual Meeting on March 6th 2017 as a poster, *NCOA4-RET* fusion in one of 4 tumors morphologically and immunophenotypically compatible with MASC using the NGS assay. The proposed novel finding of *NCOA4-RET* fusion in MASC attracted our attention as it was in contrast with our experience. So far, we have tested > 300 cases of MASC and never found any other fusion than *ETV6-NTRK3* or *ETV6-RET*.^{1,8}

There have been only limited genomic and immunohistochemical comparative studies of pure IC and MASC, so far. One case of “low-grade cribriform cystadenocarcinoma” tested as part of the control group in the original description of MASC was *ETV6* negative by fluorescence in situ

hybridization (FISH).¹ A second study found one case of “low-grade cribriform cystadenocarcinoma” to be *ETV6* negative by FISH.¹² A recent third study also showed *ETV6* negativity by FISH in 5 cases of IC tested.¹³ In the study by Shah et al,¹⁴ there was a single case originally classified as MASC that was negative to *ETV6* break by FISH, and positive for S100 and mammaglobin by immunohistochemistry, re-classified as IC on review. The study by Weinreb et al,¹⁰ also found no evidence of *ETV6* rearrangement in any of their IC cases tested, and did not confirm the partner gene for *RET* in the majority of the tumors. Therefore, we used a comprehensive genetic analysis to examine the largest cohort of IC to date, with the goal of defining the most common gene fusions and potentially identifying novel fusions.

MATERIALS AND METHODS

Among more than 6200 cases of primary salivary gland tumors, 16 cases of IC were retrieved from the consultation files of the Salivary Gland Tumor Registry, at the Department of Pathology, Faculty of Medicine in Plzen, and Biopsticka Laboratory Ltd, Plzen, Czech Republic (A.S. and M.M.). Interestingly, 7 cases were originally diagnosed as MASCs by referring pathologists, and sent as consults for molecular confirmation. One additional case of predominantly apocrine IC was added which was originally reported as case no. 15 in Weinreb et al,¹⁰ and tested by NGS.

The histopathologic features of all tumors and the immunohistochemical stains, when available, were reviewed by 2 pathologists (A.S. and M.B.). A diagnosis of IC was confirmed in cases that displayed histologic features consistent with original description in conjunction with the appropriate immunohistochemical profile, that is, co-expression of S100 protein, cytokeratin CK7, and mammaglobin in the absence of DOG1 staining. Moreover, an intact myoepithelial layer decorated by p63 and/or CK14 and calponin provided evidence of intraductal component. Widely invasive carcinomas were excluded. Tumors were classified further into 2 groups, according to criteria published recently¹⁰: those that showed an intercalated duct phenotype and those with an apocrine phenotype. This was determined both histologically and immunohistochemically. Thus, a total number of 17 IC cases were studied by NGS using ArcherDX FusionPlex kit.

For conventional microscopy, the excised tissues were fixed in formalin, routinely processed, embedded in paraffin (FFPE), cut, and stained with hematoxylin and eosin. In most cases, additional stains were also performed, including periodic acid-Schiff with and without diastase, mucicarmine, and Alcian blue at pH 2.5.

For immunohistochemical analysis, 4- μ m-thick sections were cut from paraffin blocks and mounted on positively charged slides (TOMO, Matsunami Glass IND, Japan). Sections were processed on a BenchMark ULTRA (Ventana Medical System, Tucson, AZ), deparaffinized and then subjected to heat-induced epitope retrieval by immersion in a CCI solution at pH 8.6 at 95°C. All

TABLE 1. Antibodies Used for Immunohistochemical Study

Antibody Specificity	Clone	Dilution	Antigen Retrieval/ Time (min)	Source
S100 protein	Polyclonal	RTU	CC1/20	Ventana
Mammaglobin	304-1A5	RTU	CC1/36	DakoCytomation
CK7	OV-TL 12/30	1:200	CC1/36	DakoCytomation
p63	4A4	RTU	CC1/64	Ventana
DOG1	SP31	RTU	CC1/36	Cell Marque
GATA-3	L50-823	1:200	CC1/52	BioCareMedical
SOX-10	Polyclonal	1:100	CC1/64	Cell Marque
MIB1	30-9	RTU	CC1/64	Ventana
Androgen receptor	SP107	RTU	CC1/64	Cell Marque
Calponin	EP798Y	RTU	CC1/36	Cell Marque
CK 14	SP53	RTU	CC1/64	Cell Marque

CC1—EDTA buffer, pH 8.6.
RTU indicates ready to use.

other primary antibodies used are summarized in Table 1. The bound antibodies were visualized using the ultraView Universal DAB Detection Kit (Roche) and ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit (Roche). The slides were counterstained with Mayer's hematoxylin. Appropriate positive and negative controls were employed.

Where available, clinical follow-up was obtained from the patients, their physicians, or from referring pathologists.

Molecular Genetic Study

Sample Preparation for NGS and Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

For NGS and reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis, 2 to 3 FFPE sections (10 μ m thick) were macrodissected to isolate tumor-rich regions. Samples were extracted for total nucleic acid using Agencourt FormaPure Kit (Beckman Coulter, Brea, CA) following the corresponding protocol with an overnight digest and an additional 80°C incubation as described in modification of the protocol by ArcherDX (ArcherDX Inc., Boulder, CO). RNA component of the total nucleic acid was quantified using the Qubit Broad Range RNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) and 2 μ L of sample.

RNA Integrity Assessment and Library Preparation for NGS

Unless otherwise indicated, 250 ng of FFPE RNA was used as input for NGS library construction. To assess RNA quality, the PreSeq RNA QC Assay using iTaq Universal SYBR Green Supermix (Biorad, Hercules, CA) was performed on all samples during library preparation to generate a measure of the integrity of RNA (in the form of a cycle threshold [Ct] value). Library preparation and RNA QC were performed following the Archer FusionPlex Protocol for Illumina (ArcherDX Inc.). The Archer FusionPlex Solid Tumor Kit was used. Final libraries were diluted 1:100,000 and quantified in a 10 μ L reaction following

the Library Quantification for Illumina Libraries protocol and assuming a 200 bp fragment length (KAPA, Wilmington, MA). The concentration of final libraries was around 200 nM. Threshold representing the minimum molar concentration for which sequencing can be robustly performed was set at 50 nM.

NGS Sequencing and Analysis

Libraries were sequenced on a NextSeq 500 sequencer (Illumina, San Diego, CA). They were diluted to 4 nM and equal amounts of up to 16 libraries were pooled per run. The optimal number of raw reads per sample was set to 3,000,000. Library pools were diluted to 1.8 pM library stock spiked with 20% PhiX and loaded in the NextSeq MID cartridge. Analysis of sequencing results was performed using the Archer Analysis software (v5; ArcherDX Inc.). Fusion parameters were set to a minimum of 5 valid fusion reads with a minimum of 3 unique start sites within the valid fusion reads.

FISH Analysis of RET Break and TRIM27-RET Fusion

Four micrometer thick FFPE sections were placed onto positively charged slides. Hematoxylin and eosin-stained slides were examined for determination of areas for cell counting.

The unstained slides were routinely deparaffinized and incubated in the \times 1 Target Retrieval Solution Citrate pH 6 (Dako, Glostrup, Denmark) at 95°C for 40 minutes and subsequently cooled for 20 minutes at room temperature in the same solution. Slides were washed in deionized water for 5 minutes and digested in protease solution with Pepsin (0.5 mg/mL) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) in 0.01 M HCl at 37°C for 35 to 60 minutes according to the sample conditions. Slides were then placed into deionized water for 5 minutes, dehydrated in a series of ethanol solution (70%, 85%, 96% for 2 min each) and air-dried.

For the detection of *RET* rearrangement, factory premixed commercial probe ZytoLight SPEC *RET* Dual Color Break Apart Probe (ZytoVision GmbH, Bremerhaven, Germany) have been used. For the *TRIM27-RET* dual-fusion detection custom designed SureFISH probe (Agilent Technologies Inc., Santa Clara with chromosomal regions chr6:28631476-29131075 and chr10:43354893-43849282 have been used. Probe-mixture for the fusion detection was prepared from corresponding probes (each color was delivered in separated well), deionized water and LSI Buffer (Vysis/Abbott Molecular) in a 1:1:1:7 ratio, respectively.

An appropriate amount of mixed and premixed probes was applied on specimens, covered with a glass coverslip and sealed with rubber cement. Slides were incubated in the ThermoBrite instrument (StatSpin/Iris Sample Processing, Westwood, MA) with codenaturation at 85°C/8 minutes and hybridization at 37°C/16 hours. Rubber cemented coverslip was then removed and the slide was placed in post-hybridization wash solution (2 \times SSC/0.3% NP-40) at 72°C/2 minutes. The slide was air-dried in the dark, counterstained with 4', 6'-diamidino-2-phenylindole DAPI (Vysis/Abbott Molecular), cover slipped and immediately examined.

TABLE 2. Primers for RT-PCR Analysis

Primer Name	Sequence 5'-3'
NCOA4-RET-7-12-F	CCCTTCCTGGAGAAGAGAGG
NCOA4-RET-7-12-R	GTACCTGCTCTGCCTTCA
NCOA4-RET-8-12-F	TACCCAAAAGCAGACCTTGG
NCOA4-RET-8-12-R	CGCCTTCTCCTAGAGTTTCC
TRIM27-RET-3-12-F	TGATCGCTCAGCTAGAAGAGAA
TRIM27-RET-3-12-R	CCAAGTTCCTCCGAGGGAAT

FISH Interpretation

The sections were examined with an Olympus BX51 fluorescence microscope (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) using a $\times 100$ objective and filter sets Triple Band Pass (DAPI/SpectrumGreen/SpectrumOrange), Dual Band Pass (SpectrumGreen/SpectrumOrange) and Single Band Pass (SpectrumGreen or SpectrumOrange).

For each probe, 100 randomly selected nonoverlapping tumor cell nuclei were examined for the presence of yellow or green and orange fluorescent signals. Regarding break-apart probe, yellow signals were considered negative, separate orange

and green signals were considered as positive; conversely for fusion probe, yellow signals were considered positive, separate orange and green signals were considered as negative. Cut-off values for break apart and fusion probes were set to $<10\%$ and 20% of nuclei with chromosomal breakpoint and fusion signals, respectively (mean+3 SD in normal non-neoplastic control tissues).

RT-PCR Analysis of NCOA4-RET and TRIM27-RET Fusion Transcripts

Two microliter of cDNA prepared by standard RT procedure using Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (RNA input 500 ng) (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) was added to reaction consisted of 12.5 μL of HotStar Taq PCR Master Mix (QIAGEN, Hilden, Germany), 10 pmol of each fusion specific primer (Table 2) and distilled water up to 25 μL . The amplification program comprised denaturation at 95°C for 14 minutes and then 45 cycles of denaturation at 95°C for 1 minute, annealing at temperature 55°C for 1 minute and extension at 72°C for 1 minute. The program was finished by incubation at 72°C for 7 minutes.

TABLE 3. Detailed Molecular Findings of 17 Cases of Salivary Gland ICs

No.	Age/ Sex	Diagnosis	NGS	Exons Joining	FISH RET ba	FISH TRIM27-RET Fusion	RT-PCR Fusion Specific	FISH ETV6 ba	RT-PCR ETV6-NTRK3
1	38/M	Pure IC intercalated duct type, solid microcystic, rich lymphoid stroma	NCOA4-RET	8-12	Positive*	ND	Positive	Negative	Negative
2	47/M	Pure IC intercalated duct type, solid multicystic, "MASC-like"	NCOA4-RET	7-12	Positive*	ND	Positive	Negative	Negative
3	54/M	IC with apocrine features, micropapillary, minimal invasion	TRIM27-RET	3-12	Positive	Positive	Positive	Negative	Negative
4	50/M	Pure IC intercalated duct type, solid multicystic, "MASC-like"	NA	—	NA	ND	Negative	Negative	Negative
5	58/M	Pure IC intercalated duct type, solid microcystic, apocrine, papillary	NA	—	NA	ND	ND	NA	Negative
6	81/M	Pure IC intercalated duct type, "roman bridges" Invasive component of epithelial-myoeithelial carcinoma	NA	—	Negative	ND	Negative	Negative	Negative
7†	50/F	Pure IC intercalated duct type, unicystic	Negative	—	Negative	ND	ND	Negative	Negative
8	74/M	Pure IC intercalated duct type, papillary, multicystic	NCOA4-RET	8-12	Positive*	ND	Positive	Negative	Negative
9	36/F	Pure IC intercalated duct type, few apocrine cells	Negative	—	Negative	ND	ND	Negative	Negative
10	53/F	IC intercalated duct type, minimal invasion	Negative	—	Negative	ND	ND	Negative	Negative
11	75/F	IC with apocrine features, papillary, thick fibrous capsule	Negative	—	Negative	ND	ND	Negative	Negative
12	69/M	IC with apocrine features, unicystic	Negative	—	ND	ND	ND	ND	Negative
13	42/F	Pure IC intercalated duct type, unicystic	Negative	—	ND	ND	ND	Negative	Negative
14	61/F	Pure IC intercalated duct type, solid, microcystic, "MASC-like"	NCOA4-RET	7-12	Positive*	ND	Positive	Negative	Negative
15	36/M	Pure IC intercalated duct type, solid, microcystic, "MASC-like"	NCOA4-RET	8-12	Positive*	ND	Positive	NA	Negative
16	50/M	Pure IC intercalated duct type, solid, microcystic, "MASC-like"	NCOA4-RET	8-12	Positive	ND	Positive	ND	ND
17‡	66/M	IC with widespread apocrine features, and hybrid intercalated duct pattern	TRIM27-RET	3-12	Positive	Positive	Positive	ND	ND

*Cases 1 to 2, 8, and 14 to 16 showed a RET FISH signal pattern indicative of an inversion/rearrangement (in one allele a gap between orange and green signals was observed, however this gap did not reach internal cut-off (≥ 2 signal diameters apart).

†Published in Laco et al.²²

‡Published as case no.15 in Weinreb et al.¹⁰

F indicates female; M, male; NA, not analyzable; ND, not done.

Successfully amplified PCR products were purified with magnetic particles Agencourt AMPure (Agencourt Bioscience Corporation, A Beckman Coulter Company, Beverly, MA). Products were then bi-directionally sequenced using Big Dye Terminator Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA), purified with magnetic particles Agencourt CleanSEQ (Agencourt Bioscience Corporation), all according to manufacturer's protocol and run on an automated sequencer ABI Prism 3130x1 (Applied Biosystems) at a constant voltage of 13.2 kV for 11 minutes.

RESULTS

Molecular Genetic Findings

The 17 cases of IC were analyzed by NGS using the ArcherDX analysis platform. This analysis detected a *NCOA4-RET* fusion transcript joining exon 7 or 8 of *NCOA4* gene and exon 12 of *RET* gene in 6 cases and a novel *TRIM27-RET* fusion transcript between exons 3 and 12 in 2 cases of salivary gland tumors displaying histologic and immunohistochemical features typical of

apocrine IC (Table 3). The fusion transcripts were confirmed by RT-PCR and sequencing (Figs. 1A–C). FISH analysis using *RET* break-apart probe showed 2 different patterns, one “negative” when distance criteria was used according to the interpretation rules, but still showing small separation of signals (cases 1 to 2, 8, and 14 to 16) (Fig. 2A), and a regular break (classic positive pattern) with apparent separation of signals demonstrated in 2 cases (cases 3 and 17) (Fig. 2B). Confirmation using FISH *TRIM27-RET* fusion probe displayed fusion signals with amplification (Fig. 2C). Localization of *RET*, *NCOA4*, and *TRIM27* genes for an explanation of 2 different patterns of FISH break-apart results is shown in the figure (Fig. 2D).

All analyzed cases were negative for *ETV6-NTRK3* gene fusion by the FusionPlex kit, RT-PCR, and *ETV6* gene was found intact by FISH (Table 3). No other fusion transcripts different from *NCOA4-RET* or *TRIM27-RET* were found by NGS in any analyzable case of IC. A total of 47% of analyzed cases harbored a *RET* fusion by NGS, an identical finding to that found by Weinreb et al.¹⁰ By RT-PCR, the fusions *NCOA4-RET* and *TRIM27-RET* were confirmed in all NGS positive cases. The *RET* FISH break-apart probe and



FIGURE 1. Schematic representation of the fusion transcripts with Sanger sequence of RT-PCR. *NCOA4-RET* exons 7 and 12 (A), *NCOA4-RET* exons 8 and 12 (B), *TRIM27-RET* exons 3 and 12 (C).

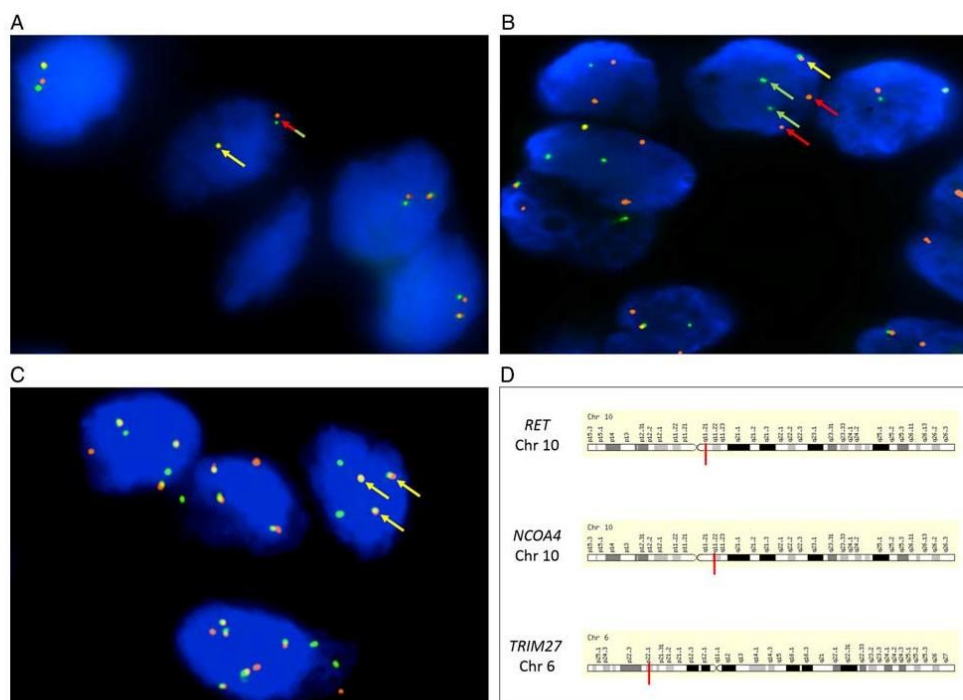


FIGURE 2. FISH analysis. A, Seemingly negative *RET* break-apart probe with small separation of signals (red-green arrow). B, Regular *RET* break-apart probe positivity (red and green arrows); yellow arrows show intact gene in both cases. C, *TRIM27-RET* fusion probe positivity with signal amplification (yellow arrows). D, Scheme of chromosomal localization of *RET*, *NCOA4*, and *TRIM27* genes.

TRIM27-RET fusion probe successfully detected the *RET* rearrangement in both cases with *TRIM27-RET*. “False” negative FISH results were obtained in all *NCOA4-RET* cases for *RET* rearrangement owing to this fusion being the result of an intrachromosomal rearrangement with inversion. Although a narrow separation of the FISH signals was noted in each case. The molecular findings are summarized in Table 3.

Clinical and Histologic Characteristics of the Study Group

The study cohort consisted of 15 pure ICs and 2 ICs with limited microinvasion. The patients with available clinical information included 11 males and 6 females, with a wide age-range at diagnosis of 36 to 81 years (mean, 55.3 y). The most common anatomic site of involvement was the parotid gland (no. = 16 patients), with one case in the buccal mucosa. The tumors ranged from 0.6 to 4.6 cm (mean, 1.64 cm). Detailed clinical, follow-up, and histologic findings in 17 patients with IC are summarized in Table 4.

Grossly, the tumors were entirely circumscribed and encapsulated in most cases, although infiltrative edges were seen in 2 cases. All tumors were treated by surgical excision with clear surgical margins. Five patients underwent subtotal

conservative parotidectomy (cases 2, 8, 14 and 15), followed by radiation therapy (case 8), and cervical lymph node dissection (case 2), respectively. Clinical follow-up data were obtained from 15 patients, and ranged from 8 months to 15 years (mean, 5 y and 5 mo); 2 patients were lost to follow-up.

Microscopic and Immunohistochemical Features

Histologically, at low power magnification, most cases were well-circumscribed and encapsulated. Focal areas with microinvasion were seen in 2 cases of IC (case 3 and 10). In addition, in case 6 the tumor of parotid gland was a hybrid lesion composed of 2 separate components, one was invasive epithelial-myoepithelial carcinoma and the other pure IC without invasion. Lymphovascular and perineural invasion was absent in all cases. All tumors were characterized by luminal epithelial proliferations with ductal phenotype arranged mainly in multiple cystic patterns, besides solid and cribriform islands (Fig. 3A). Intracystic growth often formed micropapillary structures with anastomosing and filigreed epithelial tufts, comprising the so called Roman-bridges pattern (Fig. 3B). Eosinophilic proteinaceous secretion and hemorrhagic areas were occasionally observed in some cystic spaces, as well as

TABLE 4. Clinicopathologic Features of 16 Cases of Salivary Gland Intraductal Carcinomas

No.	Age/ Sex	Site	Size (cm)	Diagnosis	Nuclear Grade	S100 Protein/ MGA	AR	Treatment	Outcome (in months)
1	38/M	Parotid	4.0	Pure IC intercalated duct type, solid microcystic, rich lymphoid stroma	Low	+/+	–	Superficial parotidectomy	20 NED
2	47/M	Parotid	1.4	Pure IC intercalated duct type, solid multicystic, "MASC-like"	Low	+/+	–	Parotidectomy and neck dissection	36 NED
3	54/M	Parotid	2.2	IC with apocrine features, micropapillary, minimal invasion	High	+/+	+	Superficial parotidectomy	8 NED
4	50/M	Parotid	1.0	Pure IC intercalated duct type, solid multicystic, "MASC-like"	Low	+/+	–	Partial parotidectomy	57 NED
5	58/M	Parotid	1.5	Pure IC intercalated duct type, solid microcystic, apocrine, papillary	Low	+/+	+	Wide excision	144 NED
6	81/M	Parotid	NA	Pure IC intercalated duct type, "roman-bridges" Invasive component of epithelial-myoepithelial carcinoma*	Low	+/ND	–	NA	NA
7	50/F	Parotid	1.5	Pure IC intercalated duct type, unicystic	Low	+/+	–	Wide excision	72 NED
8	74/M	Parotid	1.5	Pure IC intercalated duct type, papillary, multicystic	Low	+/+	–	Parotidectomy and radiotherapy	62 NED
9	36/F	Buccal mucosa	0.6	Pure IC intercalated duct type, few apocrine cells	Low	+/+	ND	Wide excision	180 NED
10	53/F	Parotid	2.0	IC intercalated duct type, minimal invasion	Low	+/+	–	Parotidectomy	180 NED
11	75/F	Parotid	4.6	IC with apocrine features, papillary, thick fibrous capsule	Intermediate	+/+	ND	Parotidectomy	72 NED
12	69/M	Parotid	0.9	IC with apocrine features, unicystic	Low	+/ND	ND	Parotidectomy	60 NED
13	42/F	Parotid	0.7	Pure IC intercalated duct type, unicystic	Low	+/ND	ND	Parotidectomy	60 NED
14	61/F	Parotid	1.5	Pure IC intercalated duct type, solid, microcystic, "MASC-like" Focal necrosis	Low	+/+	–	Partial parotidectomy (deep lobe)	8 NED
15	36/M	Parotid	1.0	Pure IC intercalated duct type, solid, microcystic, "MASC-like"	Low	+/+	–	Partial parotidectomy	8 NED
16	50/M	Parotid	2.5	Pure IC intercalated duct type, solid, microcystic, "MASC-like"	Low	+/+	–	Partial parotidectomy	12 NED
17*	66/M	Parotid	1.3	IC with widespread apocrine features, and hybrid intercalated duct pattern	Intermediate	+/+	+	NA	NA

*Published as case no.15 in Weinreb et al.¹⁰

F indicates female; MGA, mammaglobin; M, male; NA, not available; ND, not done; NED, no evidence of disease.

cholesterol clefts and foamy histiocytes. Tumor stroma was densely collagenized in 3 cases, while in one case there was rich lymphoid stroma with a growth pattern similar to Warthin tumor (case 1) (Fig. 3C).

On high-power magnification, all cases showed bland cytology, with tumor cells ranging from small to medium size, with indistinct cell borders, showing round or ovoid nuclei with dark condensed or finely dispersed chromatin and large pale to eosinophilic cytoplasm. Mitoses were inconspicuous and only in one case there were focal comedo necrosis (case 14). Tumor cells showed lipofuscin-like brown pigment within cells intracytoplasmic vacuoles in most cases (Fig. 3D). Six cases showed focal (cases 5, 9) or extensive apocrine differentiation (cases 3, 11, 12, 17) (Fig. 4A).

In ICs with apocrine and mixed hybrid growth patterns (6/17), most tumor cells were positive for androgen receptor (AR) (Fig. 4B). All examined IC cases were positive for S100 protein (Fig. 5A), mammaglobin (Fig. 5B), and SOX-10 (Fig. 5C), typically in a strong and diffuse manner. An intact myoepithelial cell layer surrounding tumor islands was evidenced by p63 immunohistochemical expression (which was negative in other tumor cells) (Fig. 5D). Calponin, and CK 14 decorated an intact peripheral myoepithelial cell layer

in all examined cases, as well. Staining for DOG1 was negative in most cases, with limited areas of positive cells in one case. Proliferative activity was generally low, with a mean MIB1 index <5% (range 1% to 10%).

DISCUSSION

The term "intraductal carcinoma" of the salivary gland was first introduced in 1983 by Chen¹⁵ in a description of a single case arising in minor salivary gland of the oral cavity. Subsequently, several case reports and small series of the same tumor entity were published with various names, including "low-grade salivary duct carcinoma,"^{16,17} and "low-grade cribriform cystadenocarcinoma."¹⁸ These all referred to a combination of cystic and solid structures of varying size formed by intraductal epithelial proliferation composed of cells resembling intercalated ductal cells and structures similar to atypical ductal hyperplasia and ductal carcinoma in situ of breast. In the current WHO classification, this tumor is now again regarded as an IC.⁹

IC has been surrounded by controversy since its discovery not only because of variable terminologies, but mainly because of its uncertain relationship to SDC.¹⁶⁻¹⁹

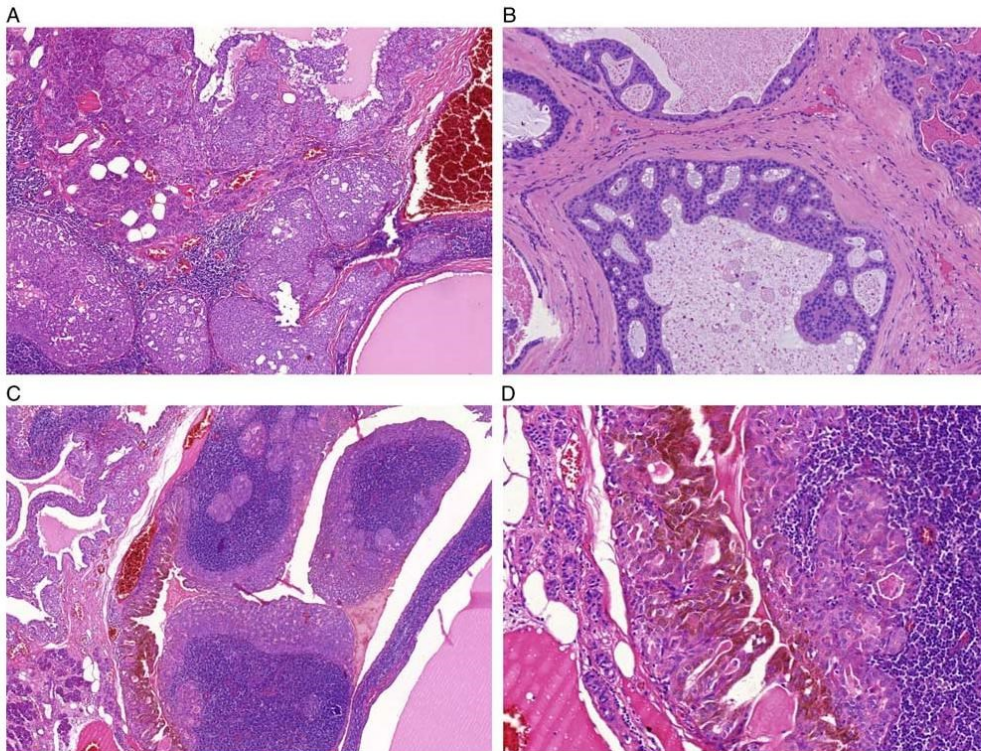


FIGURE 3. IC, intercalated duct type. A, All tumors were characterized by luminal epithelial proliferations with ductal phenotype arranged mainly in multiple cystic patterns, besides solid and cribriform islands. B, Intracystic growth often formed micropapillary structures with anastomosing and filigreed epithelial tufts, comprising the so called Roman-bridges pattern. C, There was rich lymphoid stroma with growth pattern similar to Warthin tumor in case 1. D, Tumor cells showed lipofuscin-like brown pigment within cells intracytoplasmic vacuoles in most cases.

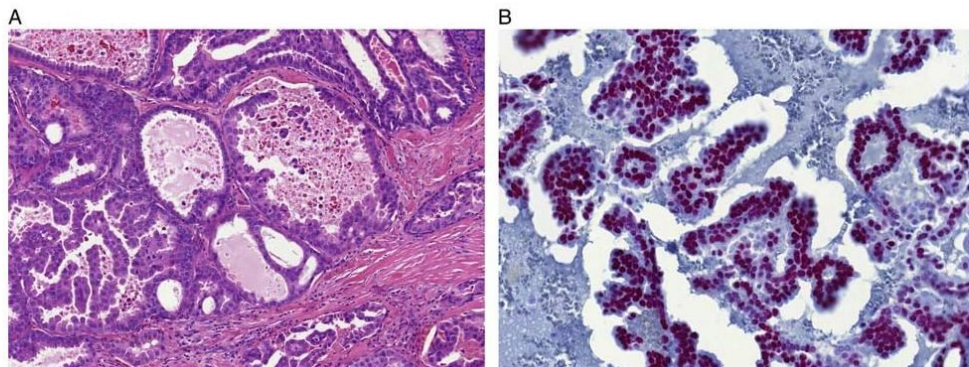


FIGURE 4. IC, apocrine variant. IC with widespread apocrine differentiation (A). Most tumor cells were positive for AR (B).

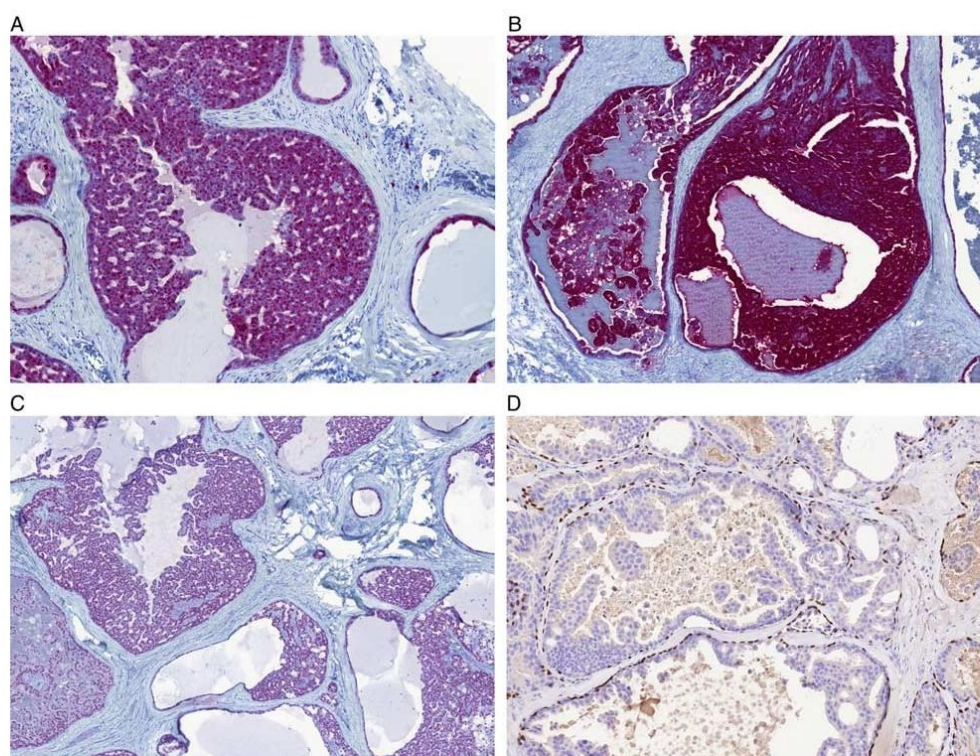


FIGURE 5. IC, immunoprofile. IC cases were positive for S100 protein (A), mammaglobin (B), and SOX-10 (C), typically in a strong and diffuse manner. An intact myoepithelial cell layer surrounding tumor islands was evidenced by p63 immunohistochemical expression (which was negative in other tumor cells) (D). Calponin, and CK 14 (D) decorated an intact peripheral myoepithelial cell layer.

In typical cases, IC is noninvasive low-grade carcinoma composed of bland neoplastic cells positive for S100, which is in sharp contrast to SDC. SDC is defined by the recent WHO classification as an aggressive epithelial malignancy resembling high-grade mammary ductal carcinoma; and it is composed of polymorphic cells with S100 negative and AR positive immunoprofile.²⁰ Therefore these 2 lesions are generally accepted as distinct and separate entities.^{19,21,22} Despite this, there are, in the literature, occasional well documented low-grade ICs with subsequent widespread invasion.^{10,23} Even more confusing are rare cases of true high-grade SDC reported as purely “in situ lesions.”²⁴

In recent years, many salivary gland low-grade carcinomas have been found to have pathognomonic translocations and characteristic chromosomal rearrangements. These include *ETV6-NTRK3* and *ETV6-RET* in MASC,^{1,8} *MYB-NFIB* and *MYBL1-NFIB* in adenoid cystic carcinoma,²⁵ *EWSR1-ATF1* in (hyalinizing) clear cell carcinoma,²⁶ *CRTC1/CRTC3-*

MAML2 in mucoepidermoid carcinoma,²⁷ and *PRKD1-3* rearrangements in cribriform adenocarcinoma of tongue and other minor salivary glands.²⁸ These alterations are tumor-specific and are present in majority of the cases of the given tumor entity. Therefore they may serve as diagnostic markers useful for improvement of salivary gland tumor classification and taxonomy. There have been very few genomic studies to investigate the relationship of carcinomas with prevailing intraductal growth pattern and their morphologies and mimics. In particular, recently Weinreb et al.¹⁰ reported a series of intraductal and invasive carcinomas of intercalated salivary duct origin. They categorized IC into intercalated duct and apocrine phenotype. IC with intercalated duct differentiation harbored a *NCOA4-RET* fusion in one index case and an inversion pattern of *RET* rearrangement by FISH in a subset of cases suggested this may represent a dominant fusion.¹⁰ Only one case in this study showed a classic break-apart pattern with *RET* FISH, suggesting an alternate fusion.¹⁰ In contrast, IC with apocrine phenotype were shown to be negative for *NCOA4-RET*.¹⁰

In the current study, which is the largest genomic study of IC to date, the *NCOA4-RET* was confirmed to be the dominant fusion in IC, and likely represented all the *RET* positive cases previously reported with an inversion pattern of rearrangement by FISH. A new finding in our study has been a discovery of a subset of IC patients with apocrine variant IC harboring a novel *TRIM27-RET*. The single case with a classic break-apart for *RET* reported by Weinreb et al,¹⁰ was retested in this study and confirmed to harbor *TRIM27-RET*. To our knowledge, *TRIM27-RET* has not been recognized in any other salivary gland tumor so far. A total of 8 of 17 cases (47%) were confirmed to harbor a *RET* fusion. Interestingly, recent studies using RNA sequencing have revealed that SDC may also be added to the growing list of gene fusion-positive salivary carcinomas, with *NCOA4-RET* fusions having been found in 2 SDCs.²⁹ Both *NCOA4-RET* translocated SDC were positive for AR, and the tumors progressed in spite of undergoing concurrent chemoradiation, combination chemotherapy, and dual androgen deprivation therapy. Both patients with *NCOA4-RET* translocation, however, benefited from *RET*-targeted therapy.²⁹

IC has a generally identical immunoprofile with MASC (S100 protein/mammaglobin positive and DOG1/p63 negative in tumor ductal cells with p63 protein immunostaining only in abluminal myoepithelial layer); interestingly MASC (particularly those with *ETV6-RET* gene fusions) seem to closely resemble *NCOA4-RET* translocated ICs by histomorphology as well. Therefore, it is possible that the *NCOA4-RET* gene fusion reported in one case of “MASC” actually represented a case of IC, possibly with invasion concealing its intraductal origin.¹¹

In conclusion, NGS analysis of 17 cases of IC detected a *NCOA4-RET* fusion transcript joining exon 7 or 8 of *NCOA4* gene and exon 12 of *RET* gene in 6 cases of intercalated duct type IC; and a novel *TRIM27-RET* fusion transcript between exons 3 and 12 in 2 cases of salivary gland tumors displaying histologic and immunohistochemical features typical of apocrine IC for a total of 47% of IC cases. All analyzed cases were negative for *ETV6-NTRK3* gene fusion by the FusionPlex kit, RT-PCR, and *ETV6* gene was found intact by FISH. A novel finding in our study has been a discovery of a subset of IC patients with apocrine variant IC harboring a novel *TRIM27-RET*. The *RET* negative cases seen in this study and by Weinreb and colleagues, account for half of all ICs. There is likely a non-*RET* fusion or other finding that is not detectable using our current NGS platform and requires further study.

REFERENCES

- Skálová A, Vanecek T, Sima R, et al. Mammary analogue secretory carcinoma of salivary glands, containing the *ETV6-NTRK3* fusion gene: a hitherto undescribed salivary gland tumor entity. *Am J Surg Pathol*. 2010;34:599–608.
- Bishop JA, Yonescu R, Batista D, et al. Most nonparotid “acinic cell carcinomas” represent mammary analog secretory carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2013;37:1053–1057.
- Chiosea SI, Griffith C, Assaad A, et al. Clinicopathological characterization of mammary analogue secretory carcinoma of salivary glands. *Histopathology*. 2012;61:387–394.
- Chiosea SI, Griffith C, Assaad A, et al. The profile of acinic cell carcinoma after recognition of mammary analog secretory carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2012;36:343–350.
- Skalova A, Bell D, Bishop JA, et al. Secretory carcinoma. In: El-Naggar A, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Sliotweg PJ, eds. *World Health Organization (WHO) Classification of Head and Neck Tumours*, 4th ed. Lyon, France: IARC Press; 2017:177–178.
- Ito Y, Ishibashi K, Masaki A, et al. Mammary analogue secretory carcinoma of salivary glands: a clinicopathologic and molecular study including 2 cases harboring *ETV6-X* fusion. *Am J Surg Pathol*. 2015;39:602–610.
- Skalova A, Vanecek T, Simpson RHW, et al. Mammary analogue secretory carcinoma of salivary glands: molecular analysis of 25 *ETV6* gene rearranged tumors with lack of detection of classical *ETV6-NTRK3* fusion transcript by standard RT-PCR: Report of 4 cases harboring *ETV6-X* gene fusion. *Am J Surg Pathol*. 2016;40:3–13.
- Skálová A, Vanecek T, Martinek P, et al. Molecular profiling of mammary analog secretory carcinoma revealed a subset of tumors harboring a novel *ETV6-RET* translocation: report of 10 cases. *Am J Surg Pathol*. 2018;42:234–246.
- Loening T, Leivo I, Simpson RHW, et al. Intraductal carcinoma. In: El-Naggar A, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Sliotweg PJ, eds. *World Health Organization (WHO) Classification of Head and Neck Tumours*, 4th ed. Lyon, France: IARC Press; 2017:170–171.
- Weinreb I, Bishop JA, Chiosea SI, et al. Recurrent *RET* gene rearrangements in intraductal carcinomas of salivary gland. *Am J Surg Pathol*. 2018;42:442–452.
- Dogan S, Benayed R, Chen H, et al. Genomic profiling of the two related “cousins” acinic cell carcinoma and mammary analog secretory carcinoma of salivary glands reveals novel *NCOA4-RET* fusion in mammary analog secretory carcinoma. Abstract USCAP 2017. *Mod Pathol*. 2017;Suppl 30:323A.
- Bishop JA, Yonescu R, Batista D, et al. Utility of mammaglobin immunohistochemistry as a proxy marker for the *ETV6-NTRK3* translocation in the diagnosis of salivary mammary analogue secretory carcinoma. *Hum Pathol*. 2013;44:1982–1988.
- Stevens TM, Kovalovsky AO, Velosa C, et al. Mammary analog secretory carcinoma, low grade salivary duct carcinoma, and mimickers: a comparative study. *Mod Pathol*. 2015;28:1084–1100.
- Shah AA, Wenig BM, LeGallo RD, et al. Morphology in conjunction with immunohistochemistry is sufficient for the diagnosis of mammary analogue secretory carcinoma. *Head and Neck Pathol*. 2015;9:85–95.
- Chen KT. Intraductal carcinoma of the minor salivary gland. *J Laryngol Otol*. 1983;97:189–191.
- Delgado R, Klimstra D, Albores-Saavedra J. Low grade salivary duct carcinoma. A distinctive variant with a low grade histology and a predominant intraductal growth pattern. *Cancer*. 1996;78:956–967.
- Brandwein-Gensler M, Hille J, Wang LJ, et al. Low-grade salivary duct carcinoma: description of 16 cases. *Am J Surg Pathol*. 2004;28:1040–1044.
- Brandwein-Gensler MS, Gnepp DR. WHO classification of tumours. Low-grade cribriform cystadenocarcinoma. In: Barnes L, Eveson JW, Reichert P, Sidransky D, eds. *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*. Lyon: IARC Press; 2005:233.
- Simpson RHW. Salivary duct carcinoma: new developments—morphological variants including pure in situ high grade lesions; proposed molecular classification. *Head Neck Pathol*. 2013;7:S48–S58.
- Nagao T, Licitra L, Loening T, et al. Salivary duct carcinoma. In: El-Naggar A, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Sliotweg PJ, eds. *World Health Organization (WHO) Classification of Head and Neck Tumours*, 4th ed. Lyon, France: IARC Press; 2017:173–174.
- Cheuk W, Miliauskas JR, Chan JKC. Intraductal carcinoma of the oral cavity. A case report and a reappraisal of the concept of pure ductal carcinoma in situ in salivary gland carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2004;28:266–270.
- Laco J, Podhola M, Doležalova H. Low-grade cribriform cystadenocarcinoma of the parotid gland: a neoplasm with favourable prognosis, distinct from salivary duct carcinoma. *Int J Surg Pathol*. 2010;18:369–373.
- Weinreb I, Tabanda-Lichauco R, Van der Kwast T, et al. Low-grade intraductal carcinoma of salivary gland: report of 3 cases

- with marked apocrine differentiation. *Am J Surg Pathol*. 2006;30:1014–1021.
24. Simpson RH, Desai S, Di Palma S. Salivary duct carcinoma in situ of the parotid gland. *Histopathology*. 2008;53:416–425.
25. Persson M, Andrén Y, Mark J, et al. Recurrent fusion of MYB and NFIB transcription factor genes in carcinomas of the breast and head and neck. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106:18740–18744.
26. Antonescu CR, Katabi N, Zhang L, et al. *EWSR1-ATF1* fusion is a novel and consistent finding in hyalinizing clear-cell carcinoma of salivary gland. *Genes Chromosomes Cancer*. 2011;50:559–570.
27. Tonon G, Modi S, Wu L, et al. t(11;19)(q21;p13) translocation in mucoepidermoid carcinoma creates a novel fusion product that disrupts a Notch signaling pathway. *Nat Genet*. 2003;33:208–213.
28. Weinreb I, Zhang L, Tirunagari LM, et al. Novel *PRKD* gene rearrangements and variant fusions in cribriform adenocarcinoma of salivary gland origin. *Genes Chromosomes Cancer*. 2014;53:845–856.
29. Wang K, Russell JS, McDermott JD, et al. Profiling of 149 salivary duct carcinomas, carcinoma ex pleomorphic adenomas, and adenocarcinomas, not otherwise specified reveals actionable genomic alterations. *Clin Cancer Res*. 2016;22:6061–6068.

V souboru případů salivárních karcinomů, které byly vyšetřovány dvoustupňovou screeningovou metodou, byly dále objeveny 2 sekreční karcinomy, které obsahovaly doposud nepopsané fúzní partnery. V prvním případě sekrečního karcinomu typické morfologie i imunoprofilu u 56leté ženy v příušní žláze nebyla nalezena ani fúze *ETV6-NTRK3*, ani *ETV6-RET*, avšak pomocí NGS byla nalezena doposud nepopsaná translokace *VIM-RET* (případ č. 25). Tento tumor vykazoval jen granulární cytoplasmatickou pozitivitu v IHC vyšetření koktejlem protilátek. V druhém případě se jednalo o metastazující HG sekreční karcinom submandibulární žlázy u 56letého muže, kde byla nalezena zvláštní koexprese tradiční translokace *ETV6-NTRK3* a *MYB-SMR3B* (případ č. 18). Těmito nálezy se opět rozšiřuje spektrum molekulárních aberací přítomných v SC slinných žláz a tím i pohled na diagnostiku této nádorové entity.

3.2. Imunocytochemická a molekulárně genetická korelace v cytologické diagnostice sekrečního karcinomu slinných žláz a její vliv na interpretaci nálezů v souvislosti s Milánskou klasifikací

3.2.1. Cíle

Cílem práce bylo korelovat cytomorfoloické charakteristiky sekrečního karcinomu slinných žláz s jeho histomorfoloí. Tyto nálezy byly dále porovnány s poznatky, které byly doposud na toto téma publikovány. Na souboru šesti případů jsme vyzdvihli důležitost pomocných imunocytochemických a molekulárně-genetických metod v interpretaci cytologických nálezů, které jsou v diagnostice sekrečního karcinomu slinných žláz esenciální. Vzhledem k tomu, že materiál získaný tenkojehlovou aspirační cytologií je často buněčně chudý pro další pomocná vyšetření, je nutné s materiálem maximálně šetřit. Hlavním cílem této studie bylo sestavit základní imunocytochemický panel, jehož výsledky podporují diagnózu sekrečního karcinomu a tyto nálezy uvést v souvislosti s nově zavedeným Milánským systémem reportování cytologií slinných žláz (32). Kategorizace nálezů je totiž do značné míry ovlivněna dostupností a výsledky pomocných vyšetřovacích metod.

3.2.2. Materiál a metodika

Ze salivárního registru nádorů slinných žláz Šiklova ústavu patologie a Bioptické laboratoře s.r.o. byly v kooperaci s Univerzitní nemocnicí v Tampere retrospektivně vyhledány všechny potvrzené případy sekrečních karcinomů slinných žláz, u kterých byla v předoperačním období provedena tenkojehlová aspirační cytologie (FNAC). Mezi léty 2011 a 2018 bylo tímto způsobem vyšetřeno 6 případů, u kterých byla posléze v definitivní biopsii prokázána diagnostická translokace genů *ETV6-NTRK3* pomocí fluorescenční in situ hybridizace (FISH). Pět případů pocházelo z archivu a externích konzultací Univerzitní nemocnice v Tampere a jeden případ z plzeňského salivárního registru Šiklova ústavu patologie. U všech šesti případů byly dohledány klinicko-patologická data (pohlaví, věk, lokalizace, klinická manifestace a velikost léze), stanoveny cytomorfoloické znaky podle Milánské klasifikace pro reportování cytopatologie slinných žláz a doplněna

imunocytochemická data a molekulárně-genetická vyšetření aspirovaného materiálu při FNA.

Všechny FNA odběry byly prováděny klinikem pod ultrazvukovou navigací s použitím aspirační jehly o průměru 22G. Aspirovaný materiál byl rutinně zpracován dvěma způsoby. Část byla zpracována v nátěrech na podložní skla, které byly sušené vzduchem, fixované alkoholem a obarveny dle Papanicolaoua podle standardizovaného protokolu. Druhá část aspirovaného materiálu byla odstředěna v cytocentrifuze a opět obarvena dle Papanicolaoua. Zbytek materiálu byl vysrážen přidáním plazmy a trombinu a vzniklá sraženina byla následně standardně fixována ve 4% formaldehydu (formol), zalita do parafinu a rutinně zpracovaná k histologickému vyšetření v tzv. cytobloku. Z cytobloku se pak na mikrotomu ukrojily řezy o síle 4 μm a byly obarveny základním barvením heomatoxylin-eosin (HE). Dále byly ukrojeny řezy, které byly obarveny speciálním Schiffovým činidlem (Periodic acid-Schiff, PAS) s a bez natrávení.

Pro **imunocytochemickou analýzu** byly ukrojeny řezy z cytobloku o síle 2 μm , nataženy na pozitivně nabitá skla (TOMO, Matsunami Glass IND, Japan). Tyto řezy byly v dalším kroku deparafinizovány xylenem, zavodněny sestupnou řadou roztoků ethanolu. Demaskování antigenních epitopů bylo provedeno ponořením do CC1 roztoku (EDTA pufr) o pH 8,6 a zahřátím na teplotu 95°C na dobu 64 minut. Endogenní aktivita peroxidázy byla zablokována ponořením řezů do 3% roztoku peroxidu vodíku v absolutním methanolu na dobu 5 minut. Následně byly přidány primární protilátky, jejichž vlastnosti jsou uvedeny v tabulce 16 a inkubovány v autosteineru Ventana BenchMark ULTRA (Ventana Medical System, Tucson, AZ, USA) při teplotě 37°C na dobu 40 minut (tabulka 16). Jako detekční systém byl použit streptavidin-biotin-peroxidáza komplex. Řezy byly nakonec dobarveny Mayerovým hematoxylinem. Pro každé vyšetření byly použity vhodné pozitivní vnější kontroly.

Protilátka	Klon	Ředění	Zdroj
S100 protein	Polyklonální	1:5000	Ventana Medical system, Tucson, AZ, USA
mammaglobin	31A5	RTU	Ventana Medical system, Tucson, AZ, USA
vimentin	V9	RTU	Ventana Medical system, Tucson, AZ, USA
Ki-67	30-9	RTU	Ventana Medical system, Tucson, AZ, USA

Tabulka 16 – Imunocytochemické markery použité pro cytologickou diagnózu SC. *RTU: ready to use.

Jako pozitivní výsledek byla interpretována nukleární pozitivita pro S100 protein a nukleárně-cytoplazmatická pozitivita pro mammaglobin, která byla jakékoli intenzity ve více než 5 % nádorových buněk. Proliferační aktivita (MIB-1 index) byla vyjádřena procentem pozitivních buněk v barvení Ki-67.

V dalším kroku byla provedena detekce translokace genů *ETV6-NTRK3* na zbytkovém materiálu cytobloku molekulárně-genetickými metodami. Použita byla **fluorescenční in situ hybridizace (FISH), polymerázová řetězová reakce spojená s reverzní transkripcí (RT-PCR) a masivní paralelní sekvenování (NGS).**

Pro účely **FISH** byly z parafinového bloku ukrojeny 4 µm silné řezy na pozitivně nabytá podložní skla. Řezy byly deparafinizovány ve dvou lázních xylenu po pěti minutách, dvou lázních 96% etanolu po dvou minutách a vloženy do destilované vody po dobu pěti minut. Řezy byly poté inkubovány v Target Retrieval Solution (pH 6) (DAKO, Glostrup, Denmark) při 95°C po dobu 40 minut, následně 20 minut chlazeny v témže roztoku a promyty destilovanou vodou na 5 minut. Poté byly řezy natráveny při 37°C po dobu 45–60 minut (dle stavu tkáně) v roztoku v 0,01M HCl s 0,5 mg/ml pepsinu (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) a poté promyty v destilované vodě po 5 minut. Odvodnění bylo provedeno vzestupnou řadou etanolů (70 %, 85 % a 96 %) po dvou minutách a dosušeny na vzduchu. Na takto připravený řez bylo přidáno dostatečné množství komerčně vyráběné sondy pro detekci zlomu genu *ETV6*- Vysis *ETV6* Break Apart FISH Probe Kit (Vysis/Abbott Molecular, Illinois) a sondy vlastního designu CustomDesign SureFISH *NTRK3* break apart (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA) pro detekci zlomu genu *NTRK3*. Řezy se sondami byly překryty krycími skly, uzavřeny rubber cementem a inkubovány v ThermoBrite instrument (StatSpin/Iris Sample Processing, Westwood, MA). Kodenaturace probíhala při 85°C na 8 minut a hybridizace při 37°C na 16 hodin. Po vyjmutí z ThermoBrite přístroje byly řezy, po odstranění rubber cementu a krycího sklíčka, promyty v posthybridizačním roztoku 2xSSC/0.3%NP-40 (VYSIS/Abbott) při 72°C po dobu dvou minut. Skla byla po oschnutí ve tmě obarvena DAPI II (VYSIS/Abbott), překryta krycím sklem a okamžitě odečítána.

Pro interpretaci výsledků byl použit fluorescenční mikroskop Olympus BX51 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) při 100x zvětšení s použitím filtrů Triple Band Pass (DAPI/SpectrumGreen/SpectrumOrange), Dual Band Pass (FITC/Texas Red) a SingleBand Pass (SpectrumGreen or SpectrumOrange). Bylo vybráno 100 nepřekrývajících se jader nádorových buněk a vyhodnocena přítomnost žlutých, zelených a oranžových

fluorescenčních signálů. Žluté signály byly hodnoceny jako negativní, zatímco oddělené zelené a oranžové signály byly vyhodnoceny jako pozitivní. Cut-off pro pozitivitu vzorku byl nastaven na 10 % (průměr + 3 směrodatné odchytky v normální nenádorové tkáni).

Pro detekci fúzního genu *ETV6-NTRK3* byla následně užitá metoda **RT-PCR**. RNA byla z parafinových řezů extrahována pomocí the RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion, Austin, TX). V dalším kroku byla mRNA převedena do cDNA užitím Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kitu (RNA input 500 ng) (Roche Diagnostics). Všechny metody byly provedeny podle standardizovaných protokolů. Detekce 110 párů bází dlouhého fragmentu fúzního transkriptu *ETV6-NTRK3* byla provedena podle Bourgeois et al. (194). Do reakční směsi bylo přidáno 2 μL cDNA, 12,5 μL HotStar Taq PCR Master Mix (Qiagen, Hilden, Germany), 10 pmol každého primeru (tabulka 17) a destilovaná voda doplněná do finálního objemu 25 μL. Amplifikace je zahájena v prvním kroku úvodní denaturací cDNA při teplotě 95°C po dobu 14 minut, dalších 45 cyklů pak probíhá denaturace již pouze po dobu 1 minuty. V druhém kroku cyklu dochází tzv. annealingem, tedy prudkým ochlazením na teplotu 65°C po dobu 1 minuty k nasednutí primerů. V poslední kroku cyklu pak dochází ke zvýšení teploty na 72 °C na 1 minutu, během které dochází k syntéze DNA. Proces je zakončen inkubací reakce při 72 °C na dobu 7 minut. Úspěšně amplifikovaný produkt fúzního transkriptu *ETV6-NTRK3* byl vyčištěn pomocí magnetických částic z Agencourt AMPure Kitu (Agencourt Bioscience Corporation, A Beckman Coulter Company, Beverly, MA), obousměrně sekvenován pomocí Big Dye Terminator Sequencing Kitu (PE/Applied Biosystems, Foster City, CA), znovu vyčištěn magnetickými částicemi Agencourt CleanSEQ Kitu (Agencourt Bioscience Corporation) a analyzován na automatickém sekvenátoru ABI Prism 3130xl (Applied Biosystems) při konstantním napětí 13,2 kV po dobu 11 minut.

Primer	Sekvence primeru	Lokalizace
TEL971 (ETV6A)	ACCACATCATGGTCTCTGTCTCCC	ETV6 exon 5
TRKC1059 (NTRK3A)	CAGTTCTCGCTTCAGCACGATG	NTRK3 exon 15

Tabulka 17 – použité primery při detekci fúzního transkriptu *ETV6-NTRK3*.

Posledním molekulárně genetickým vyšetřením, které bylo použito pro detekci translokace *ETV6-NTRK3* v cytobloku, byla metoda **NGS**. Viz. Výsledky 3.1.

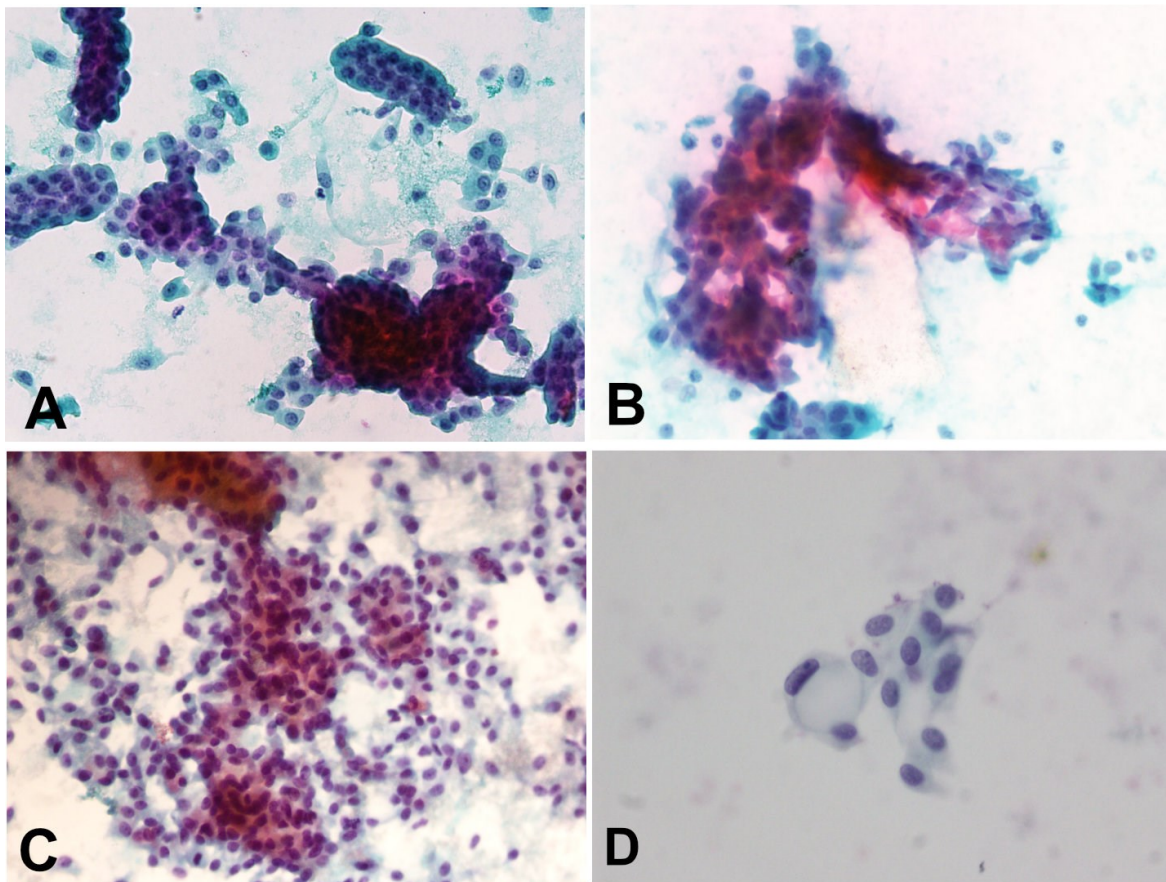
3.2.3. Výsledky

Náš retrospektivně vyšetřovaný soubor obsahoval 4 muže a 2 ženy ve věku 20 až 76 let (průměr 44,3 let). Klinicky se všech 6 případů prezentovalo jako hmatná, dobře ohraničená rezistence, přičemž nejmenší popisovaná masa dosahovala na USG průměru 1 cm a největší 4 cm. 5 případů (83,3 %) bylo lokalizováno do oblasti parotidy a pouze v jednom případě se jednalo o postižení submandibulární žlázy. Všechny případy byly vyšetřeny předoperačně FNA a následně byla provedena chirurgická resekce tumoru, který byl histomorfologicky, imunohistochemicky a molekulárně geneticky vyšetřen s konečnou diagnózou sekreční karcinom slinných žláz.

K vyhledaným 6 případům bylo k dispozici 7 vyšetření FNA, neboť pro jeden případ (No. 4) bylo vyšetření provedeno dvakrát s rozdílným závěrem. U čtyř případů (No. 1, 3, 4 a 5) z šesti byl závěr FNA reportován v té doby užívanou Papanicolaouovou klasifikací a ve všech případech byl nález vyhodnocen jako PAP class III – atypie suspektní z malignity. V diferenciální diagnostice pak bylo uvedeno široké spektrum lézí spadající především do benigních neoplázií: pleomorfní adenom, myoepiteliom, či bazocelulární adenom. Pouze v jednom případě (No. 5) bylo vysloveno podezření na acinický nebo sekreční karcinom. Pro případ číslo 4, kde byla FNA provedena dvakrát, spadal závěr pro první vyšetření do kategorie PAP class II odpovídající benignímu adenomu či onkocytomu. Zbýlé dva případy (No. 2 a 6), které byly reportovány bez užití jakékoli klasifikace, pouze deskriptivně, zahrnovaly v diferenciální diagnostice pleomorfní adenom, myoepiteliom, či monomorfní adenom.

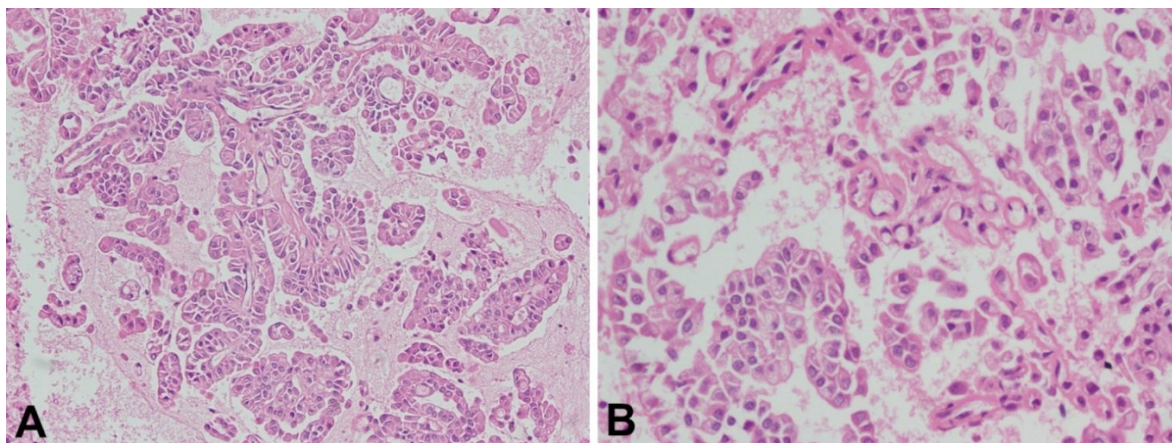
Histomorfologie sekrečního karcinomu je poměrně variabilní, v cytomorfoloickém vyšetření tomu tak úplně není. Z cytologických znaků, které byly všem případům společné, patří uspokojivá celularita stěrů, aspirované buňky byly organizovány do kohezivních klastrů utvářejících papilární struktury (obrázek 35A) s přebíhajícími cévami (obrázek 35B) a ve dvou případech (No. 1 a 2) až kribiformní formace. V jejich okolí byly vždy přítomny i izolované buňky. Jádra ve všech stěrech byla uniformní, pouze s velmi mírnými atypii a bez mitóz. Jaderný chromatin je jen jemně granulovaný a je dobře patrné jádérko. Vzhled cytoplasmy byl poněkud variabilní. V pěti případech byla cytoplasmata hojná s jemným granulováním, pouze v jednom případě (No. 2) byla cytoplasmata nepatrná a buňky zde nabývaly až vzhledu myoepitelií (obrázek 35C). Ve čtyřech případech (No. 1, 4, 5 a 6) byla cytoplasmata

vakuolizovaná, v případech 1 a 4 dokonce až vzhledu buněk tvaru pečetního prstenu (obrázek 35D).



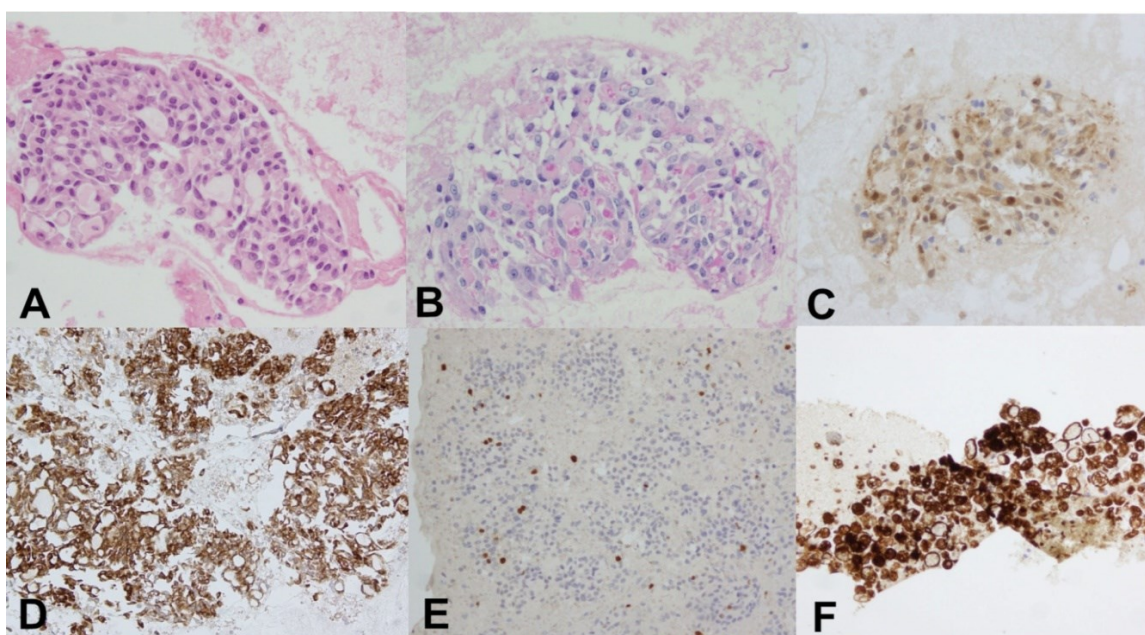
Obrázek 35 – Nátěry na sklech barvené dle Papanicolaoua; A: papilární struktury; B: přebíhající cévy, tzv. transgressing vessels; C: myoepiteliální diferenciace buněk; D: vakuolizace cytoplasmy vzhledu až buněk pečetního prstenu.

V pěti případech byl vedle nátěrů na sklo dostupný též cytoblok (No. 1-5). V porovnání s nátěry bylo na cytobloku možné v mnohem větší míře ohodnotit architekturu tkáňových fragmentů. K vidění byly papilární, kribriformní až pseudoglandulární formace (obrázek 36A), v některých případech však byla vidět i solidní hnízda nádorových buněk. Tato architektonická variabilita byla přítomna dokonce i v rámci jednoho vzorku. Nukleární rysy se prakticky nelišily od těch popsaných v nátěrech. Cytoplasmatické znaky však byly mnohem lépe hodnotitelné, a to především hojná vakuolizace místy až vzhledu buněk pečetního prstenu (obrázek 36B) a v jednom případě (No. 2) dokonce až vzhledu koloidu.



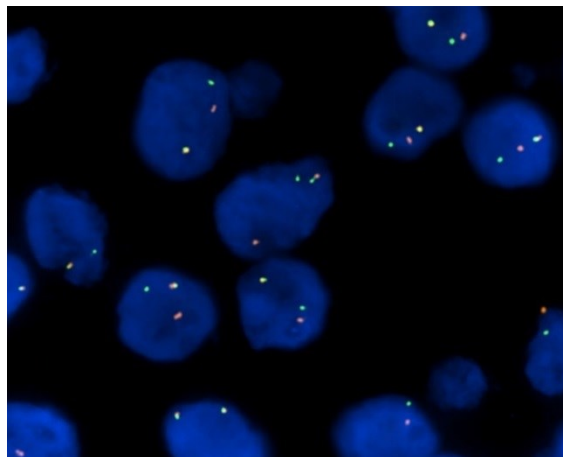
Obrázek 36 – Nálezy v cytobloku barvené hematoxylinem-eosinem; A: Pseudoglandulární struktury v cytobloku ; B: Buňky vzhledu pečetního prstenu.

U těchto pěti případů, kde byl k dispozici cytoblok (No. 1–5), byla provedena imunocytochemická studie použitím speciálního barvení PAS a 4 základních protilátek: S100 protein, mammaglobin, vimentin a Ki-67. Sekretorický materiál uvnitř mikrocystických struktur byl PAS pozitivní, ve všech případech byla prokázána difúzní silná pozitivita pro mammaglobin a vimentin, fokální pozitivita S100 proteinu a proliferační aktivita byla nízká, méně než 5 % (obrázek 37).



Obrázek 37 – A: Hematoxylin-eosin; B: Periodic Acid Schiff (PAS); C: S100 protein; D: mammaglobin A; E: Ki-67; F: vimentin.

V dalším kroku byla provedena molekulární analýza zbylého materiálu v cytobloku. Ten byl však dostupný už pouze ve čtyřech případech ze šesti, a to pro případy 1–4, v případech 5 a 6 byl již cytoblok vykrájen. Dále se z genetické analýzy musel vyřadit případ číslo 2, jehož kvalita DNA byla nízká, a proto nevhodná k analýze. Ve zbylých testovaných třech případech (No. 1, 2 a 4) byl prokázán zlom v genu *ETV6* a *NTRK3* metodou FISH (obrázek 38). Fúzní transkript byl následně prokázán buď RT-PCR nebo NGS.



Obrázek 38 – Cytogenetická analýza metodou FISH znázorňující vyšetření genu *ETV6* komerčně vyráběnou break-apart sondou (Vysis/Abbott Molecular). Jádra mající separovaný oranžový a zelený signál obsahují zlom v genu *ETV6*.

3.2.4. Diskuze

Sekreční karcinom slinných žláz je ve většině případů popisován jako nízce maligní karcinom, který se však svou poměrně blandní cytomorfológií může snadno zaměnit za benigní nádor. Tento pitfall v hodnocení FNA může vést k nevhodně zvolenému operačnímu řešení. Proto je nutná co nejpřesnější kategorizace nálezů podle Milánského klasifikačního systému, která poskytuje klinikům i doporučený terapeutický postup.

Správná diagnóza sekrečního karcinomu je však důležitá mimo jiné i proto, že pacienti s agresivně se chovajícími nádory, pokročilým nálezem či inoperabilními tumory mají od podzimu 2018 možnost být léčeni biologickou léčbou inhibitory tyrosin-kinázové aktivity, které jsou vhodné pro karcinomy obsahující translokace genů *NTRK3* a *RET* (180, 181).

Cytomorfologie SC je bohužel nespecifická a pro přesnou diagnózu je nezbytné provést doplňková pomocná vyšetření, jinak je prakticky nemožné vytvořit správnou diagnózu, vzhledem k poměrně rozsáhlé diferenciální diagnostice SC. Doposud byly publikovány pouze malé série a případové studie týkající se cytologie SC (195-208) a všechny retrospektivně popisovaly SC jen s velmi limitovanými imunocytochemickými výsledky a až na jednu studii (206) byly všechny diagnostické translokace potvrzeny až z finální histologie. Pouze Pisharodi et al. (195) ve své publikaci předkládá dostatečně široký imunocytochemický panel, avšak genetické vyšetření na přítomnost translokace genů *ETV6-NTRK3* bylo provedeno až z finální histologie. Griffith et al. jako jediný provedl molekulárně-genetické testování z cytobloku u dvou případů ze šesti (206). Imunocytochemický panel v této studii byl však nedostačující pro diagnózu SC. Naše studie přichází jako první se suficientním imunocytochemickým panelem protilátek a genetickým vyšetřením prováděným na cytobloku pro tři případy ze šesti vyšetřovaných.

Vzhledem k obtížnosti cytologické diagnostiky SC byl podle výsledků této studie navržen panel základního barvení vhodný k potvrzení, či vyvrácení diagnózy SC. Jedná se o speciální barvení PAS a protilátky S100 protein, mamaglobin, vimentin a proliferací index Ki-67. Izolované positivity těchto markerů jsou přítomny i v řadě jiných salivárních nádorů, proto je nutné, aby nádorové buňky vykazovaly pozitivitu ve více markerech. Vimentin je vysoce senzitivní, avšak nespecifickou protilátkou, která je indikátorem myoepiteliální diferenciace. Silná difúzní pozitivita může odlišit myoepiteliální a acinární diferenciaci směrem k acinickému karcinomu, se kterým je SC nejčastěji zaměňován. I když je pro průkaz acinární diferenciace mnohem více specifický marker DOG1 (137), není vždy dostupný na menších patologických odděleních. Velmi dobrá dostupnost vimentinu na většině patologických oddělení je nespornou výhodou této protilátky oproti DOG1, který je v SC vždy negativní.

Po provedení imunocytochemického vyšetření z cytobloku by mělo dále následovat molekulárně-genetické testování metodou FISH, RT-PCR nebo v ideálním případě NGS. Při nálezů specifické translokace *ETV6-NTRK3*, či méně častých *ETV6-RET* či *ETV6-MET* je diagnóza SC potvrzena.

Kategorizace cytologických nálezů dle Milánské klasifikace je do značné míry ovlivněno možnostmi pomocných vyšetření. Pokud jsou dostupné pouze nátěry na sklech, nález by měl být klasifikován jako kategorie *IVB: Salivární nádory s nejistým maligním*

potenciálem (Salivary gland neoplasm of Uncertain Malignant Potential - SUMP). Pokud jsou dostupné kvalitní cytobloky pro provedení navrhovaného imunocytochemického panelu protilátek a genetického vyšetření, které potvrdí přítomnost minimálně zlomu v genu *ETV6*, v tom případě by FNA měla být reportována jako kategorie *VI: Maligní nádory*. V případě, že genetické vyšetření není dostupné a je potvrzená pozitivita PAS a protilátek MGA, S100 a vimentinu, eventuálně negativita DOG1, včetně nízké proliferační aktivity, nález lze interpretovat jako kategorii *V: Suspektní z malignity*.

Na souboru šesti pacientů jsme potvrdily výsledky předchozích cytomorfolických studií týkající se FNA diagnostiky sekrečního karcinomu. Uvedené cytomorfolické znaky jsou však značně nespecifické a pro přesnou diagnózu jsou nezbytná doplňková vyšetření, která však nejsou vždy úspěšná vzhledem k limitovanému množství materiálu. Za účelem šetřit cytologický materiál jsme vytvořili základní panel protilátek, jejichž výsledek podpoří diagnózu sekrečního karcinomu. Ta je však vždy definitivní až po provedení genetického testování, které potvrdí přítomnost hledané translokace. Na tomto souboru jsme jako první prezentovali cytologickou diagnostiku sekrečního karcinomu slinných žláz v kontextu s Milánským systémem reportování cytologií slinných žláz a zároveň se jednalo o největší soubor případů se suficientním imunocytochemickým i genetickým vyšetřením prováděným na cytobloku.

3.3. Další publikované práce přímo se týkající tématu

3.3.1. Nový systém pro sjednocené hodnocení tenkojehlových aspiračních cytologií slinných žláz: Co nového přinesl tzv. „Milánský systém reportování“ do cytodiagnostiky lézí slinných žláz?

Tenkojehlová aspirační cytologie/biopsie (FNA/FNAC/FNAB) je předoperační diagnostická metoda, která v dnešní době je již nedílnou součástí rutinního diagnostického postupu. Jedná se o vysoce specializované odvětví cytopatologie vyžadující zkušenosti s diagnostikou nádorů slinných žláz, které jsou charakteristické svou heterogenní histomorfologií a komplexním imunoprofilem. Ještě donedávna v reportování FNA vládli chaos a nebyla ustanovena žádná konkrétní jednotná podoba reportu. Po vzoru již zavedených klasifikací Bethesda či Paris systému byla v roce 2015 započata tvorba klasifikačních kritérií pro reportování cytologií salivárních lézí. Počátkem roku 2018 vychází nový Milánský systém pro reportování cytologií salivárních lézí, který vedle pevně daných kritérií pro kategorizaci nálezů vydává i klinická doporučení dalšího postupu a riziko malignizace pro každou ze šesti diagnostických kategorií. Milánský systém má za úkol sjednotit reportování nálezů salivárních lézí, kterému dostatečně porozumí jak kliničtí pracovníci, tak patologové z jiných patologických oddělení nejenom v rámci republiky, ale i celého světa.

Nový systém pro sjednocené hodnocení tenkojehlových aspiračních cytologií slinných žláz: Co nového přinesl „tzv. Milánský systém reportování“ do cytodiagnostiky lézí slinných žláz?

Markéta Miesbauerová^{1,2}, Ivana Kholová³, Alena Skálová^{1,2}

¹ Šiklův ústav patologie, Univerzita Karlova, Lékařská fakulta v Plzni, Plzeň, Česká republika

² Bioptická laboratoř, s.r.o., Plzeň, Česká republika

³ Department of Pathology, Fimlab Laboratories, Tampere University Hospital and Faculty of Medicine and Life Sciences, Tampere University, Tampere, Finland

SOUHRN

Nově publikovaná klasifikace tenkojehlových aspiračních cytologií slinných žláz, tzv. Milánský systém reportování, je příspěvkem k mezinárodní standardizaci cytodiagnostických postupů. Minireview podává překlad základních cytodiagnostických kategorií do české terminologie, přináší stručnou definici a přehled obsahu diagnostických kategorií navržených Milánským systémem reportování salivárních cytologických nálezů s rizikem malignity v jednotlivých kategoriích, a doporučuje přijetí Milánské klasifikace jako národního standardu.

Klíčová slova: tenkojehlová aspirační cytologie – FNA – nádory slinných žláz – cytoblok – Milánský systém reportování cytologie

Minireview: The new system of unified evaluation of fine needle aspiration cytology of salivary glands: What is new in the Milan system for reporting of salivary glands lesions?

SUMMARY

The recently published Milan system for reporting salivary gland cytopathology represents an important contribution to the international standardisation of cytodiagnostic reports. The minireview provides translation of the diagnostic categories into Czech terminology and it discusses briefly the definition and explanatory notes of given diagnostic categories in correlation with risk of malignancy. The adopting of the Milan system as a national standard is recommended.

Keywords: fine-needle aspiration cytology – FNA – salivary gland tumors – cell block – Milan System for reporting salivary cytopathology

Cesk Patol 2019; 55(1): 61–65

Nádory slinných žláz patří mezi nejvíce heterogenní a variabilní nádorovou skupinu a zvláště cytologická diagnostika lézí slinných žláz je pro pathology velkou výzvou. Zatímco většinu salivárních nádorů lze v excizi a resekátu dobře určit, interpretace jehlové biopsie (core cut biopsy) a tenkojehlové aspirační cytologie (FNA) vyžaduje velkou opatrnost, erudici a uvědomění si limitů diagnostické metody. Nádory slinných žláz se vyskytují velmi vzácně s incidencí 5–10 nových případů/100 tis. obyvatel, představují asi 6 % nádorů z oblasti hlavy a krku a kolem 0,3 % všech malignit. Jsou častější u starších lidí a nejvíce je postižená příušní žláza. Přibližně 75 % nádorů slinných žláz je benigních; riziko malignity koreluje obráceně s velikostí žlázy. Zatímco až 80 % nádorů malých slinných žláz dutiny ústní je maligních, v submandibulární žláze jde o polovinu případů a v příušní žláze jen asi kolem 20 % nádorů odpovídá malignitě.

Obecně se postižení slinných žláz nejčastěji projevuje jejich zduřením, které je buď lokalizované nebo difúzně zaujímá celou žlázu. Ve většině případů tumorů slinných žláz je léze dobře přístupná nejen palpačnímu a sonografickému vyšetření, ale i vyšetření cytologickému.

Jaká je role cytologie v diagnostickém algoritmu pacientů s lézemi slinných žláz? FNA je všeobecně vnímána jako efektivní primárně diagnostický test vhodný pro předběžné určení terapie lézí slinných žláz. Nejrozšířenější diagnostickou metodou vyšetření lézí slinných žláz je tenkojehlová aspirační biopsie (FNA – fine needle aspiration). Při správně provedeném odběru materiálu, buď za sonografické nebo palpační kontroly, je FNA zdrojem určujícím nejenom předběžnou diagnózu, ale i další terapeutický postup společně s určením míry radikality zákroku, pokud je indikován. V tomto ohledu je při evaluaci cytologického nátěru velice důležitá i mezioborová spolupráce s radiologem, jehož popis může být též vodítkem při vyhodnocování vyšetření. Zkušený cytodiagnostik dokáže ve většině případů určit diagnózu běžných benigních nádorů, jako je Warthinův tumor nebo pleomorfní adenom a odlišit nenádorové léze, které nevyžadují chirurgickou léčbu (1). V mnoha případech lze s přijatelnou mírou specifity odlišit low-grade a high-grade karcinomy. Zatímco nádory slinných žláz je většinou potřeba chirurgicky odstranit, většinu nenádorových lézí bude klinik pravděpodobně řešit konzervativně. FNA také může efektivně

✉ Adresa pro korespondenci:

MUDr. Markéta Miesbauerová
Šiklův ústav patologie LF UK v Plzni
Fakultní nemocnice Bory
Ed. Beneše 13, 305 99 Plzeň, Česká republika
tel.: +420 723 102 662
fax: +420 377 402 634
e-mail: Marketa.Miesbauerova@outlook.com

příspěvek k volbě vhodné operační techniky, včetně rozhodnutí o míře radikality.

Celkové hodnoty senzitivity a specifity FNA cytologie jsou podle údajů v literatuře vysoké a pohybují se v rozmezí 86-100 %, ale míra přesnosti diferenciací mezi jednotlivými nádorovými jednotkami je velmi rozdílná a kolísá v rozmezí 48-94 % v závislosti na typu nádoru, kvalitě cytologického odběru, zkušenosti cytopatologa a mnoha dalších okolnostech (2). Takový rozptyl je dán především tím, že patolog sice nemá větších problémů při určování benigní/nízce maligní tumor versus vysoce maligní nádor, ale komplikace nastávají při určování konkrétního typu nádoru. Nejčastější diagnózou, kterou cytopatolog provádí je pleomorfní adenom a Warthinův tumor, s jejichž diagnostikou není většinou problém, tudíž specifita je v těchto případech vysoká. Na druhou stranu však specifita výrazně klesá při určování konkrétního typu nádoru mimo Warthinův tumor a pleomorfní adenom. To je dáno právě morfologickým přesahem a diverzitou mezi jednotlivými typy salivárních nádorů.

Milánský systém reportování cytologií slinných žláz byl vytvořen za účelem sjednocení terminologie a zlepšení stratifikace rizika malignity v jednotlivých diagnostických kategoriích (tab. 1) (3). Jde o praktický a diagnosticky zaměřený atlas, který nemění dosavadní diagnostická kritéria, ale navrhuje standardizovaný postup reportování nálezů takovým způsobem, aby byly srozumitelné v klinické praxi a využitelné pro plánování léčby pacientů. Systém zlepšuje komunikaci mezi patologií a klinikou a umožní srovnání diagnostiky mezi různými pracovišti (4).

Diagnostické kategorie navržené Milánským systémem reportování cytologických nálezů

I. Kategorie nediagnostická

Tato kategorie by neměla být použita ve více než 10 % vyšetřovaných vzorků. Hlavním, ale ne jediným kritériem adekvátnosti vzorku, je jeho buněčnost. Milánský systém doporučuje použít jako minimum celkem 6 skupin buněk sestávajících minimálně z 10 buněk v každé skupině. Nález izolovaných atypických nebo jasně maligních buněk cytologii posunuje z kategorie „nediagnostické“ do kategorie „suspektní z malignity“ nebo „maligní“.

II. Kategorie nenádorová

Kategorie „nenádorová“ se používá pro vzorky, které vykazují změny asociované s akutním nebo chronickým zánětem slinné žlázy, regresivními změnami nebo sialolithiázou. Cytologické vzorky jsou dostatečně buněčné, ale neobsahují žádné nádorové buňky. Buňky nevykazují atypickou morfologii a terapeutický postup se odvíjí od klinických symptomů pacienta. Doporučuje se používat tuto kategorii v korelaci s klinickým a radiologickým nálezem.

III. Atypie nejistého významu (AUS)

Cílem salivární FNA cytopatologie je odlišit nádorové a nenádorové aspiráty, protože to má bezprostřední dopad na klinické rozhodování. Pokud cytologický vzorek neumožňuje toto rozlišení, je kategorizován jako „atypie nejistého významu (AUS)“. Tato kategorie redukuje počet falešně negativních diagnóz v kategorii „nenádorová“ a počet falešně pozitivních v kategorii „nádorová“. Většinou tato kategorie obsahuje léze s reaktivními atypii nebo suboptimálně odebrané vzorky z nádorů.

VI A. Nádory: Benigní

Kategorie „nádory benigní“ se používá jen, pokud cytologický vzorek vykazuje cytomorfologické znaky specifické pro některý benigní nádor slinných žláz, zpravidla obsahuje diagnostické

znaky pleomorfního adenomu nebo Warthinova tumoru. Méně často je na základě FNA diagnostikován jiný benigní nádor.

IV B. Nádory: Salivární nádory s nejistým maligním potenciálem (Salivary gland neoplasm of Uncertain Malignant Potential - SUMP)

Diagnoza SUMP je rezervována pro FNA vzorky, které obsahují cytomorfologické jednoznačné známky nádoru, ale neumožňují s jistotou stanovit diagnózu nebo s určitostí rozlišit mezi benigním a maligním nádorem. Většina případů je následně v histologickém vyšetření klasifikována jako low-grade malignita.

V. Podezření z malignity (suspicious for malignancy - SM)

Kategorie SM umožňuje stratifikovat riziko malignity a informovat klinika, že příslušný FNA vzorek splňuje některá, ale ne všechna kritéria malignity. Velké procento případů s diagnózou SM představují suboptimální a málo buněčné vzorky, které obsahují atypické buňky, ale také artefakty nebo zánětlivou či krevní příměs znemožňující jasnou diagnózu.

VI. Maligní

Salivární aspiráty kategorizované jako „maligní“ obsahují cytomorfologické znaky diagnostické pro maligní nádor, buď samostatně nebo v kombinaci s molekulárními nebo imunohistochemickými testy. Pokud je to možné, v těchto vzorcích Milánský systém doporučuje určit grade a specifickou diagnózu karcinomu (např. „low-grade mukoepidermoidní karcinom“).

Speciální metody v cytopatologii slinných žláz: imunohistochemické a molekulární testy.

Dostupnost imunohistochemických a molekulárních metod v diferenciální diagnostice salivárních nádorů výrazně zefektivňuje Milánský systém, ale musí být k dispozici adekvátní materiál, zpracovatelný v cytobloku. Metody molekulární diagnostiky mají v patologii slinných žláz jak diferenciálně diagnostický význam, tak slouží ke klasifikaci některých karcinomů, protože mnohé translokace jsou specifické pro určitou nádorovou jednotku a příslušné zlomy genů lze detekovat metodou fluorescenční in situ hybridizace (FISH) (tab. 2) (5). Nejčastěji používané imunohistochemické markery, které lze s výhodou využít v cytopatologické diagnostice jsou uvedeny v tab. 3 (6).

Doporučený formát zprávy o cytopatologickém vyšetření slinné žlázy.

Doporučuje se, aby zpráva začínala obecnou diagnostickou kategorií (I.-VI.) - viz tabulka č. 1, vždy včetně slovního vyjádření a posouzení adekvátnosti odběru. Např. cytologie diagnostická pro pleomorfní adenom by měla mít následující formát:

Dostatečný vzorek pro hodnocení

Interpretace: diagnostická kategorie IV. A - benigní nádor

Diagnóza: pleomorfní adenom

U některých kategorií může být uvedena další specifikace, ale není to údaj povinný a často není ani možný. Míra přesnosti cytologické diagnózy závisí na více okolnostech, především na povaze odebraného vzorku, diagnostických kritériích, která nejsou patrná v cytologii, ale také na zkušenosti hodnotícího cytopatologa. Přiřazením cytologického vzorku do diagnostické kategorie současně klinikovi sdělujeme předpokládané riziko malignity (tab. 1).

ZÁVĚRY

Rozmanitost struktury a cytomorfologie nádorů slinných žláz, překrývání a sdílení struktur mezi jednotlivými nádorovými jednotkami, společně s nízkou incidencí, představují hlavní

Tabulka 1. Doporučené diagnostické kategorie Milánského systému reportování cytopatologických nálezů u lézí a nádorů slinných žláz.

Diagnostická kategorie	Definice a příklady	Riziko malignity (%)	Klinický význam
I. Nediagnostický nebo nedostatečný vzorek	Nedostatečná buněčnost odběru	25	Nutná klinicko-patologická a radiologická korelace nebo opakovat FNA
II. Nenádorová	Benigní léze bez nálezu jasných nádorových buněk, zahrnuje zánětlivé, metaplastické nebo reaktivní změny a nenádorové lymfoidní infiltráty*	10	Sledování a radiologická korelace
III. Atypie nejistého významu (AUS)	≤10% všech FNA vzorků, přítomny izolované atypické buňky, ale nález nesvědčí pro nádor	20	opakovat FNA nebo operovat
IV. Nádory			
A. Nádory: Benigní	Zahrnuje benigní nádory podle jasných cytologických kritérií, nejčastěji Warthinův tumor a pleomorfní adenom	≤5	Sledovat nebo operovat
B. Nádory: Salivární nádory s nejistým maligním potenciálem (SUMP)	Vzorky, které jsou diagnostické pro nádorovou lézi, ale diagnóza přesné nádorové jednotky je nemožná. Zpravidla zahrnuje celulární benigní nádory, nádory s atypickými rysy a low-grade karcinomy	35	Vždy operovat
V. Podezření z malignity (SM)	Tato kategorie vykazuje cytologické znaky velmi suspektní z malignity, ale přesné určení nádorové jednotky je nemožné	60	Vždy operovat
VI. Maligní	Jde o vzorky jednoznačně obsahující maligní buňky. Měl by být učiněn pokus subklasifikovat a určit specifickou diagnózu, případně odlišit metastázu. Kategorie zahrnuje také lymfomy a sarkomy.	90	Vždy operovat

*Doporučena průtoková cytometrie k vyloučení nebo potvrzení klonality

Tabulka 2. Molekulární markery v cytopatologické diferenciální diagnostice.

Nádorová jednotka	Translokace	Fúzní gen
Sekreční karcinom (mamárního typu) MASC	t(12;15)(p13;q25)	ETV6-NTRK3 ETV6-RET
Mukoepidermoidní karcinom	t(11;19)(q21;p13) t(11;15)(q21;q26)	CRTC1-MAML2 CRTC3-MAML2
Světlobuněčný karcinom	t(12;22)(q21;q12)	EWSR1-ATF1 EWSR1-CREM
Adenoidně cystický karcinom	t(6;9)(q22-23;p23-24) t(8;9)	MYB-NFIB MYBL1-NFIB
Polymorfní adenokarcinom (dříve PLGA)	14q12	Hotspot activating PRKD1 somatická bodová mutace (E710D)
Kribriformní adenokarcinom malých slinných žláz	t(1;14)(p36.11;q12) t(X;14)(p1.4;q12)	ARID1A-PRKD1 DDX3X-PRKD1 PRKD2 and PRKD3 zlomy
Salivární duktální karcinom	17q21.1 3q26.32 inv(10)(q11.21;q11.22)	HER2 amplifikace PIK3CA mutace NCOA4-RET
Pleomorfní adenom (PA) a karcinom ex PA	t(3;8)	PLAG1 HMGA2
Basocelulární adenom		CTNNB1

Tabulka 3. Vybrané imunohistochemické markery v cytopatologické diferenciální diagnostice.

Nádorová jednotka	pozitivní	negativní
Sekreční karcinom (mamárního typu) MASC	S100, CK7, MGA, SOX10	DOG1, p63
Mukoepidermoidní karcinom	P63, p40	S100, SOX10, DOG1
Acinický karcinom	DOG1, SOX10	S100, p63
Adenoidně cystický karcinom	MYB, S100, SOX10	MGA, AR, GATA3
Salivární duktální karcinom	GATA3, CK7, AR	S100, SOX10
Pleomorfní adenom (PA) a karcinom ex PA	PLAG1	
Myoepiteliální karcinom	S100, p63, CK14, SOX10	MGA, DOG1

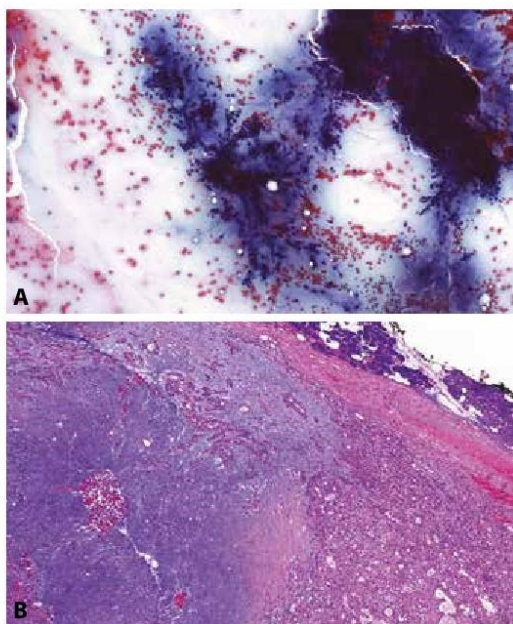
MGA- mammaglobin; AR- androgenní receptor

důvody diagnostických rozpaků při hodnocení FNA salivárních cytologií. Milánský systém doporučuje efektivní kategorizaci nálezů pro klinické použití. Vždy společně s klinickým vyšetřením a radiologickými nálezy má FNA cytologie nezastupitelnou roli v předoperační diagnostice lézí slinných žláz. Po Bethesda systémech pro cytologii děložního čípku a štítné žlázy (7), Papanicolaou Society systému pro cytologie slinivky a žlučových cest, Pařížském systému reportování močové cytologie je zda tak další (a ne poslední) systém, který přináší orgánově/systé-

mově specifickou terminologii pro cytologickou diagnostiku. Na internetové stránce <https://milansystem.org/> bude k dispozici přednáška o systému rovněž v českém jazyce.

PROHLÁŠENÍ

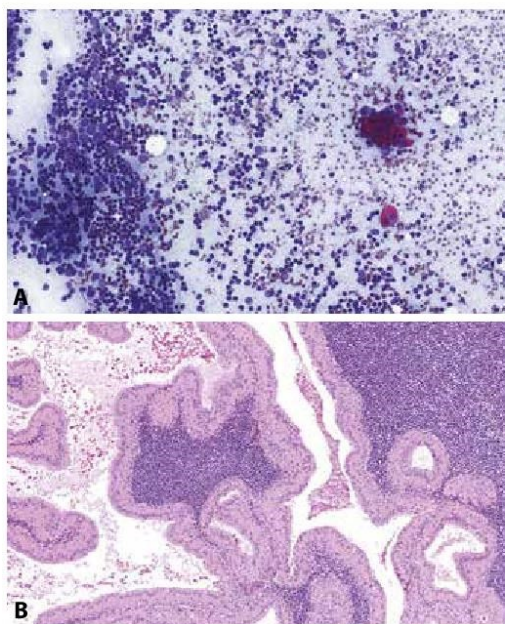
Autor práce prohlašuje, že v souvislosti s tématem, vznikem a publikací tohoto článku není ve střetu zájmů a vznik ani publikace článku nebyly podpořeny žádnou farmaceutickou firmou. Toto prohlášení se týká i všech spoluautorů.



Obr. 1. Pleomorfní adenom příušní žlázy (PA).

A) Vřetenité až plazmocytoidní myoepiteliální buňky „vystřelující“ z centra do periferie. Shluky buněk jsou obklopeny hojnou vláknitou chondromyxoidní matrix. Hodnocení dle Milánského systému: kategorie IVA, benigní nádor, pravděpodobně pleomorfní adenom. Cytologický nátěr, barveno dle Papanicolaou (zvětšení 300x).

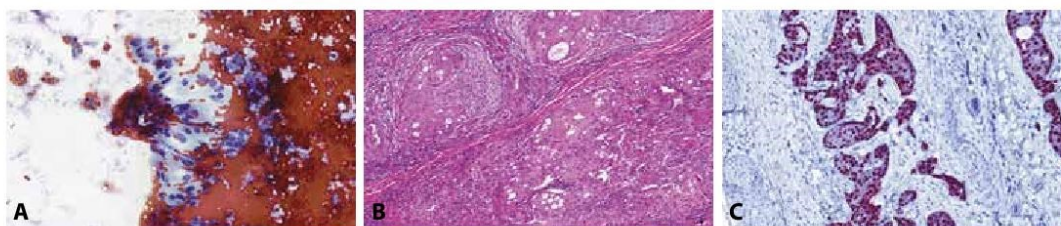
B) V levé části obrázku je predominantní chondromyxoidní matrix, zatímco v pravé části převládá epiteliální epitelio-myoepiteliální komponenta utvářející tubulární struktury. V pravém horním rohu je pak patrné dobře utvářené vazivové pouzdro s naléhajícími lalůčky příušní žlázy. Barveno hematoxylinem eosinem (zvětšení 140x).



Obr. 2. Warthinův tumor příušní žlázy (WT).

A) Na lymfocyty hojně infiltrovaném pozadí se nacházejí buňky s výraznými onkocytárními rysy, které se nacházejí samostatně i ve shlucích. Hodnocení dle Milánského systému: kategorie IVA, benigní nádor, pravděpodobně Warthinův tumor. Cytologický nátěr, barveno dle Papanicolaou (zvětšení 300x).

B) Konvenční WT s denzním lymfocytárním stromatem lemovaným dvouřadým epitelem s onkocytární diferenciací luminální vrstvy buněk. V cystických prostorech je přítomen buněčný detritus. Barveno hematoxylinem eosinem (zvětšení 160x).



Obr. 3. Salivární duktální karcinom příušní žlázy (SDC).

A) Málobuněčný materiál s nečetnými shluky buněk s výraznou pleomorfí jader a zvýšeným nukleocytoplasmatickým poměrem. Hodnocení dle Milánského systému: kategorie V, podezření z malignity. Cytospin, barveno dle Papanicolaou (zvětšení 300x).

B) V hyalinizovaném stromatu jsou přítomny solidní okrsky buněk s hojnou eosinofilní cytoplasmou, pleomorfními jádry s promínucím jádřerkem a nečetnými mitózami. Perineurální invaze je pro salivární duktální karcinom charakteristická. Barveno hematoxylinem eosinem (zvětšení 200x).

C) Imunohistochemický průkaz jaderné positivity androgenních receptorů (zvětšení 300x).

LITERATURA

1. **Rossi ED, Wong LQ, Bizzarro T, Petrone G, Mule A, Fadda G, Baloch ZW.** The impact of the FNAC in the management of salivary gland lesions: institutional experiences leading to a risk-based classification scheme. *Cancer Cytopathol* 2016; 124: 388-396.
2. **Liu CC, Jethwa AR, Khariwala SS, Johnson J, Shin JJ.** Sensitivity, specificity, and post-test probability of parotid fine needle aspiration: a systematic review and meta-analysis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2016; 154(1): 9-23.
3. **Rossi ED, Faquin WC, Baloch ZW, Barkan GA, Foschini MP, Pusztaszeri M, et al.** The Milan System for Reporting Salivary Gland Cytopathology: Analysis and suggestions of initial survey. *Cancer Cytopathol* 2017; 125(10): 757-766.
4. **Faquin WC, Rossi ED, editors.** The Milan System for Reporting Salivary Gland Cytopathology. Cham: Springer; 2018.
5. **Skálava A, Šteiner P, Vaněček T.** Novinky v molekulární diagnostice karcinomů slinných žláz: „translokační karcinomy“. *Cesk Patol* 2016; 52(3): 139-145.
6. **Pusztaszeri MP, García JJ, Faquin WC.** Salivary gland FNA: new markers and new opportunities for improved diagnosis. *Cancer Cytopathol* 2016; 124(5): 307-316.
7. **Dušková J.** Nový systém pro sjednocené hodnocení tenkojehlových aspiračních biopsií štítné žlázy – Bethesda 2010. *Cesk Patol* 2011; 47: 8-14.

3.3.2. Significance of 1p36 locus deletion in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands.

Tato studie vychází ze skutečnosti, že molekulární pozadí adenoidně cystického karcinomu slinných žláz je poměrně heterogenní a vykazuje široké spektrum somatických mutací. Vedle standardně reportovaných translokací *MYB-NFIB* (62) a *MYBL1-NFIB* (67), které jsou dnes již hojně využívány pro diagnostiku ADC, byly nalezeny i jiné somatické mutace a zvláštní pozornost je věnována deleci lokusu 1p36. Na lokusu 1p36 se nachází řada tumor supresorových genů, jejichž delece byla popsána vedle ADC i v řadě jiných nádorů (70). Přítomnost delece lokusu 1p36 významně koreluje se signifikantně horší prognózou (71). Cílem této studie proto bylo vyšetřit molekulárně-genetické pozadí ADC a stanovit deleci 1p36 lokusu jako negativní prediktivní marker na velkém souboru čítající 85 pacientů s ADC v různých lokalizacích a stádiu onemocnění.

Na základě histomorfologického vyšetření byl stanoven grade a sumarizována klinicko-patologická data včetně follow-upu. Imunohistochemické vyšetření bylo v souladu s charakteristickým imunoprofilem ADC. Navíc bylo provedeno ve všech 85 případech barvení protilátkou MYB, která byla pozitivní v 45 případech (51,1 %) a tato pozitivita byla predilekční v abluminální vrstvě buněk. V dalším kroku bylo provedeno molekulárně-genetické vyšetření metodou FISH, jehož výsledky jsou v tabulce.

Použitá sonda	Pozitivní případy/počet testovaných případů	Pozitivní případy (%)
MYB ba	60/85	70,59
NFIB ba	69/85	81,18
MYB-NFIB DF	57/79	72,15
MYBL1 ba	16/28	57,14
1p36/1q25	13/85	15,29

Tabulka 18 – Výsledky FISH analýzy testovaných ADC. ba: break apart; DF: dual fusion

Z výsledků statistické analýzy vyplývá, že delece lokusu 1p36 je významně asociovaná s pokročilými klinickými stádii 3 a 4 v době diagnóz a histologicky s grade 3. V těchto případech bylo signifikantně nižší celkové přežití (overall survival), pro nemoc specifické přežití (disease-specific survival), období bez recidivy (recurrence-free interval) i přežití bez

recidivy (recurrence-free survival). Tyto případy s prokázanou delecí lokusu 1p36 však nikdy neobsahovaly zlom v genu *MYBL1*, který byl nalezen výhradně v případech méně pokročilých, tedy ve stádiích 1 a 2. Všechny tyto případy s prokázaným zlomem *MYBL1* byly negativní v IHC barvení protilátkou MYB.

Na souboru 85 ADC bylo potvrzeno, že přítomnost delece lokusu 1p36 je nepříznivým prognostickým markerem. Vzhledem k tomu, že žádný z těchto případů neobsahoval zlom v genu *MYBL1*, lze předpokládat, že se tyto dva nálezy vzájemně vylučují. Translokace zahrnující geny *MYB*, *NFIB*, či *MYBL1* byly nalezeny v 79 případech z celkem 85 testovaných vzorků, což potvrzuje jeho důležitost, jakožto diagnostického markeru.



Prognostic significance of 1p36 locus deletion in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands

Petr Šteiner^{1,2} · Simon Andreasen^{3,4} · Petr Grossmann² · Lukáš Hauer⁵ · Tomáš Vaněček^{1,2} · Markéta Miesbauerová¹ · Thalita Santana⁶ · Katalin Kiss⁷ · David Slouka⁸ · Alena Skálová¹

Received: 10 March 2018 / Revised: 17 March 2018 / Accepted: 26 March 2018 / Published online: 4 April 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

Adenoid cystic carcinoma (AdCC) of the salivary glands is characterized by *MYB-NFIB* or *MYBL1-NFIB* fusion, prolonged but relentlessly progressive clinical course with frequent recurrences, and development of distant metastasis resulting in high long-term mortality. Currently, no effective therapy is available for patients with advanced non-resectable and/or metastatic disease. Complicating the clinical management of this patient group is the lack of prognostic markers. The purpose of this study is to investigate the prognostic value of 1p36 loss in patients with AdCC. The presence of 1p36 deletion and gene fusions involving the *MYB*, *NFIB*, and *MYBL1* genes in a cohort of 93 salivary gland AdCCs was studied using fluorescence in situ hybridization. These results were statistically correlated with clinical data and outcome. Deletion of 1p36 in AdCC was identified in 13 of 85 analyzable cases (15.29%). *MYB-NFIB* fusion was detected in 57/85 (67.1%), *MYBL1-NFIB* fusion in 12/85 (14.1%), *MYB-X* fusion in 4/85 (4.7%), *MYBL1-X* in 4/85 (4.7%), and *NFIB-X* in 2/85 (2.4%) of AdCC cases. None of the 1p36-deleted samples showed *MYBL1* rearrangement. Statistical analysis demonstrated a significant correlation between 1p36 deletion and advanced tumor stage and solid histology ($p = 0.0061$ and 0.0007 , respectively). Kaplan-Meier survival curves showed statistically significant correlations between 1p36 deletion and decreased overall survival, disease-specific survival, recurrence-free interval, and recurrence-free survival, all of which were maintained in multivariate analysis. We demonstrate that 1p36 deletion can serve as an indicator of unfavorable outcome of patients with salivary gland AdCC.

Keywords Salivary gland · Adenoid cystic carcinoma · 1p36 locus deletion · *MYB-NFIB* · Prognosis

Introduction

Salivary gland carcinomas are rare and constitute a morphologically heterogeneous group of lesions that are often

diagnostically challenging [1]. In recent years, the taxonomy of salivary gland carcinomas has improved dramatically by the discovery of type-specific fusion oncogenes generated by chromosomal translocations [2].

The preliminary results of the study were presented as a poster at USCAP Meeting 2018, Vancouver, Canada.

✉ Petr Šteiner
steiner@bioticka.cz

¹ Department of Pathology, Faculty of Medicine in Plzen, Charles University, Plzen, Czech Republic

² Bioptic Laboratory, Ltd, Molecular Pathology Laboratory, Mikulášské náměstí 4, 326 00 Plzen, Czech Republic

³ Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery and Audiology, Rigshospitalet, Copenhagen University Hospital, Copenhagen, Denmark

⁴ Department of Otorhinolaryngology and Maxillofacial Surgery, Zealand University Hospital, Køge, Denmark

⁵ Department of Maxillofacial Surgery, Faculty of Medicine in Plzen, Clinic of Dentistry, Charles University, Plzen, Czech Republic

⁶ Department of Oral Pathology, Faculty of Dentistry, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

⁷ Department of Pathology, Rigshospitalet, Copenhagen University Hospital, Copenhagen, Denmark

⁸ Department of Otorhinolaryngology, Faculty of Medicine in Plzen, Charles University, Plzen, Czech Republic

Adenoid cystic carcinoma (AdCC) is among the most frequent carcinomas of the salivary gland and sinonasal tract [1]. Following surgical resection, AdCC is characterized by a slow but relentlessly progressive clinical course due to frequent local and distant recurrences and fatal outcome in 40% of patients after 10 years [3]. This ranks AdCC as one of the most-aggressive and least-predictable malignancy among head and neck cancers [4]. Histologically, AdCC is a highly infiltrative and morphologically bland biphasic tumor composed of abluminal myoepithelial and luminal ductal cells arranged in tubular, cribriform, and solid growth patterns. The carcinoma cells tend to have scant cytoplasm and angulated hyperchromatic nuclei. Perineural invasion is almost invariably present [5].

The discovery of the *MYB-NFIB* gene fusion is the most significant advance in understanding the molecular pathology of AdCC [6]. The *MYB-NFIB* fusion is unique for AdCC among salivary gland malignancies and can be detected in up to 86% of cases, making it an important diagnostic tool in histopathologically equivocal cases [7–10]. Recently, a subset of *MYB-NFIB*-negative cases was shown to harbor an alternative *MYBL1-NFIB* gene fusion along with more rare variants including *MYBL1* fusions with *YTHDF3* and *RAD51B* and *NFIB* fusions with *XRCC4*, *NKAIN2*, *PTPRD*, and *AIG1* [11, 12].

Several studies of the mutational landscape in AdCC have shown a heterogeneous repertoire of somatic mutations, with solid variants showing a higher number of copy number alterations, including chromosomal losses involving 1p and 6q [13–21]. The 1p36 locus contains several tumor suppressor genes (e.g., *TP73*, *CHD5*, *SPEN*), and its deletion has been reported in various types of cancer, including breast, cervical, pancreatic, pheochromocytoma, hepatocellular, lung, colorectal, and melanoma [22–28]. In addition, 1p36 deletion has been shown to have prognostic value in patients with oligodendrogliomas, where concurrent deletion of 19q13 predicts for better treatment response [29].

Although deletions including 1p36 has been studied and identified in various proportions of AdCC cases [13–16], only one study has shown some evidence suggesting that 1p36 deletion correlates with poor prognosis [30]. Therefore, the aim of the present study was to investigate the prognostic value of 1p36 deletion in a large cohort of AdCCs.

Materials and methods

Material

The consultation files of the Salivary Gland Tumor Registry, at the Department of Pathology, Faculty of Medicine in Plzen, Biopsticka Laborator, Ltd., Plzen, Czech Republic (AS), and Copenhagen University Hospital (KK and SA)

harvested 93 cases of AdCC of major and minor salivary glands, for which complete clinical follow-up data were available. Five cases were excluded from the further analysis because of poor tissue quality and three due to incomplete follow-up.

The histopathological features of all tumors and the immunohistochemical stains, when available, were reviewed by two experienced head and neck pathologists (AS and KK). Sinonasal AdCCs were investigated for HPV in order to exclude HPV-related multiphenotypic carcinoma as previously described [31]. Grading and staging of AdCCs were performed based on criteria published recently by WHO Classification of Head and Neck Tumors [1].

Immunohistochemistry

For conventional microscopy, the excised tissues were fixed in formalin, routinely processed, embedded in paraffin (FFPE), cut, and stained with hematoxylin and eosin. For immunohistochemical studies, 4- μ m-thick sections were cut from paraffin blocks and mounted on positively charged slides (TOMO, Matsunami Glass IND, Japan). Sections were processed on a BenchMark ULTRA (Ventana Medical System, Tucson, AZ), deparaffinized, and then subjected to heat-induced epitope retrieval by immersion in a CC1 solution at pH 8.6 at 95 °C.

Primary antibodies used are summarized in Table 1. The bound antibodies were visualized using the ultraView Universal DAB Detection Kit (Roche) and ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit (Roche). The slides were counterstained with Mayer's hematoxylin. Appropriate positive and negative controls were employed. Cut-off value for MYB positivity was defined as 5% of positive carcinoma cells.

Fish

Four-micrometer-thick FFPE sections were placed onto positively charged slides. The unstained slides were routinely deparaffinized and incubated in 1 \times Target Retrieval Solution Citrate at pH 6 (Dako, Glostrup, Denmark) at 95 °C for 40 min and subsequently cooled for 20 min at room temperature in the same solution. Slides were washed in deionized water for 5 min and digested in protease solution with pepsin (0.5 mg/ml, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) in 0.01 M HCl at 37 °C for 25 to 60 min, according to the sample conditions. Slides were then placed into deionized water for 5 min, dehydrated in a series of ethanol solution (70, 85, and 96% for 2 min each), and air dried.

For detection of rearrangement of *MYB*, *MYBL1*, and *NFIB*, ZytoLight SPEC *MYB* Dual Color Break Apart Probe (ZytoVision GmbH, Bremerhaven, Germany), custom-designed SureFish *NFIB* Break Apart probe, SureFish

Table 1 Antibodies used for immunohistochemical study

Antibody specificity	Clone	Dilution	Antigen retrieval (time)	Source
S-100 protein	Polyclonal	RTU	CC1 (20 min)	Ventana
CK7	OV-TL 12/30	1:200	CC1 (36 min)	Dako Cytomation
MYB	EP769Y	1:100	CC1 (64 min)	Abcam
Ki-67	30-9	RTU	CC1 (64 min)	Ventana
P63	4A4	RTU	CC1 (64 min)	Ventana
SOX10	Polyclonal	1:100	CC1 (64 min)	Cell Marque

RTU, ready to use (prediluted); CC1, EDTA buffer (pH 8.6)

MYBL1 Break Apart probe, and SureFish *MYB-NFIB* Dual Fusion probe (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) were used. Chromosomal locations (build Human Genome version 19) used for custom *NFIB* break-apart probe oligos were chr9:13740671-14140560 and chr9:14340306-14740560, for *MYBL1* break-apart probe were chr8:67076230-67474559 and chr8:67526335-68426199, and for custom-designed *MYB-NFIB* dual-fusion probe were chr6:135271234-135771043 and chr9:13990266-14490285. For the detection of 1p36 locus deletion by FISH, *ZytoLight*® SPEC 1p36/1q25 Dual Color Probe (ZytoVision GmbH) was used. For the SureFish custom designed probe, 0.5 µl of both green and orange probe 0.5 µl of deionized water and 3.5 µl of LSI Buffer (Vysis/Abbott Molecular, IL, USA) were mixed before applying onto specimen. *MYB* Dual Color Break Apart and 1p36/1q25 probes were factory premixed.

Probe was applied onto the specimen, covered with a glass coverslip, and sealed with rubber cement. Slides were incubated in the ThermoBrite instrument (StatSpin/Iris Sample Processing, Westwood, MA, USA) with co-denaturation at 85 °C for 8 min and hybridization at 37 °C for 16 h. Rubber-cemented coverslip was then removed, and the slide was placed in post-hybridization wash solution (2xSSC + 0.3% NP-40) at 72 °C for 2 min. The slides were air dried in the dark, counterstained with 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Vysis/Abbott Molecular, IL, USA), coverslipped, and immediately examined. Appropriate positive and negative controls for each FISH probe were employed.

FISH interpretation

The sections were examined with an Olympus BX51 fluorescence microscope (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) using a ×100 objective and filter sets triple-band pass (DAPI/SpectrumGreen/SpectrumOrange), dual-band pass (SpectrumGreen/SpectrumOrange), and single-band pass (SpectrumGreen or SpectrumOrange).

A minimum of 100 randomly selected, non-overlapping tumor cell nuclei were evaluated for the presence of yellow, orange, and green fluorescent signals. For break-apart probes, yellow signals were considered negative, whereas separate

orange and green signals were considered positive. For the fusion probe, yellow signals were considered positive, while separate orange and green signals were considered negative. Cut-off values were set to more than 10 and 20% of the nuclei for break-apart and fusion probes, respectively, showing split or break fused signals (mean + 3 standard deviation in normal non-neoplastic control tissues). For 1p36, sample was considered positive when the ratio between orange and green signal sums was equal/bellow 0.7 [32]. Nuclei presenting only one color were excluded from the analysis.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SW SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). The descriptive statistics such as mean, standard deviation, variance, median, Q1, Q3, minimum, and maximum were calculated for each group and subgroup. Categorical variables were described using frequency tables (age variable cut-off value = 55Y). Box & Whisker plot diagrams and Pie Charts were performed to get a view on the data. Non-parametric tests (Wilcoxon two-sample test or Kruskal-Wallis test) were used for the comparison of differences between investigated parameters. The statistical significance of observed differences in proportions was tested using the χ^2 test and Fisher's exact test when data were sparse. Relations between variables were analyzed using Spearman correlation coefficients.

Overall survival (OS), disease-specific survival (DSS), recurrence-free interval (RFI), and recurrence-free survival (RFS) were estimated using the Kaplan-Meier survival method. Univariate analyses to evaluate differences in survival between investigated groups were performed using the Log-Rank Test and Gehan Wilcoxon Test. The Cox proportional hazard model was used to specify the role of the independent prognostic value of individual parameters (1p36 deletion, age, stage, histological grade, and sex) for OS, DSS, RFI, and RFS. The multivariate analyses were performed using Cox stepwise regression and Cox hazard model "score procedure" (best achieved score of prognostic factor combinations). Level of statistical significance was set to $p = 0.05$.

Table 2 Summary of clinical and follow-up data in 1p36-positive/negative groups, part 1

Variables	Age	Follow-up	Follow-up—DOD1	Recurrence	Recurrence—DOD1
Total					
Min	14	0	0	1	1
Max	85	322	155	182	127
Mean	56.54	92.73	50.33	51.33	28.25
Median	56	77.5	36	32	19
1p36 positive					
Min	44	0	0	7	7
Max	84	192	64	172	38
Mean	63.23	51.83	27.75	47.88	21.67
Median	57	31	17	32	22
1p36 negative					
Min	14	3	4	1	1
Max	85	322	155	182	127
Mean	55.33	99.54	64.23	52.59	32.20
Median	55.1	92	58	32	19

DOD1, died of disease

Results

Clinical characteristics of the study group

From 93 cases, 85 were analyzable with complete follow-up (46 females and 39 males). Age ranged from 14 to 85 years, with mean of 56.54 years. The most frequent site was the submandibular gland (36 cases), followed by parotid gland (17 cases), minor salivary glands of oral cavity (15 cases), sinonasal tract (12 cases), sublingual gland (4 cases), and larynx (1 case). Thirty-five patients (41.18%) had stage 3 or 4 disease.

Follow-up data

Follow-up data was available for all patients and ranged from 2 to 322 months (mean 93 months). Recurrences occurred in 30/85 (35.29%) patients. Interval to recurrence ranged from 1 to 182 months (mean 52 mo).

Eighty patients underwent surgical resection of the primary tumor, in the remaining five cases, one patient underwent surgery after the study closure, two patients had inoperable disease, for two patients the information on surgery was not available. In the resected specimens, 16 patients (18.82%) had clear surgical margin whereas the remaining 64 cases (75.29%) had close/positive margins. Five cases did not have available data on margin status. Seventy-six patients (89.41%) received adjuvant radiotherapy. Thirty patients (35.29%) died during the follow-up period and 21 (24.71%) died of AdCC (Tables 2 and 3).

Molecular genetic findings

Thirteen of 85 analyzed tumors (15.29%) showed 1p36 loss (Fig. 1; Tables 2 and 3). Sixty of 85 analyzable tumors (70.59%) had were positive for break in *MYB* gene (Fig. 2a), 69/85 (81.18%) for *NF1B* gene break, 57/79 (72.15%) for the

Table 3 Summary of clinical and follow-up data in 1p36-positive/negative groups, part 2

	Stage 3 or 4	Clear Margins	Received radiotherapy	Death	DOD1
Total	35	16	76	30	21
Number of 1p36 positive	10	1	11	9	8
Number of 1p36 negative	25	15	65	21	13
Uninformative results	0	5	3	0	55
Uninformative in 1p36-positive group	0	2	1	0	4
Uninformative in 1p36-negative group	0	3	2	0	51

DOD1, died of disease

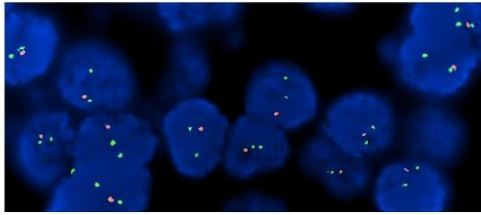


Fig. 1 Pictures showing example of FISH analysis of 1p36 locus deletion. Positivity of 1p36 locus deletion is represented by loss of one locus-specific (orange) signal with two control (green) signals

MYB-NFIB dual fusion (Fig. 2b) and 16/28 (57.14%) for *MYBL1* gene break (Tables 4 and 5).

Histological findings

All cases showed the histological hallmarks of AdCC (Fig. 3). AdCC is typically composed of all growth patterns in variable proportions and is graded based on the extent of any solid growth component; more than 30% of solid component constitutes grade 3 [33, 34]. In the present series, 27/85 cases (31.76%) were mostly solid and represented grade 3 AdCC, 40/85 cases (47.06%) had a predominantly cribriform pattern (grade 2), and 18/85 cases (21.18%) were predominantly tubular (grade 1).

Among the 13 cases that showed 1p36 deletion, 9 (69.23%) were classified as grade 3, while 4 (30.77%) were grade 1.

Immunohistochemical findings

All examined AdCCs were strongly and diffusely positive for CK7 in both the ductal and the modified myoepithelial cells. Staining for S100 protein and SOX10 showed variable, patchy positivity. The outer myoepithelial cells were decorated by p63 immunopositivity. Proliferative activity was generally low to moderate, with a mean MIB1 index of 25% (range 5–60%).

Fig. 2 Pictures showing examples of (MYB) break apart (BA) probes and (MYB-NFIB) dual-fusion (DF) probes. Positive BA probe is represented by one orange-yellow-green complex signal from normal allele and one separated orange and one green signal from allele with break (a). Positive DF probe is represented by one separated orange and one green signal from normal alleles and one or two orange-yellow-green fused signals (b)

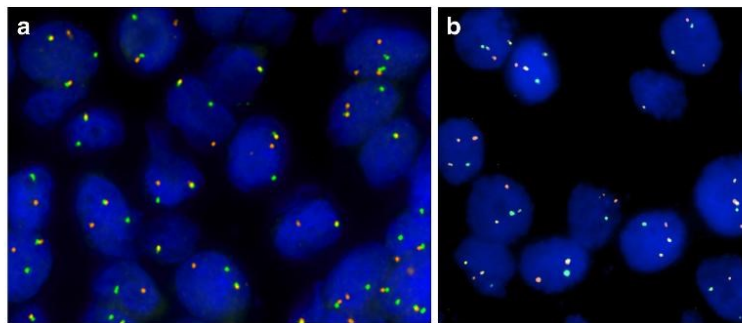


Table 4 Results of FISH testing of adenoid cystic carcinomas

Used FISH probe	Positive/all tested	Positive in percent (%)
MYB ba	60/85	70.59
NFIB ba	69/85	81.18
MYB-NFIB DF	57/79	72.15
MYBL1 ba	16/28	57.14
1p36/1q25	13/85	15.29

ba, break apart; DF, dual fusion

MYB immunohistochemical staining was performed on all cases, of which 45 cases (51.14%) were positive. Most cases exhibited focal nuclear MYB expression in tumor cells, predominantly in abluminal myoepithelial cells. Only six cases showed diffuse nuclear expression in 70–90% of tumor cells, including abluminal and luminal cells. Forty-three cases (48.86%) were negative for MYB.

Survival analysis

Using univariate analysis, 1p36 deletion was significantly associated with tumor stage 3/4 (p value = 0.0061) and histological grade 3 (p value = 0.0007) and negatively correlated with *MYBL1* break (p value = 0.0349) as no 1p36-deleted sample had *MYBL1* break. Break of *MYBL1* was associated with tumor stage 1/2 (p value = 0.0219) and *MYB-NFIB* dual-fusion with grade 2 (p value = 0.0280). Immunohistochemical MYB expression correlated with 1p36 deletion (p value = 0.0141), clear surgical margins (p value = 0.0482) and grade 2 (p value = 0.0238). All cases that showed *MYBL1* break (16/85) were negative for MYB IHC (p value < 0.0001).

Kaplan-Meier analysis identified decreased overall survival, disease-specific survival, recurrence-free interval, and recurrence-free survival with higher age, tumor stage (stage 3 or 4), grade 3, solid component, and 1p36 deletion (Fig. 4). Decreased OS and DSS correlated with *MYB* break. Decreased DSS correlated with MYB immunohistochemical positivity (p value = 0.0238). Lower RFI value correlated with

Table 5 Predicted fusion based on FISH testing results

Predicted fusion	Frequency	Predicted fusion	Frequency
<i>MYB-NFIB</i>	57 (67.06%)	<i>NFIB-X</i>	2 (2.35%)
<i>MYBL1-NFIB</i>	12 (14.12%)	Negative	3 (3.53%)
<i>MYB-X</i>	4 (4.71%)	Incomplete results	3 (3.53%)
<i>MYBL1-X</i>	4 (4.71%)	Fusions together	79 (92.94%)

X, unknown fusion partner

closed/involved surgical margins. All data with respective *p*-values are presented in Table 6.

Multivariate analysis (MA) demonstrated decreased OS with increased age, male sex, higher tumor stage, and 1p36 deletion (*p* values = 0.0005, 0.0239, 0.0422, and 0.0054, respectively). Decreased DSS and RFI both correlated with higher age, high tumor stage, and 1p36 deletion (*p* values = 0.0294, 0.0154, and 0.0100 and *p* value = 0.0037, 0.0123, and 0.0055, respectively). Recurrence-free survival correlated negatively with age, male sex, high tumor stage, and 1p36 deletion (*p* values < 0.0001, 0.0359, 0.0532, and 0.049, respectively). The results are summarized in Fig. 5.

Univariate statistical analysis did not show significant correlation between 1p36 deletion and age (*p* value = 0.1866), gender (*p* value = 0.7636), site of origin (*p* value = 0.4830), surgical margins (*p* value = 0.4480), *MYB* break (*p* value = 0.0630), *NFIB* break (*p* value = 0.6744), and *MYB-NFIB* dual fusion (*p* value = 0.6793).

Discussion

The discovery of the t(6;9)(q22-23;p23-24) translocation in AdCC and its characterization by Persson et al. in 2009 was one of the most significant events in understanding of

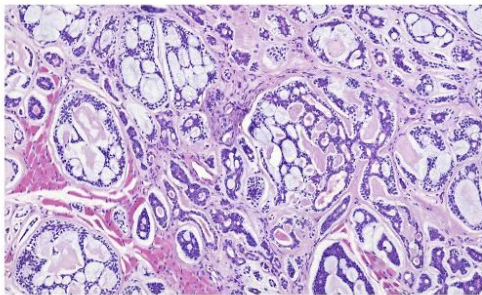


Fig. 3 Adenoid cystic carcinoma is biphasic invasive carcinoma composed of abluminal myoepithelial and luminal ductal cells arranged in tubular, cribriform, and solid growth patterns. The cells tend to have scant cytoplasm and angulated hyperchromatic nuclei. Perineural invasion is a common finding

Springer

molecular pathology of AdCC, and is present in AdCC irrespective of site of origin [6, 35–39]. *MYB-NFIB* drives proliferation in AdCC through activation of downstream targets involved in cell cycle control, DNA replication and repair, and RNA processing [35]. Activation of the transcription factor *MYB* by gene fusion, mutation, or other mechanisms (e.g., deletion of the 3' UTR of the *MYB* gene) has been shown in up to 80% of AdCCs [7–9, 40]. Interestingly, in the *MYB-NFIB*-negative subset of AdCC, another gene fusion between *NFIB* and *MYBL1*, a gene closely related to *MYB*, was recently described [11, 12].

We identified gene fusions involving *MYB*, *NFIB*, and *MYBL1* genes in 79/85 (92.94%) of AdCCs. This confirms the fusion of *MYB-NFIB*, *MYBL1-NFIB*, and their variants as involved in the vast majority of AdCC, although involvement of *NFIB* has been reported in other types of salivary gland tumors [41, 42]. Despite their apparently fundamental role in AdCC biology, the value of these gene fusions as prognostic markers has been a topic of debate [9, 11, 43–46]. Herein, we demonstrate the presence of *MYB* rearrangement to correlate with decreased OS and DSS. Moreover, we provide the evidence that *MYBL1* rearrangement correlates with lower stage.

Studies using array comparative genome hybridization has identified various copy number alteration in AdCC, e.g., chromosomal losses involving 1p32-36, 6q, and 8p and gains of chromosome 8, 6p, 22q13, and 16p [13–16, 30]. 1p36 locus is non-randomly deleted in various human malignancies, supporting its important role in carcinogenesis [24–26, 28]. Moreover, 1p36 deletion seems to serve as a favorable prognostic factor in oligodendrogliomas [29]. 1p36 locus deletion has been found in various proportions (0–44%) of AdCC by comparative genome hybridization or loss of heterozygosity methods [15, 16, 18, 20, 21, 30, 47]. In our study, we identified heterozygous loss of 1p36 in 13/85 (15.29%) AdCC. This is a relatively low number as compared with results of Rao et al. [30], who found 1p32-36 locus deletions in 23/53 (44%) of cases and correlated the deletion with clinical data. Rao et al. found that deletion of 1p32-36 correlated with reduced OS and solid histology, which we were able to confirm in an even larger cohort. In addition, in our cohort, the 1p36 deletion also correlated with lower DSS, RFI, RFS, high tumor stage, solid histology, and absence of *MYBL1* break.

Absence of *MYBL1* break in all 1p36-deleted samples was another interesting finding. Hence, as 1p36 deletion correlates with advanced tumor stage and solid histology while *MYBL1* rearrangement correlated with low tumor stage, these two genetic alterations in AdCC could be mutually exclusive and indicators of the biological potential of AdCC.

Many genes, including several tumor suppressors, have been identified at the 1p36 locus [23]. Probably the most important gene located in 1p36 region, associated with

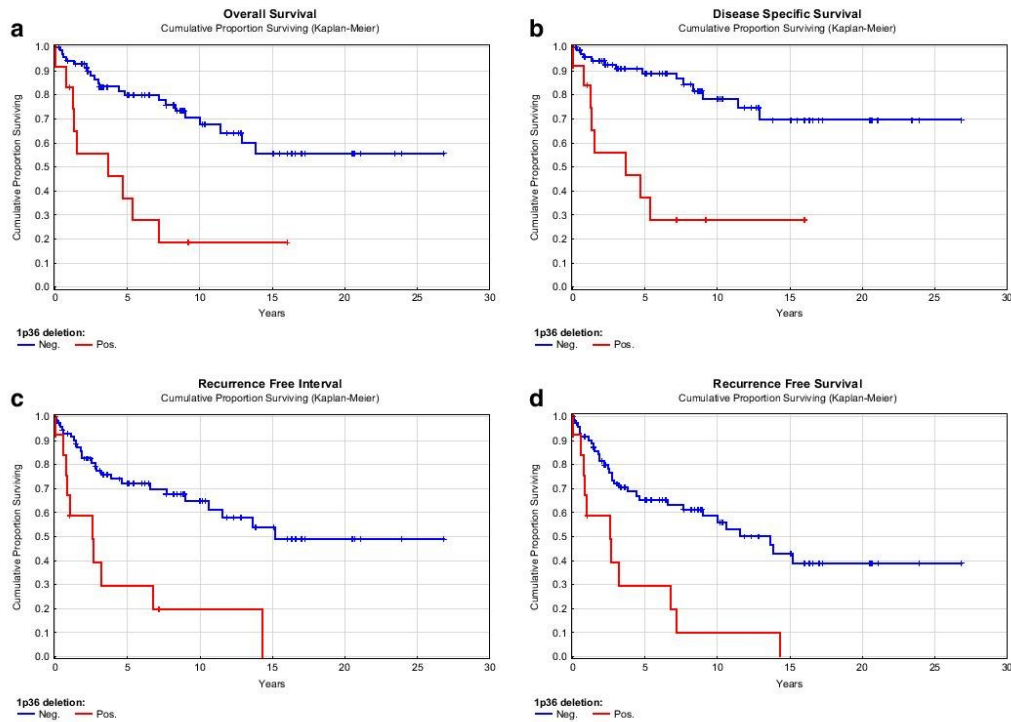


Fig. 4 Graphs representing correlation of 1p36 locus deletion with overall survival (a), disease-specific survival (b), recurrence-free interval (c), and recurrence-free survival (d)

Table 6 Kaplan-Meier analysis summarization in our cohort

Variable	OS (<i>p</i> value)	DSS (<i>p</i> value)	RFI (<i>p</i> value)	RFS (<i>p</i> value)
Age	Neg. (< 0.0001)	Neg. (0.0082)	Neg. (0.0004)	Neg. (< 0.0001)
Sex	NO (0.1126)	NO (0.3623)	NO (0.4052)	NO (0.1923)
Site	NO (0.0626)	NO (0.3657)	NO (0.4352)	NO (0.2164)
Stage	Neg. (0.0011)	Neg. (0.0002)	Neg. (0.0004)	Neg. (0.0020)
Margins	NO (0.6055)	NO (0.1299)	Neg. (0.0172)	NO (0.1241)
Radiotherapy	NO (0.8774)	NO (0.7891)	NO (0.1849)	NO (0.3516)
Histological grade	Neg. (0.0348)	Neg. (0.0110)	Neg. (0.0101)	Neg. (0.0163)
Solid component	Neg. (0.0215)	Neg. (0.0032)	Neg. (0.0025)	Neg. (0.0067)
MYB IHC	NO (0.1237)	Neg. (0.0238)	NO (0.0903)	NO (0.1487)
MYB ba	Neg. (0.0168)	Neg. (0.0189)	NO (0.0983)	NO (0.0709)
NFIB ba	NO (0.5104)	NO (0.8355)	NO (0.6603)	NO (0.4931)
MYB-NFIB DF	NO (0.3490)	NO (0.1582)	NO (0.2820)	NO (0.4207)
MYBL1 ba	NO (0.3189)	NO (0.3262)	NO (0.8559)	NO (0.8266)
1p36 deletion	Neg. (0.0001)	Neg. (< 0.0001)	Neg. (< 0.0001)	Neg. (0.0001)

OS, overall survival; DSS, disease-specific survival; RFI, recurrence-free interval; RFS, recurrence-free survival; NO, no statistical significant correlation; Neg, decreased survival with higher clinical value

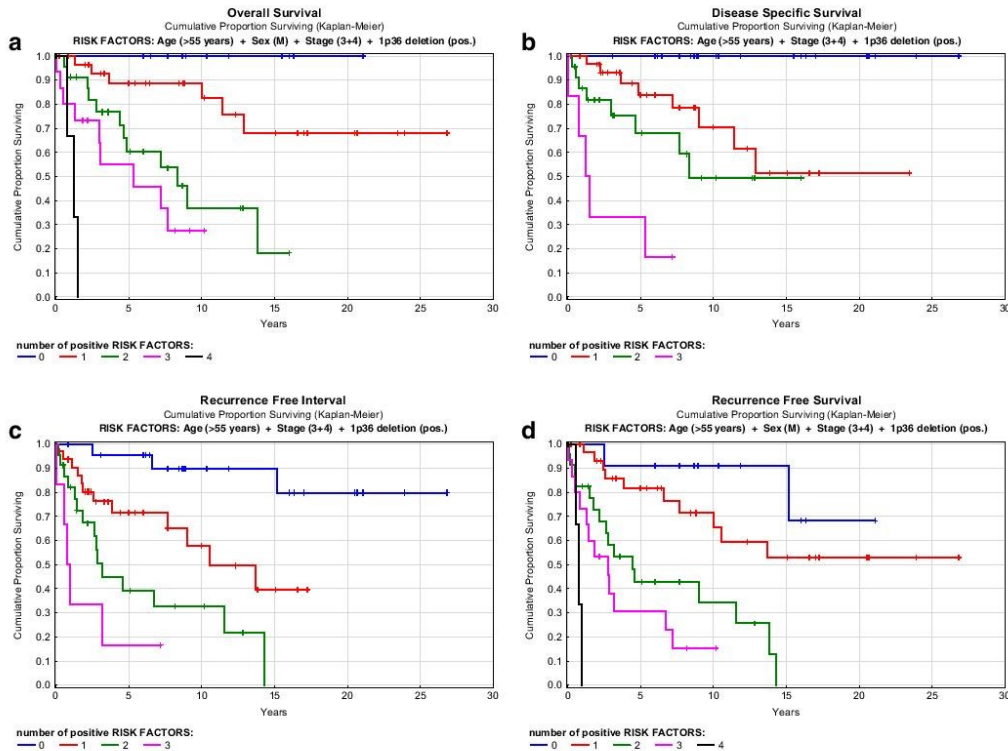


Fig. 5 Multivariate analysis: overall survival (a), disease-specific survival (b), recurrence-free interval (c), and recurrence-free survival (d) with cumulative proportion surviving

AdCC is *SPEN*, whose truncating mutations have been found in 20.8% of analyzed AdCC patients [19]. Interestingly, some evidence suggests that the *SPEN* mutations correlate with solid histology and therefore poor prognosis [19]. *SPEN* functions as a negative regulator of the NOTCH pathway, one of the main signaling pathways to be affected in AdCC [17, 19, 38]. Activation of the NOTCH pathway in AdCCs can also occur through *NOTCH1* gene mutations. These mutations correlate with solid histology, advanced stage, higher propensity to bone and liver metastasis, and significantly decreased OS and RFS [48, 49]. In our study, we found significant correlation of 1p36 deletion with solid histology. Our data support that 1p36 deletion, possibly due to loss of *SPEN*, is involved in especially AdCC with solid histology.

In conclusion, we confirm that 1p36 deletion is an independent predictor of adverse outcome in salivary gland AdCC. Interestingly, 1p36 deletion correlated with advanced tumor stage and solid histology and negatively correlated with

MYBL1 break. To the best of our knowledge, this study represents the largest cohort of AdCC in which 1p36 aberrations are correlated with clinical outcomes. Further molecular characterization of specific aberrations in genes at 1p36 could be useful for better understanding of AdCC and to identify potential therapeutic targets.

Acknowledgements We wish to thank Stanislav Komunda for valuable assistance with statistical analysis.

Funding This study was supported by the Ministry of Education, Czech Republic (grant SVV-2017-260 391).

Compliance with ethical standards

Study design has been approved by Danish Regional Ethics Committee (H-6-2014-086), the Danish Data Protection Agency (REG-94-2014), and local ethical committee of Charles University, Faculty of Medicine Plzen.

Conflicts of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Stenman G, Licitra L, Said-Al-Naief N, van Zante A, Yarborough W. Adenoid cystic carcinoma. In: El-Naggar A, Chan J, 2017 Grandis J, Takata T, Sliotweg P (eds) World Health Organization classification of tumours. IARC Press, Lyon, 164–165
2. Skálová A, Stenman G, Simpson RHW, Hellquist H, Slouka D, Svoboda T, Bishop JA, Hunt JL, Nibu KI, Rinaldo A, Vander Poorten V, Devaney KO, Steiner P, Ferlito A (2017) The role of molecular testing in the differential diagnosis of salivary gland carcinomas. *Am J Surg Pathol*. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000980>
3. Bjørndal K, Kroghdal A, Therkildsen MH, Charabi B, Kristensen CA, Andersen E, Schytte S, Primdahl H, Johansen J, Pedersen HB, Andersen LJ, Godballe C (2015) Salivary adenoid cystic carcinoma in Denmark 1990–2005: outcome and independent prognostic factors including the benefit of radiotherapy. Results of the Danish Head and Neck Cancer Group (DAHANCA). *Oral Oncol* 51: 1138–1142. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2015.10.002>
4. Godge P, Shama S, Yadav M (2012) Adenoid cystic carcinoma of the parotid gland. *Contemp Clin Dent* 3:223–226. <https://doi.org/10.4103/0976-237X.96838>
5. Coca-Pelaz A, Rodrigo JP, Bradley PJ, Vander Poorten V, Triantafyllou A, Hunt JL, Strojjan P, Rinaldo A, Haigentz M, Takes RP, Mondin V, Teymoortash A, Thompson LD, Ferlito A (2015) Adenoid cystic carcinoma of the head and neck—an update. *Oral Oncol* 51:652–661. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2015.04.005>
6. Persson M, Andrén Y, Mark J, Horlings HM, Persson F, Stenman G (2009) Recurrent fusion of MYB and NFIB transcription factor genes in carcinomas of the breast and head and neck. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:18740–18744. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909114106>
7. Brill LB, Kanner WA, Fehr A, Andrén Y, Moskaluk CA, Löning T, Stenman G, Frierson HF (2011) Analysis of MYB expression and MYB-NFIB gene fusions in adenoid cystic carcinoma and other salivary neoplasms. *Mod Pathol* 24:1169–1176. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2011.86>
8. Mitani Y, Li J, Rao PH, Zhao YJ, Bell D, Lippman SM, Weber RS, Caulin C, El-Naggar AK (2010) Comprehensive analysis of the MYB-NFIB gene fusion in salivary adenoid cystic carcinoma: incidence, variability, and clinicopathologic significance. *Clin Cancer Res* 16:4722–4731. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-0463>
9. West RB, Kong C, Clarke N, Gilks T, Lipsick JS, Cao H, Kwok S, Montgomery KD, Varma S, Le QT (2011) MYB expression and translocation in adenoid cystic carcinomas and other salivary gland tumors with clinicopathologic correlation. *Am J Surg Pathol* 35:92–99. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3182002777>
10. Xu B, Drill E, Ho A, Dunn L, Prieto-Granada CN, Chan T, Ganly I, Ghossein R, Katabi N (2017) Predictors of outcome in adenoid cystic carcinoma of salivary glands: a clinicopathologic study with correlation between MYB fusion and protein expression. *Am J Surg Pathol* 41:1422–1432. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000918>
11. Brayer KJ, Frerich CA, Kang H, Ness SA (2016) Recurrent fusions in MYB and MYBL1 define a common, transcription factor-driven oncogenic pathway in salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Cancer Discov* 6:176–187. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-15-0859>
12. Mitani Y, Liu B, Rao PH, Borra VJ, Zafereo M, Weber RS, Kies M, Lozano G, Futreal PA, Caulin C, El-Naggar AK (2016) Novel MYBL1 gene rearrangements with recurrent MYBL1-NFIB fusions in salivary adenoid cystic carcinomas lacking t(6;9) translocations. *Clin Cancer Res* 22:725–733. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2867-T>
13. Bemheim A, Toujani S, Saulnier P, Robert T, Casiraghi O, Validire P, Temam S, Menard P, Dessen P, Fouret P (2008) High-resolution array comparative genomic hybridization analysis of human bronchial and salivary adenoid cystic carcinoma. *Lab Invest* 88:464–473. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2008.18>
14. Freier K, Flechtenmacher C, Walch A, Ohl S, Devens F, Burke B, Hassfeld S, Lichter P, Joos S, Hofe C (2005) Copy number gains on 22q13 in adenoid cystic carcinoma of the salivary gland revealed by comparative genomic hybridization and tissue microarray analysis. *Cancer Genet Cytogenet* 159:89–95. <https://doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2004.09.007>
15. Oga A, Uchida K, Nakao M, Kawauchi S, Furuya T, Chochi Y, Ikemoto K, Okada T, Ueyama Y, Sasaki K, Yousefpour F (2011) Loss of 6q or 8p23 is associated with the total number of DNA copy number aberrations in adenoid cystic carcinoma. *Oncol Rep* 26: 1393–1398. <https://doi.org/10.3892/or.2011.1446>
16. Persson M, Andrén Y, Moskaluk CA, Frierson HF, Cooke SL, Futreal PA, Kling T, Nelander S, Nordkvist A, Persson F, Stenman G (2012) Clinically significant copy number alterations and complex rearrangements of MYB and NFIB in head and neck adenoid cystic carcinoma. *Genes Chromosom Cancer* 51:805–817. <https://doi.org/10.1002/gcc.21965>
17. Rettig EM, Talbot CC, Sausen M, Jones S, Bishop JA, Wood LD, Tokheim C, Niknafs N, Karchin R, Fertig EJ, Wheelan SJ, Marchionni L, Considine M, Fakhry C, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B, Ha PK, Agrawal N (2016) Whole-genome sequencing of salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Cancer Prev Res (Phila)* 9:265–274. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-15-0316>
18. Seethala RR, Cieply K, Bames EL, Dacic S (2011) Progressive genetic alterations of adenoid cystic carcinoma with high-grade transformation. *Arch Pathol Lab Med* 135:123–130. <https://doi.org/10.1043/2010-0048-OAR.1>
19. Stephens PJ, Davies HR, Mitani Y, Van Loo P, Shlien A, Tarpey PS, Papaemmanuil E, Cheverton A, Bignell GR, Butler AP, Gamble J, Gamble S, Hardy C, Hinton J, Jia M, Jayakumar A, Jones D, Latimer C, McLaren S, McBride DJ, Menzies A, Mudie L, Maddison M, Raine K, Nik-Zainal S, O'Meara S, Teague JW, Varela I, Wedge DC, Whitmore I, Lippman SM, McDermott U, Stratton MR, Campbell PJ, El-Naggar AK, Futreal PA (2013) Whole exome sequencing of adenoid cystic carcinoma. *J Clin Invest* 123:2965–2968. <https://doi.org/10.1172/JCI67201>
20. Tse DT, Finkelstein SD, Benedetto P, Dubovy S, Schiffman J, Feuer WJ (2006) Microdissection genotyping analysis of the effect of intraarterial cytoreductive chemotherapy in the treatment of lacrimal gland adenoid cystic carcinoma. *Am J Ophthalmol* 141:54–61. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2005.09.002>
21. Zhang L, Mitani Y, Caulin C, Rao PH, Kies MS, Saintigny P, Zhang N, Weber RS, Lippman SM, El-Naggar AK (2013) Detailed genome-wide SNP analysis of major salivary carcinomas localizes subtype-specific chromosome sites and oncogenes of potential clinical significance. *Am J Pathol* 182:2048–2057. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.02.020>
22. Bagchi A, Mills AA (2008) The quest for the 1p36 tumor suppressor. *Cancer Res* 68:2551–2556. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2095>
23. Henrich KO, Schwab M, Westermann F (2012) 1p36 tumor suppression—a matter of dosage? *Cancer Res* 72:6079–6088. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2230>
24. Koshikawa K, Nomoto S, Yamashita K, Ishigure K, Takeda S, Nakao A (2004) Allelic imbalance at 1p36 in the pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Hepato-Gastroenterology* 51: 186–191

25. Kuroda N, Toi M, Hiroi M, Shuin T, Enzan H (2003) Review of renal oncocytoma with focus on clinical and pathobiological aspects. *Histol Histopathol* 18:935–942. <https://doi.org/10.14670/HH-18.935>
26. Lefevre M, Gunduz M, Nagatsuka H, Gunduz E, Al Sheikh Ali M, Beder L, Fukushima K, Yamanaka N, Shimizu K, Nagai N (2009) Fine deletion analysis of 1p36 chromosomal region in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 38:94–98. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2008.00666.x>
27. Leonard JH, Cook AL, Nancarrow D, Hayward N, Van Gele M, Van Roy N, Speleman F (2000) Deletion mapping on the short arm of chromosome 1 in Merkel cell carcinoma. *Cancer Detect Prev* 24: 620–627
28. Midorikawa Y, Yamamoto S, Tsuji S, Kamimura N, Ishikawa S, Igarashi H, Makuuchi M, Kokudo N, Sugimura H, Aburatani H (2009) Allelic imbalances and homozygous deletion on 8p23.2 for stepwise progression of hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 49: 513–522. <https://doi.org/10.1002/hep.22698>
29. van den Bent MJ (2000) Chemotherapy of oligodendroglial tumours: current developments. *Forum (Genova)* 10:108–118
30. Rao PH, Roberts D, Zhao YJ, Bell D, Harris CP, Weber RS, El-Naggar AK (2008) 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* 14:5181–5187. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0158>
31. Andreasen S, Bishop JA, Hansen TV, Westra WH, Bilde A, von Buchwald C, Kiss K (2017) Human papillomavirus-related carcinoma with adenoid cystic-like features of the sinonasal tract: clinical and morphological characterization of six new cases. *Histopathology* 70:880–888. <https://doi.org/10.1111/his.13162>
32. Mohapatra G, Betensky RA, Miller ER, Carey B, Gaumont LD, Engler DA, Louis DN (2006) Glioma test array for use with formalin-fixed, paraffin-embedded tissue: array comparative genomic hybridization correlates with loss of heterozygosity and fluorescence in situ hybridization. *J Mol Diagn* 8:268–276. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2006.050109>
33. Perzin KH, Gullane P, Clairmont AC (1978) Adenoid cystic carcinomas arising in salivary-glands - correlation of histologic features and clinical course. *Cancer* 42:265–282. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197807\)42:1<265::aid-enr2820420141>3.0.co;2-z](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197807)42:1<265::aid-enr2820420141>3.0.co;2-z)
34. Szanto PA, Luna MA, Tortoledo ME, White RA (1984) Histologic grading of adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. *Cancer* 54:1062–1069
35. Andersson MK, Afshari MK, Andrén Y, Wick MJ, Stenman G (2017) Targeting the oncogenic transcriptional regulator MYB in adenoid cystic carcinoma by inhibition of IGF1R/AKT signaling. *J Natl Cancer Inst* 109. <https://doi.org/10.1093/jnci/djx017>
36. Andersson MK, Stenman G (2016) The landscape of gene fusions and somatic mutations in salivary gland neoplasms—implications for diagnosis and therapy. *Oral Oncol* 57:63–69. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2016.04.002>
37. Andreasen S, Tan Q, Agander TK, Steiner P, Bjørndal K, Høgdall E, Larsen SR, Erentaite D, Olsen CH, Ulhøi BP, von Holstein SL, Wessel I, Heegaard S, Homøe P (2018) Adenoid cystic carcinomas of the salivary gland, lacrimal gland, and breast are morphologically and genetically similar but have distinct microRNA expression profiles. *Mod Pathol*. <https://doi.org/10.1038/s41379-018-0005-y>
38. Ho AS, Kannan K, Roy DM, Morris LG, Ganly I, Katabi N, Ramaswami D, Walsh LA, Eng S, Huse JT, Zhang J, Dolgalev I, Huberman K, Heguy A, Viale A, Drobnjak M, Leversha MA, Rice CE, Singh B, Iyer NG, Leemans CR, Bloemena E, Ferris RL, Seethala RR, Gross BE, Liang Y, Sinha R, Peng L, Raphael BJ, Turcan S, Gong Y, Schultz N, Kim S, Chiosea S, Shah JP, Sander C, Lee W, Chan TA (2013) The mutational landscape of adenoid cystic carcinoma. *Nat Genet* 45:791–798. <https://doi.org/10.1038/ng.2643>
39. Nordkvist A, Mark J, Gustafsson H, Bang G, Stenman G (1994) Non-random chromosome rearrangements in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. *Genes Chromosom Cancer* 10:115–121
40. Stenman G (2013) Fusion oncogenes in salivary gland tumors: molecular and clinical consequences. *Head Neck Pathol* 7(Suppl 1):S12–S19. <https://doi.org/10.1007/s12105-013-0462-z>
41. Andreasen S, Persson M, Kiss K, Homøe P, Heegaard S, Stenman G (2016) Genomic profiling of a combined large cell neuroendocrine carcinoma of the submandibular gland. *Oncol Rep* 35:2177–2182. <https://doi.org/10.3892/or.2016.4621>
42. Geurts JM, Schoenmakers EF, Røijer E, Ström AK, Stenman G, van de Ven WJ (1998) Identification of NFIB as recurrent translocation partner gene of HMGIC in pleomorphic adenomas. *Oncogene* 16:865–872. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201609>
43. Chen TY, Keeney MG, Chintakuntlawar AV, Knutson DL, Kloft-Nelson S, Greipp PT, Garrity JA, Salomao DR, Garcia JJ (2017) Adenoid cystic carcinoma of the lacrimal gland is frequently characterized by MYB rearrangement. *Eye (Lond)* 31:720–725. <https://doi.org/10.1038/eye.2016.307>
44. D'Alfonso TM, Mosquera JM, MacDonald TY, Padilla J, Liu YF, Rubin MA, Shin SJ (2014) MYB-NFIB gene fusion in adenoid cystic carcinoma of the breast with special focus paid to the solid variant with basaloid features. *Hum Pathol* 45:2270–2280. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2014.07.013>
45. Mitani Y, Rao PH, Futreal PA, Roberts DB, Stephens PJ, Zhao YJ, Zhang L, Mitani M, Weber RS, Lippman SM, Cawlin C, El-Naggar AK (2011) 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* 17:7003–7014. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1870>
46. Roden AC, Greipp PT, Knutson DL, Kloft-Nelson SM, Jenkins SM, Marks RS, Aubry MC, Garcia JJ (2015) Histopathologic and cytogenetic features of pulmonary adenoid cystic carcinoma. *J Thorac Oncol* 10:1570–1575. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000656>
47. Costa AF, Altemani A, Vékony H, Bloemena E, Fresno F, Suárez C, Llorente JL, Hermsen M (2010) Genetic profile of adenoid cystic carcinomas (ACC) with high-grade transformation versus solid type. *Anal Cell Pathol (Amst)* 33:217–228. <https://doi.org/10.3233/ACP-CLO-2010-0547>
48. Ferrarotto R, Mitani Y, Diao L, Guijarro I, Wang J, Zweidler-McKay P, Bell D, William WN, Glisson BS, Wick MJ, Kapoun AM, Patnaik A, Eckhardt G, Munster P, Faoro L, Dupont J, Lee JJ, Futreal A, El-Naggar AK, Heymach JV (2017) Activating NOTCH1 mutations define a distinct subgroup of patients with adenoid cystic carcinoma who have poor prognosis, propensity to bone and liver metastasis, and potential responsiveness to Notch1 inhibitors. *J Clin Oncol* 35:352–360. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.67.5264>
49. Sajed DP, Faquin WC, Carey C, Severson EA, Afrogheh A, Johnson CA, Blacklow SC, Chau NG, Lin DT, Krane JF, Jo VY, Garcia JJ, Sholl LM, Aster JC (2017) Diffuse staining for activated notch1 correlates with notch1 mutation status and is associated with worse outcome in adenoid cystic carcinoma. *Am J Surg Pathol* 41: 1473–1482. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000945>

3.3.3. Molecular profiling of hyalinizing clear cell carcinomas revealed a subset of tumors harboring a novel *EWSR1-CREM* fusion: report of three cases

Světlobuněčný karcinom slinných žláz, podle předchozí WHO známý jako hyalinizující světlobuněčný karcinom je low-grade maligní karcinom, který je ve své klasické podobě spojen s translokací genů *EWSR1-ATF1*, a to až v 80 % případů (115). Tři případy nádorů se světlobuněčnou diferenciací pocházely z báze jazyka, dolního laloku plíce a nasofaryngu.

Vzhledem k histomorfologii a imunoprofilu byly všechny původně diagnostikovány jako mukoepidermoidní karcinomy s netradiční morfologií. Pomocí FISH byl diagnostikován zlom v genu *EWSR1*, avšak gen *ATF1* byl intaktní. RT-PCR byla negativní pro průkaz fúze *EWSR1-ATF1* i *CRTC1/3-MAML2*. Až na podkladě výsledků metodou NGS byla identifikována doposud nepopsaná fúze genů *EWSR1-CREM*, která byla potvrzena metodou FISH a ve dvou případech i RT-PCR.

Translokace *EWSR1-CREM* doposud nebyla popsána v žádném jiném karcinomu slinných žláz, a proto tento objev opět rozšířil spektrum genových aberací, které jsou asociované s konkrétním typem nádoru. Diferenciální diagnostika světlobuněčného karcinomu je totiž velmi široká a záměna s high-grade tumorem může mít pro pacienta mutilující důsledky, přestože je CCC ve své podstatě low-grade tumor, ač byly popsány případy high-grade transformace (209). Zatím se nepodařilo jasně ozřejmit, zda má tato translokace nějaký prognostický význam, či zda je pouze diagnostická.

Molecular Profiling of Hyalinizing Clear Cell Carcinomas Revealed a Subset of Tumors Harboring a Novel *EWSR1-CREM* Fusion

Report of 3 Cases

Erin Chapman, MD,* Alena Skalova, MD, PhD,†‡ Nikola Ptakova, MSc,§ Petr Martinek, PhD,§
 Angela Goytain, BSc,* Tracy Tucker, PhD,|| Wei Xiong, MD,¶ Mary Leader, MD,#
 Brian A. Kudlow, PhD,** Josh D. Haimes, BSc,** Malcolm M. Hayes, MBChB,*||
 Peter Bohus, MD,†† Marketa Miesbauerova, MD,†‡ Cheng-Han Lee, MD, PhD,*||
 and Tony L. Ng MD, PhD*||,†‡

Abstract: We describe a novel gene fusion, *EWSR1-CREM*, identified in 3 cases of clear cell carcinoma (CCC) using anchored multiplex polymerase chain reaction, a next-generation sequencing-based technique. CCC is a low-grade salivary tumor recently characterized to have *EWSR1-ATF1* fusions in the majority of cases. Three cases of malignant tumor presenting in the base of tongue, lung, and nasopharynx were studied. All cases shared a clear cell morphology with hyalinized stroma, presence of mucin and p63 positivity and were initially diagnosed as mucoepidermoid carcinoma but were negative for evidence of any of the expected gene fusions. Anchored multiplex polymerase chain reaction demonstrated a *EWSR1-CREM* fusion in all 3 cases to confirm a diagnosis of CCC. This finding is biologically justified as *CREM* and *ATF1* both belong to the CREB family of transcription factors. *EWSR1-CREM* fusions have not been previously reported in CCC and have only rarely been reported in other tumors. We show that the ability to discover novel gene variants with next-generation sequencing-based assays has clinical utility in the pathologic classification of fusion gene-associated tumors.

Key Words: salivary, hyalinizing clear cell carcinoma, *EWSR1-CREM* fusion transcript

(*Am J Surg Pathol* 2018;42:1182–1189)

The importance of recurrent chromosomal translocations as uniquely diagnostic and as oncogenic drivers for sarcomas has been well established.¹ Recently fusion events have also become central to the characterization of many salivary gland tumors, including clear cell carcinoma (CCC, also referred to as hyalinizing clear cell carcinoma).^{2–4}

CCC is a low-grade malignant tumor, with the majority arising in minor salivary glands of the head and neck but also reported in association with other submucosal glands.^{5–8} Histologically CCC shows nests and cords of clear cells with monomorphic basophilic nuclei in a background of heavily hyalinized stroma. Immunophenotypically it has similarities to squamous cell carcinoma and mucoepidermoid carcinoma (MEC), with positive immunostaining for high-molecular-weight keratins and p63 and negative immunostaining for markers of myoepithelial differentiation. The distinction from other tumors of salivary gland with clear cell morphology can be challenging, particularly MEC. However, expression of an *EWSR1-ATF1* fusion oncogene has recently been characterized in over 80% of cases of CCC, and the diagnosis can rely upon identification of the same.^{8–11}

Partner genes involved in recurrent chromosomal translocations are known to be promiscuous, particularly fusion genes involving *EWSR1* and related TET gene family members.^{1,12} We describe 3 tumors with unusual clear cell morphology originally diagnosed as MEC. A commercially available anchored multiplex polymerase chain reaction (AMP) targeted panel was utilized to uncover a novel *EWSR1-CREM* gene fusion in all 3 cases, confirming a diagnosis of CCC of salivary gland.¹³

From the *Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of British Columbia; ||B.C. Cancer Agency; ‡‡Department of Anatomical Pathology, Vancouver General Hospital; ¶Anatomic Pathology St. Paul's Hospital, Vancouver, BC, Canada; #Department of Pathology, Beaumont Hospital and the Royal College of Surgeons, Dublin, Ireland; **ArcherDX Inc., Boulder, CO; †Department of Pathology, Faculty of Medicine in Plzen, Charles University; ‡CO Biopic Laboratory Ltd; §Czech Republic Biopic Laboratory, Ltd, Molecular Pathology Laboratory, Plzen, Czechia; and ††Czech Republic Medicyt Ltd, Kosice, Slovak Republic.

Presented at the USCAP Annual Meeting (case 1), March 4–10, 2017 (poster 1295).

Conflicts of Interest and Source of Funding: J.D.H. and B.A.K. are salaried employees of ArcherDX Inc. and shareholders of ArcherDX Inc. The remaining authors have disclosed that they have no significant relationships with, or financial interest in, any commercial companies pertaining to this article.

Correspondence: Tony L. Ng, MD, PhD, Division of Anatomical Pathology, Vancouver General Hospital, 910 W. 10th Ave., Vancouver, BC, Canada V5Z 1M9 (e-mail: tony.ng@vch.ca).

Copyright © 2018 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

TABLE 1. Clinical and Pathologic Characteristics

	Case 1	Case 2	Case 3
Age (y)/sex	68/F	75/F	62/M
Tumor location	Left base of tongue	Lower lobe of lung	Nasopharynx
Tumor size (mm)	30	9	10
Initial treatment	Excisional biopsy with positive margins	Resection of the lower lobe of lung, with clear margins	Excisional biopsy with positive margins
Original diagnosis of submitting pathologist	Mucoepidermoid carcinoma	Mucoepidermoid carcinoma	Mucoepidermoid carcinoma
Histochemistry	Focal positive for PAS-D	Focal positive for PAS-D	Focal positive for PAS-D
Immunohistochemistry	CK5, p63 positive (S-100, SMA negative)	CK7, p63, CK14 positive (S-100, SOX10, DOG1 negative)	CK7, p63, CK14 positive (S-100, SOX10 negative)
Initial FISH	<i>MAML2</i> break negative <i>EWSR1</i> rearrangement, <i>ATF1</i> intact	<i>MAML2</i> break negative <i>EWSR1</i> rearrangement	<i>MAML2</i> break negative <i>EWSR1</i> rearrangement
Initial RT-PCR	<i>CRTC1-MAML2</i> ⁻ <i>CRTC3-MAML2</i> ⁻	<i>CRTC1-MAML2</i> ⁻ <i>CRTC3-MAML2</i> ⁻	<i>CRTC1-MAML2</i> ⁻ <i>CRTC3-MAML2</i> ⁻
Follow-up	Transoral robotic surgery tumor bed reexcision and left level II-III lymph node dissection, all negative for residual tumor; no evidence of disease at 18 mo postsurgery	No evidence of disease at 8 mo postsurgery	No evidence of disease at 5 mo postsurgery

F indicates female; M, male; PAS-D, Periodic-acid-Schiff/Diastase.

MATERIALS AND METHODS

Case Selection

Three cases encountered by the authors (T.L.N., M.M.H., A.S.) in subspecialty consult practice which were originally classified as MEC but with unusual morphology were tested for *EWSR1-ATF1* and *CRTC1/3-MAML2* fusions by either fluorescence in situ hybridization (FISH) or reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). All 3 cases were negative for these fusions by RT-PCR or showed only an *EWSR1* rearrangement by FISH with negative *ATF1* break-apart FISH. The histories were retrieved from medical records and all available pathologic material was reviewed. The clinical and pathologic results are summarized in Table 1, including immunohistochemistry, FISH, and RT-PCR. Surgical pathology specimens were routinely processed by the originating hospital laboratories.

Immunohistochemistry

For case 1, 4- μ m-thick sections were cut from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) blocks and mounted on positively charged slides (FLEX IHC microscopic slides; Dako, Agilent, Santa Clara, CA). Sections were processed on a BenchMark XT (Ventana Medical System, Tucson, AZ), deparaffinized and then subjected to heat-induced epitope retrieval by immersion in a CCI solution at pH 8.6 at 95°C. The bound antibodies were visualized using the ultraView Universal DAB Detection Kit (Roche). The slides were counterstained with Mayer's hematoxylin. For cases 2 and 3, 4- μ m-thick sections were cut from paraffin blocks and mounted on positively charged slides (TOMO; Matsunami Glass IND, Japan). Sections were processed on a BenchMark ULTRA (Ventana), deparaffinized and then subjected to heat-induced epitope retrieval by immersion in a CCI solution at pH 8.6 at 95°C. The bound antibodies were visualized using the ultraView Universal DAB Detection Kit (Roche) and ultraView

Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit (Roche). The slides were counterstained with Mayer's hematoxylin. For all immunohistochemistry appropriate positive and negative controls were employed. All primary antibodies used are summarized in Table 2.

Nucleic Acid Extraction

For case 1 total RNA was purified from two 30- μ m-thick sections from a FFPE tissue block of tumor with the ReliaPrep FFPE Total RNA Miniprep system (Promega) according to the manufacturer's instructions, and without DNase treatment. For cases 2 and 3 total RNA was purified from two 10- μ m-thick FFPE sections using Formapure kit (Beckman Coulter, Brea, CA) according to the manufacturer's instructions. RNA quantity and quality was determined by Qubit RNA HS assay (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) and Agilent RNA Nano assay (Agilent Technologies), respectively.

AMP Assay

For case 1, a cDNA library targeted for sarcoma fusion-containing genes (Archer Sarcoma Panel; ArcherDX Inc.,

TABLE 2. Antibodies Used for Immunohistochemical Study

Antibody Specificity	Clone	Dilution	Source
S-100 (case 1)	Polyclonal	1:8000	Dako
S-100 (cases 2, 3)	Polyclonal	RTU	Ventana
CK7	OV-TL 12/30	1:200	Dako Cytomation
CK5	XM86	1:100	Novocastra
SMA	1A4	1:400	Dako
Ki-67	30-9	RTU	Ventana
p63 (case 1)	EPR5701	1:2000	Epitomics
p63 (cases 2, 3)	4A4	RTU	Ventana
DOG1	SP31	RTU	Cell Marque
SOX10	Polyclonal	1:100	Cell Marque

CCI indicates EDTA buffer, pH 8.6; RTU, ready to use (prediluted).

Boulder, CO) was prepared according to Archer Universal RNA Reagent Kit version 2 for Illumina-8 protocol (revision C). Briefly, double-stranded cDNA was prepared from 150 ng of total RNA with random hexamer oligonucleotides. After end repair/dA-tailing, the cDNA was barcoded by ligation with Archer MBC Adapters for Illumina (ArcherDX Inc.). The barcoded cDNA library was enriched with 2 rounds of nested PCR, 20 cycles each at 65°C annealing temperature, with Archer FusionPlex Sarcoma gene panel-specific primers and nested universal primers to the Archer MBC Adapter for Illumina (ArcherDX Inc.). The cDNA was purified with AMPure XP Beads (Beckman Coulter, Brea, CA) between each step starting from the end repair/dA-tailing to after the second round of targeted PCR. The barcoded, enriched libraries were quantified and diluted according to the KAPA Biosystems Library Quantification kit for Illumina (catalogue number KK4824, D-Mark Biosciences). Eight barcoded libraries (10pM each) were pooled and combined with PhiX for a final loading pool of 10pM library+10% PhiX. The libraries were analyzed on an Illumina MiSeq using a MiSeq version 2 300 cycle reagent kit (Illumina) according to the manufacturer's instructions. The resulting FASTQ files were uploaded to the Archer Analysis Pipeline (<http://archer.archerdx.com>) and analyzed for RNA SNP/InDel and RNA fusions with FusionFlex Sarcoma Panel version 1 targets on an Illumina paired platform. For case 2 and 3 an equivalent assay (Fusion Plex Solid Tumor kit, ArcherDX Inc.) was used according to the manufacturer's instructions (version of the protocol LA135.F).

RT-PCR and Sanger Sequencing

The AMP assay results were validated by RT-PCR to detect *EWSRI-CREM* fusion products. For case 1 first strand cDNA was prepared from 500 ng of total RNA with 250 ng random hexamer oligonucleotides and 200 units superscript IV reverse transcriptase (Life Technologies, Grand Island, NY) in a 20 µL reaction as per the standard Superscript IV protocol. PCR reaction for case 1 was 20 µL reaction with 2 µL first strand cDNA, 35 cycles at a 57°C annealing temperature with Platinum DNA Taq Polymerase (ThermoFisher Scientific) and the primers listed in Table 3 under normal PCR conditions (1x PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂). The resulting RT-PCR amplicons were gel purified

(QIAquick Gel Extraction Kit; Qiagen). The purified RT-PCR amplicons (15 nM) were confirmed by Sanger sequencing. Case 2 and 3 were validated similarly by RT-PCR using Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Pleasanton, CA). PCR was performed using HotStarTaq Master Mix (Qiagen, Germantown, MD), the primers listed in Table 3 and the reaction was run at an annealing temperature of 60°C for 40 cycles. PCR products were confirmed by Sanger sequencing.

Fluorescence In Situ Hybridization

Fluorescent in situ hybridization (FISH) was performed on unstained formalin-fixed and paraffin-embedded tissue sections from relevant tissue sections with the area for analysis identified by a pathologist and prepared by standard protocol for probe application. Dual color, break-apart probes to *EWSRI* (22q12, Vysis), *CREM* (10p11.21, SureFISH Agilent), and *ATFI* (12q13, in-house BC Cancer Agency) were used under standard conditions. Analysis was performed on ~200 nuclei on a fluorescence microscope and scored independently in the targeted region by 2 technicians.

RESULTS

Clinical Features and Histopathology

The clinical characteristics of the three cases presenting in the base of tongue (case 1), lower lobe of lung (case 2) and nasopharynx (case 3) are presented in Table 1. In cases 1 and 3, the surgical margins were positive due to fragmented tissue material provided by probatory excision. For the lung tumor (case 2) clinical examination and investigations at the time of diagnosis excluded the possibility of other primary sites (including head and neck) with metastasis to the lung and it was resected with clear surgical margins.

Histologically, all 3 cases showed similar features of an infiltrative tumor with cells arranged in sheets, nests, cords and trabeculae with intervening hyalinized eosinophilic stroma and lymphocytic infiltrate (Fig. 1). The cells were low-grade with variably clear to lightly eosinophilic cytoplasm and monomorphic basophilic nuclei. There were no glandular areas, epidermoid areas, or keratinization. Focal necrosis (Fig. 1H) and lymphovascular invasion was seen in case 3. Perineural invasion was not present in any case. In all cases, focal mucinous differentiation was demonstrated with Periodic-acid-Schiff/Diastase staining (Figs. 1C, D inset, G). Immunohistochemistry in all 3 cases was positive for p63 (Fig. 1A inset) and negative for S-100. Case 2, the lung tumor, was also tested with a large immunohistochemistry panel (details not included) to exclude other possible primary and metastatic tumors. In all cases, a primary diagnosis of MEC was suspected based on histomorphology and immunoprofile.

Fluorescence In Situ Hybridization

In case 1, the base of tongue tumor, the *EWSRI* probe showed 2 abnormal patterns. In 62% of the nuclei there was a typical *EWSRI* rearranged pattern with one fused *EWSRI*

TABLE 3. Primers Used for RT-PCR in This Study

	Primers	Sequence
Case 1	<i>EWSRI</i> exon 14 (NM_013986.3)	5'-AAGAAGCCTCCAAT GAACAGTA-3'
	<i>CREM</i> exon 5 (NM_001267562.1)	5'-CTGATTGTGCTGC GTACTGTA-3'
Case 2	<i>EWSRI</i> exon 14 (NM_013986.3)	5'-ACAGTATGCGG GGTGGTCT-3'
	<i>CREM</i> exon 6 (NM_001267562.1)	5'-CTGTGGCAAAGCA GCAGTAG-3'
Case 3	<i>EWSRI</i> exon 11 (NM_013986.3)	5'-CCATGGATGAAG GACCAGAT-3'
	<i>CREM</i> exon 6 (NM_001267562.1)	5'-TTTGCCTGTT GCTTCTCTG-3'

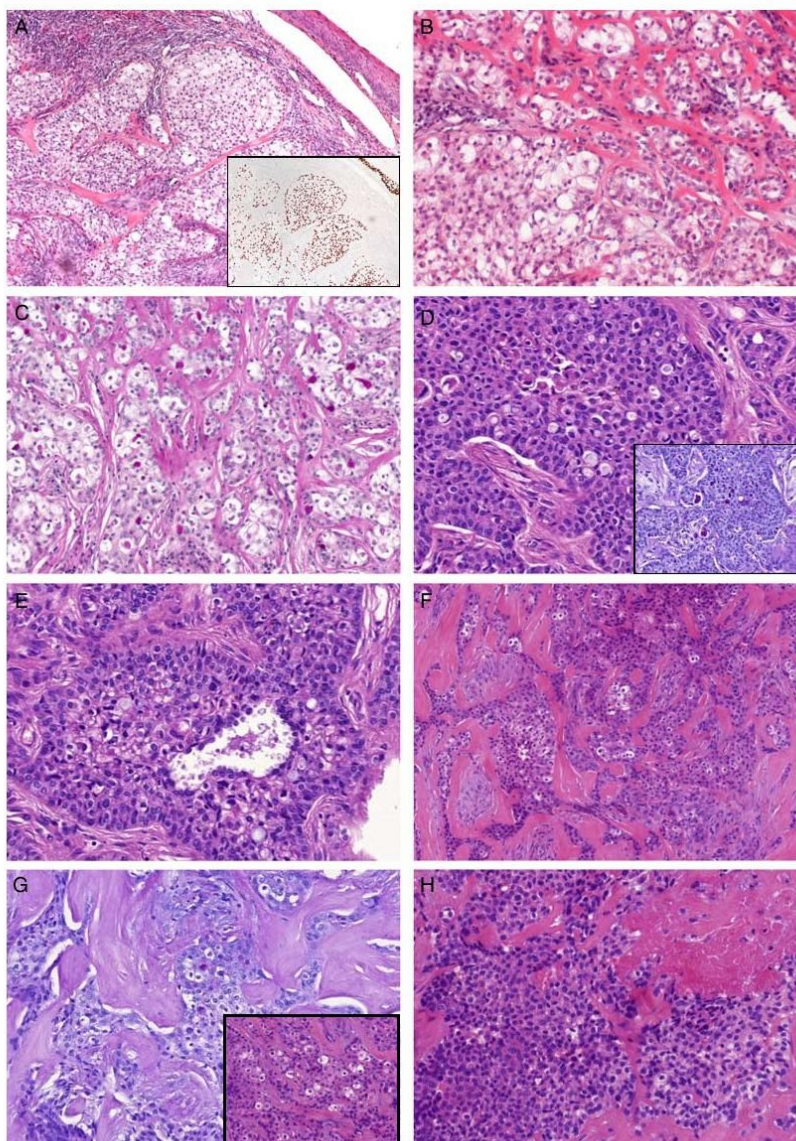


FIGURE 1. Histologic and immunohistochemical features of clear cell carcinoma. A, Case 1 shows infiltrating tumor in hyalinized stroma with associated lymphocytic reaction; tumor cells are p63 positive (inset). B, Case 1, sheets and nests of tumor cells in hyalinized stroma. C, Case 1, focal cells with cytoplasmic PAS-D positivity. D, Case 2 shows sheets of cells in a hyalinized stroma with focal clear cells; focal cytoplasmic PAS-D positivity (inset). E, Case 2, sheets of monomorphic cells with focal cystic change. F, Case 3 shows cords and nests of tumor cells in hyalinized stroma. G, Case 3 with focal cells with cytoplasmic PAS-D positivity; monomorphic variably clear cells in hyaline stroma (inset). H, Case 3 shows tumor with focal necrosis.

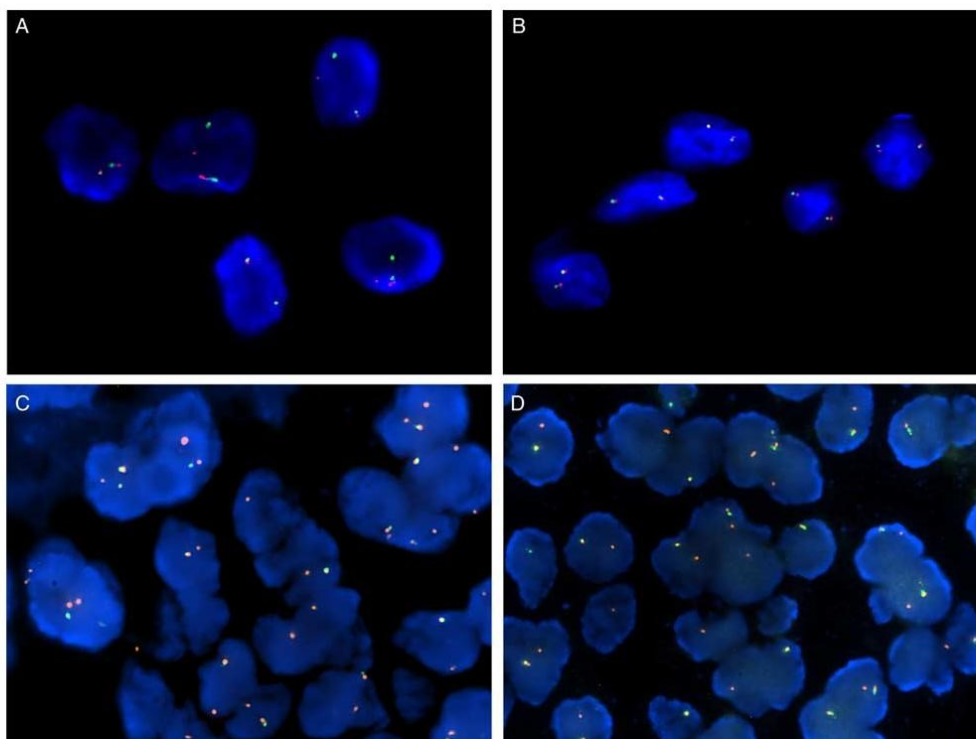


FIGURE 2. FISH results of clear cell carcinoma cases. A, Case 1, positive *EWSR1* break-apart. B, Case 1, negative *ATF1* break-apart. C, Case 2, positive *CREM* break-apart. D, Case 3, positive *CREM* break-apart.

signal and one signal each for the 3' and 5'*EWSR1* probes (Fig. 2A). An additional 11% of nuclei showed an unusual pattern, with one fused signal and a 3'*EWSR1* signal but loss of the 5'*EWSR1* signal. The *ATF1* probe was negative for rearrangement (Fig. 2B). Cases 2 and 3 were positive for rearrangement break-apart probe analyses in both *EWSR1* (84% and 82% of positive nuclei, respectively) (data not shown) and *CREM* (80% and 82% of positive nuclei, respectively) (Figs. 2C, D).

AMP Assay and Archer Pipeline Analysis

In each case the AMP assay analysis provided strong evidence of an in-frame fusion between *EWSR1* and *CREM* (Figs. 3A–C). Case 1 showed fusion of *EWSR1* exon 14 (NM_013986.3) with *CREM* exon 6 (NM_001267562.1) and fusion of *EWSR1* exon 14 (NM_013986.3) with *CREM* exon 5 (NM_001267562.1). Case 2 also showed fusion of *EWSR1* exon 14 (NM_013986.3) with *CREM* exon 6 (NM_001267562.1). Case 3 showed fusion in *EWSR1* exon 11 (NM_013986.3) with *CREM* exon 6 (NM_001267562.1). All 3 fusions were in-frame, and contained the complete *EWSR1* transcription activating domain. No other gene

alterations relating to the targeted genes in the panels were detected in any of the 3 cases.

RT-PCR and Sanger Sequencing

In Case 1 the fusion of the end of *EWSR1* exon 14 to the start of *CREM* exon 5 and in Case 3 the fusion of the end of *EWSR1* exon 11 to the start of *CREM* exon 6 were confirmed with RT-PCR and Sanger sequencing (Fig. 3D). In case 2 we were not able to produce a specific PCR product for subsequent sequencing.

DISCUSSION

Three cases of clear cell tumors which were negative for *CRTC1-MAML2/CRTC3-MAML2* fusions by RT-PCR or negative for *ATF1* rearrangement with FISH were tested using AMP. We have identified a novel *EWSR1-CREM* fusion gene in all 3 of these cases of CCC of salivary gland. The fusions were confirmed by at least one different method (case 2—FISH), or 2 methods (case 1 and Case 3—FISH and RT-PCR). To date, *EWSR1-ATF1* has been the only fusion identified in all reported fusion-positive cases of CCC.^{9,11} In the subspecialty consult practice of one of the authors (A.S.)

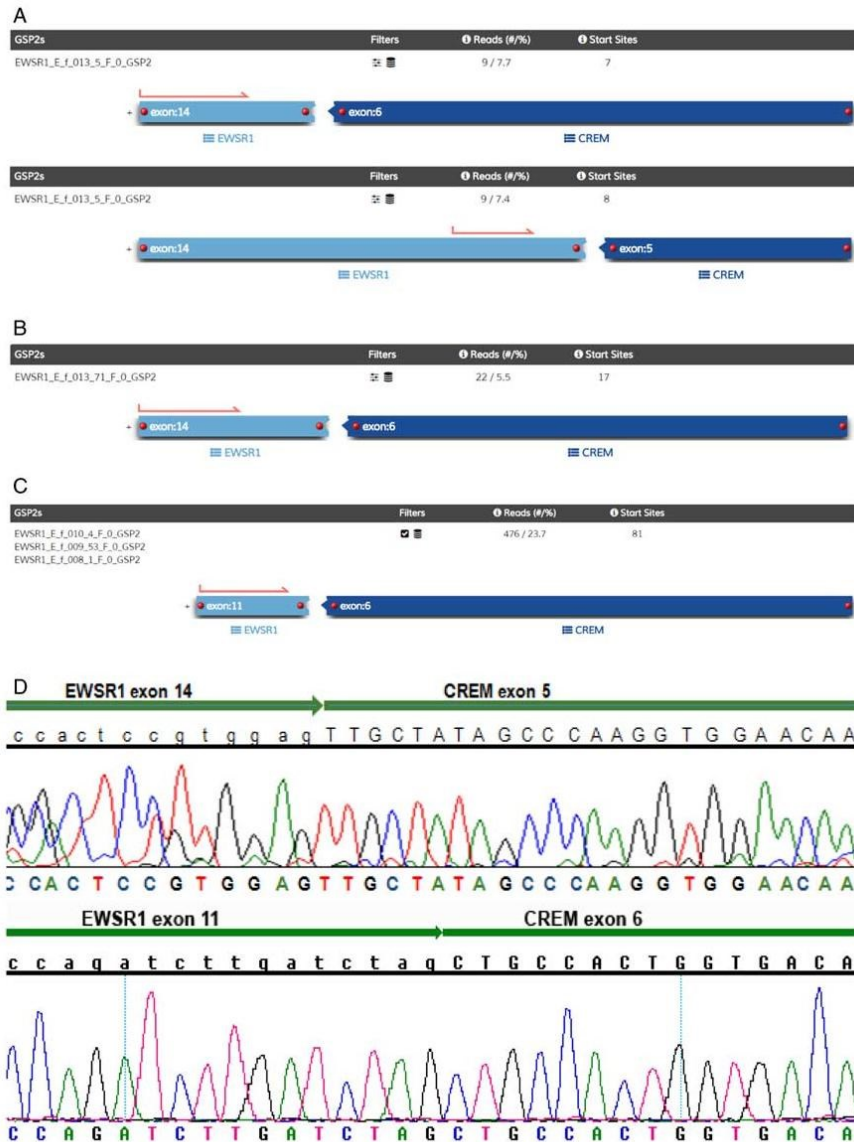


FIGURE 3. Archer AMP Assay Pipeline Analysis and Sanger sequencing. A, Case 1, strong evidence of fusion of *EWSR1* exon 14 with *CREM* exon 6 and *EWSR1* exon 14 with *CREM* exon 5. B, Case 2, strong evidence of fusion of *EWSR1* exon 14 with *CREM* exon 6. C, Case 3, strong evidence of fusion of *EWSR1* exon 11 with *CREM* exon 6. D, Cases 1 and 3, Sanger sequencing.

these 3 cases are the only ones identified to have the alternative *EWSR1-CREM* fusion, with all 19 other cases of hyalinizing clear cell carcinoma diagnosed between the years 2000 and 2017 having *EWSR1-ATF1*. *EWSR1-ATF1* fusions also occur

in an interesting spectrum of tumors including clear cell odontogenic carcinoma, angiomatoid fibrous histiocytoma, primary pulmonary myxoid sarcoma, clear cell sarcoma and clear cell sarcoma-like tumor of the GI tract.¹⁴⁻¹⁷

Fusion genes are known to be promiscuous and the finding of variant fusions within a tumor type is clinically important when genes are members of the same families and yield variant fusion transcripts closely resembling the prototypical fusion transcript.^{1,12} In our 3 cases *CREM* is substituted for *ATF1*. The cAMP response element binding protein (*CREB*) family of transcription factors is activated by serine threonine kinases and binds to cAMP response element sequences in target gene promoters. It includes *CREB* itself, activating transcription factor 1 (*ATF1*), and the gene involved in our novel fusions: cAMP response element modulator (*CREM*).^{18,19}

To our knowledge there are no other reports of CCC with *EWSR1-CREM* or alternate fusions reported. In fact there are few reports of this specific fusion pair in any tumors to date. Recently a group of myxoid mesenchymal tumors with *EWSR1* and *CREB*-family fusions have been described with one perirectal tumor showing an *EWSR1-CREM*.^{20,21} There is also a single report of an *EWSR1-CREM* fusion in a case classified as melanoma, but the presence of this fusion raises the possibility that this would be better classified as a clear cell sarcoma of soft tissue.²²

Identification of this *CREM* fusion with homology to the characteristic *ATF1* fusion was important in accurately classifying these lesions with direct impact on clinical decision making. In all three of these cases the original proposed diagnosis was MEC (MEC) and certainly a wide spectrum of salivary glandular neoplasms was considered. The differential diagnosis is a challenging one and cases of CCC may be mischaracterized as the more familiar MEC as they can both have similar clinical presentation, architecture, clear cells, presence of mucinous differentiation and immunoprofile.^{23,24} This is a critical distinction as a solid nested MEC would be classified as high-grade with an expected worse prognosis and more aggressive treatment. CCC is considered a low-grade tumor. The identification of the *EWSR1-CREM* fusion in each of these three cases confirmed the diagnosis of CCC. Mucin is known to occur in up to 50% of cases of CCC.^{6,9} Lack of myoepithelial differentiation by immunohistochemistry excluded clear cell myoepithelial tumors which can also show *EWSR1* translocations.²⁵

CCC is considered a low-grade tumor with good prognosis but there are reports of high-grade transformation and late recurrences.^{26,27} All 3 of our cases have shown clinical behavior in keeping with their low-grade classification with patients well at 18 (case 1), 8 (case 2), and 5 months (case 3) (Table 1). At this time there have been no reports of prognosis with respect to molecular factors.⁹

In cases where the differential diagnosis includes tumors known to harbor recurrent fusions, lack of a tool to identify variant fusions may lead to misdiagnosis and lost opportunity to expand on the spectrum of known recurrent translocations in these tumors. Currently diagnosis of these fusions in the clinical setting largely relies on the well-established methods of FISH or RT-PCR.^{17,28} Novel or unexpected fusion variants may be interpreted as negative

by these methods as they are designed to detect either one partner gene or one specific fusion isoform.¹⁰ AMP is a next-generation sequencing-based technique which both detects and identifies fusions associated with neoplasms without requiring knowledge of fusion partners or breakpoints, with the capability of discovering these novel or unexpected fusion gene variants.¹³ AMP has proven value in both gene fusion detection for diagnosis and to uncover fusions involving unknown gene partners.²⁹⁻³¹

We have identified 3 cases of CCC where identification of the *EWSR1-CREM* gene fusion was central to separating this entity from its mimics, especially MEC. When morphology suggests that a fusion associated neoplasm is a possibility we have shown that a targeted next-generation sequencing-based assay such as AMP has the capability of discovering novel gene fusions which conventional FISH or RT-PCR may fail to identify. Although *EWSR1-ATF1* remains the most common fusion gene in CCC, these 3 cases with *EWSR1-CREM* fusion highlight the fact that similar to other translocation-associated tumors a subset of CCC cases will express variant fusion genes. Molecular diagnostic assays which allow for detection of such alternative fusions will be important in the ongoing characterization of these tumors.

REFERENCES

1. Taylor BS, Barretina J, Maki RG, et al. Advances in sarcoma genomics and new therapeutic targets. *Nat Rev Cancer*. 2011;11:541-557.
2. Skalova A, Stenman G, Simpson RHW, et al. The role of molecular testing in the differential diagnosis of salivary gland carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2017;42:e11-e27.
3. Skalova A, Michal M, Simpson RH. Newly described salivary gland tumors. *Mod Pathol*. 2017;30:S27-S43.
4. Simpson RH, Skalova A, Di Palma S, et al. Recent advances in the diagnostic pathology of salivary carcinomas. *Virchows Arch*. 2014;465:371-384.
5. Ceballos Saenz C, Argyris PP, Manivel JC, et al. Nasopharyngeal hyalinizing clear cell carcinoma: report of the histopathologic features of a case showing *EWSR1* rearrangements by FISH and literature review. *Int J Surg Pathol*. 2014;22:667-672.
6. Hsieh MS, Wang H, Lee YH, et al. Re-evaluation of MAML2 fusion-negative mucoepidermoid carcinoma: a subgroup being actually hyalinizing clear cell carcinoma of the salivary gland with *EWSR1* translocation. *Hum Pathol*. 2016;61:9-18.
7. Weinreb I. Hyalinizing clear cell carcinoma of salivary gland: a review and update. *Head Neck Pathol*. 2013;7(suppl 1):S20-S29.
8. Shah AA, LeGallo RD, van Zante A, et al. *EWSR1* genetic rearrangements in salivary gland tumors: a specific and very common feature of hyalinizing clear cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2013;37:571-578.
9. Tanguay J, Weinreb I. What the *EWSR1-ATF1* fusion has taught us about hyalinizing clear cell carcinoma. *Head Neck Pathol*. 2013;7:28-34.
10. Nakano T, Yamamoto H, Nishijima T, et al. Hyalinizing clear cell carcinoma with *EWSR1-ATF1* fusion gene: report of three cases with molecular analyses. *Virchows Arch*. 2015;466:37-43.
11. Antonescu CR, Katabi N, Zhang L, et al. *EWSR1-ATF1* fusion is a novel and consistent finding in hyalinizing clear-cell carcinoma of salivary gland. *Genes Chromosomes Cancer*. 2011;50:559-570.
12. Antonescu CR, Dal Cin P. Promiscuous genes involved in recurrent chromosomal translocations in soft tissue tumours. *Pathology*. 2014;46:105-112.
13. Zheng Z, Liebers M, Zhelyazkova B, et al. Anchored multiplex PCR for targeted next-generation sequencing. *Nat Med*. 2014;20:1479-1484.

14. Loyola AM, Cardoso SV, de Faria PR, et al. Clear cell odontogenic carcinoma: report of 7 new cases and systematic review of the current knowledge. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2015;120:483–496.
15. Bilodeau EA, Weinreb I, Antonescu CR, et al. Clear cell odontogenic carcinomas show EWSR1 rearrangements: a novel finding and a biological link to salivary clear cell carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2013;37:1001–1005.
16. Thway K, Fisher C. Tumors with EWSR1-CREB1 and EWSR1-ATF1 fusions: the current status. *Am J Surg Pathol*. 2012;36:e1–e11.
17. Patel RM, Downs-Kelly E, Weiss SW, et al. Dual-color, break-apart fluorescence in situ hybridization for EWS gene rearrangement distinguishes clear cell sarcoma of soft tissue from malignant melanoma. *Mod Pathol*. 2005;18:1585–1590.
18. De Cesare D, Sassone-Corsi P. Transcriptional regulation by cyclic AMP-responsive factors. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 2000;64:343–369.
19. Altarejos JY, Montminy M. CREB and the CREB co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;12:141–151.
20. Kao YC, Sung YS, Zhang L, et al. EWSR1 fusions with CREB family transcription factors define a novel myxoid mesenchymal tumor with predilection for intracranial location. *Am J Surg Pathol*. 2016;41:482–490.
21. Bale TA, Oviedo A, Kozakewich H, et al. Intracranial myxoid mesenchymal tumors with EWSR1-CREB family gene fusions: myxoid variant of angiomatoid fibrous histiocytoma or novel entity? *Brain Pathol*. 2017;28:183–191.
22. Giacomini CP, Sun S, Varma S, et al. Breakpoint analysis of transcriptional and genomic profiles uncovers novel gene fusions spanning multiple human cancer types. *PLoS Genet*. 2013;9:e1003464.
23. Said-Al-Naief N, Klein MJ. Clear cell entities of the head and neck: a selective review of clear cell tumors of the salivary glands. *Head Neck Pathol*. 2008;2:111–115.
24. Jain A, Shetty DC, Juneja S, et al. Molecular characterization of clear cell lesions of head and neck. *J Clin Diagn Res*. 2016;10:ze18–ze23.
25. Skalova A, Weinreb I, Hycza M, et al. Clear cell myoepithelial carcinoma of salivary glands showing EWSR1 rearrangement: molecular analysis of 94 salivary gland carcinomas with prominent clear cell component. *Am J Surg Pathol*. 2015;39:338–348.
26. Yamashita K, Kawakami F, Nakashima Y, et al. Clear cell carcinoma of the minor salivary gland: an autopsy case with multiple metastases 29 years after the initial surgery and a review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009;107:819–825.
27. Jin R, Craddock KJ, Irish JC, et al. Recurrent hyalinizing clear cell carcinoma of the base of tongue with high-grade transformation and EWSR1 gene rearrangement by FISH. *Head Neck Pathol*. 2012;6:389–394.
28. Coindre JM, Hostein I, Terrier P, et al. Diagnosis of clear cell sarcoma by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of paraffin embedded tissues: clinicopathologic and molecular analysis of 44 patients from the French sarcoma group. *Cancer*. 2006;107:1055–1064.
29. Li X, Anand M, Haimes JD, et al. The application of next-generation sequencing-based molecular diagnostics in endometrial stromal sarcoma. *Histopathology*. 2016;69:551–559.
30. Badar T, Johnson L, Trifilo K, et al. Detection of novel t(12;17)(p12;p13) in relapsed refractory acute myeloid leukemia by anchored multiplex PCR (AMP)-based next-generation sequencing. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2017. [Epub ahead of print].
31. Amatu A, Somaschini A, Cerea G, et al. Novel CAD-ALK gene rearrangement is druggable by entrectinib in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2015;113:1730–1734.

4. Další publikované práce

Šteiner P, Pavelka J, Vaneček T, **Miesbauerová M**, Skálová A. Molecular methods for detection of prognostic and predictive markers in diagnosis of adenoid cystic carcinoma of the salivary gland origin. *Cesk Patol*. 2018 Summer;54(3):132-136.

Michal M, Michal M, **Miesbauerova M**, Hercogova J, Skopalikova B, Kazakov DV (2016): Penile Analogue of Stratified Mucin-Producing Intraepithelial Lesion of the Cervix: The First Described Case. A Diagnostic Pitfall. *Am J Dermatopathol*. 05/2016; 38(5):e64-e67

Michalova K, Kazakov DV, Michal M, Hadravsky L, Kacerovska D, Rychly B, **Miesbauerova M**, Michal M. Differentiated squamous intraepithelial lesion (dSIL)-like changes in the epidermis overlying anogenital melanocytic nevi. A diagnostic pitfall. *Ann Diagn Pathol*. 2017 Feb;26:43-46

Peckova K, Michal M, Hadravsky L, Suster S, Damjanov I, **Miesbauerova M**, Kazakov DV, Vernerova Z, Michal M. Littoral cell angioma of the spleen: a study of 25 cases with confirmation of frequent association with visceral malignancies. *Histopathology*. 2016 Nov;69(5):762-774

Skalova A, Sar A, Laco J, Metelkova A, **Miesbauerova M**, Steiner P, Svajdler M, Michal M. The role of SATB2 as a Diagnostic Marker of Sinonasal Intestinal-type Adenocarcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2018;26:140-146

Hadravská Š., Dubová M., **Miesbauerová M.**, Mukenšabl P., Daum O., Mádle A., Smetana K. Hamartom ze zralých kardiomyocytů. Pitevni kazuistika. *Cesk Patol*. 2017;53(4):185–187

Michalova K, Michal M, Sedivcova M, Kazakov DV, Bacchi C, Antic T, **Miesbauerova M**, Hes O, Michal M. Solid pseudopapillary neoplasm (SPN) of the testis: Comprehensive mutational analysis of 6 testicular and 8 pancreatic SPNs. *Ann Diagn Pathol*. 2018 Apr 20;35:42-47.

Ptáková N, **Miesbauerová M**, Košťun J, Grossmann P, Šidlová H, Pavelka J, Presl J, Alaghebandan R, Bouda J, Ondič O. Immunohistochemical and selected genetic reflex testing of all uterine leiomyosarcomas and STUMPs for ALK gene rearrangement may provide an effective screening tool in identifying uterine ALK-rearranged mesenchymal tumors. *Virchows Arch*. 2018 Nov;473(5):583-590.

Zuzana Štiková, Nikola Ptáková, **Markéta Horáková**, Jan Košťun, Ondrej Ondič. Inflamatorní myofibroblastický tumor dělohy. Pitevní kazuistika. *Cesk Patol*. [accepted]

5. Použitá literatura

1) International Agency for Research. *Global Cancer Observatory* [online]. c2019. Dostupné z: <https://gco.iarc.fr/>.

2) Lee SC. *Medscape Pathology & Lab Medicine* [online]. c2017. Dostupné z: <https://emedicine.medscape.com/article/852373-overview>.

3) Baloch Z, Field AS, (Eds). Chapter 1. In: Faquin W, Rossi ED, editors: *The Milan System for Reporting Salivary Gland Cytopathology*. London: Springer, 2018, pp 1-8. ISBN 978-3-319-71285-7.

4) Gnepp DR, Schroeder W, Heffner D. Synchronous tumors arising in a single major salivary gland. *Cancer*. 1989 Mar 15;63(6):1219-24.

5) Auclair PL, Langloss JM, Weiss SW, Corio RL. Sarcomas and sarcomatoid neoplasms of the major salivary gland regions. A clinicopathologic and immunohistochemical study of 67 cases and review of the literature. *Cancer*. 1986 Sep 15;58(6):1305-15.

6) Gleeson MJ, Bennett MH, Cawson RA. Lymphomas of salivary glands. *Cancer*. 1986 Aug 1;58(3):699-704.

7) Anacak Y, Miller RC, Constantinou N, Mamusa AM, Epelbaum R, Li Y, Caldusch AL, Kowalczyk A, Weber DC, Kadish SP, Bese N, Poortmans P, Kamer S, Ozsahin M. Primary mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma of the salivary glands: a multicenter Rare Cancer Network study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2012 Jan 1;82(1):315-20.

- 8) Seifert G, Hennings K, Caselitz J. Metastatic tumors to the parotid and submandibular glands--analysis and differential diagnosis of 108 cases. *Pathol Res Pract.* 1986 Dec;181(6):684-92.
- 9) Shah JP, Kraus DH, Dubner S, Sarkar S. Patterns of regional lymph node metastases from cutaneous melanomas of the head and neck. *Am J Surg.* 1991 Oct;162(4):320-3.
- 10) Brodsky G, Rabson AB. Metastasis to the submandibular gland as the initial presentation of small cell ("oat cell") lung carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1984 Jul;58(1):76-80.
- 11) Melnick SJ, Amazon K, Dembrow V. Metastatic renal cell carcinoma presenting as a parotid tumor: a case report with immunohistochemical findings and a review of the literature. *Hum Pathol.* 1989 Feb;20(2):195-7.
- 12) Wang H, Hoda RS, Faquin W, Rossi ED, Hotchandani N, Sun T, Pusztaszeri M, Bizzarro T, Bongiovanni M, Patel V, Jhala N, Fadda G, Gong Y. FNA biopsy of secondary nonlymphomatous malignancies in salivary glands: A multi-institutional study of 184 cases. *Cancer Cytopathol.* 2017 Feb;125(2):91-103.
- 13) Rabia AB, Ebru LS, Tuba K, Didar G, Gulhan O, Cengiz O. Warthin's tumor: an unknown pathogenesis: a neoplasm or a reactive hyperplasia? *Indian J Pathol Microbiol.* 2015 Jan-Mar;58(1):7-11.
- 14) Chan JK, Yip TT, Tsang WY, Poon YF, Wong CS, Ma VW. Specific association of Epstein-Barr virus with lymphoepithelial carcinoma among tumors and tumorlike lesions of the salivary gland. *Arch Pathol Lab Med.* 1994 Oct;118(10):994-7.

- 15) Mozaffari HR, Ramezani M, Janbakhsh A, Sadeghi M. Malignant Salivary Gland Tumors and Epstein-Barr Virus (EBV) Infection: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2017 May 1;18(5):1201-1206.
- 16) Duan Y, Zhang HZ, Bu RF. Correlation between cellular phone use and epithelial parotid gland malignancies. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2011 Sep;40(9):966-72.
- 17) Andersen LJ, Therkildsen MH, Ockelmann HH, Bentzen JD, Schiødt T, Hansen HS. Malignant epithelial tumors in the minor salivary glands, the submandibular gland, and the sublingual gland. Prognostic factors and treatment results. *Cancer*. 1991 Dec 1;68(11):2431-7.
- 18) American Society of Clinical Oncology. *Cancer.net* [online]. c02/2018. Dostupné z: www.cancer.net/cancer-types/salivary-gland-cancer/statistics.
- 19) Dušek L, Mužík J, Kubásek M, Koptíková J, Žaloudík J, Vyzula R. *Epidemiologie zhoubných nádorů v České republice* [online]. Masarykova univerzita, [2005], [cit. 2019-2-13]. Dostupný z: <http://www.svod.cz>. Verze 7.0 [2007], ISSN 1802 – 8861.
- 20) Whatley WS, Thompson JW, Rao B. Salivary gland tumors in survivors of childhood cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2006 Mar;134(3):385-8.
- 21) Fang QG, Shi S, Li ZN, Zhang X, Liu FY, Sun CF. Epithelial salivary gland tumors in children: a twenty-five-year experience of 122 patients. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2013 Aug;77(8):1252-4.

- 22) Vuhahula EA. Salivary gland tumors in Uganda: clinical pathological study. *Afr Health Sci.* 2004 Apr;4(1):15-23.
- 23) Toida M, Shimokawa K, Makita H, Kato K, Kobayashi A, Kusunoki Y, Hatakeyama D, Fujitsuka H, Yamashita T, Shibata T. Intraoral minor salivary gland tumors: a clinicopathological study of 82 cases. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2005 Jul;34(5):528-32. Epub 2005 Jan 24.
- 24) Subhashraj K. Salivary gland tumors: a single institution experience in India. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2008 Dec;46(8):635-8
- 25) Bjørndal K, Krogdahl A, Therkildsen MH, Overgaard J, Johansen J, Kristensen CA, Homøe P, Sørensen CH, Andersen E, Bundgaard T, Primdahl H, Lambertsen K, Andersen LJ, Godballe C. Salivary gland carcinoma in Denmark 1990-2005: outcome and prognostic factors. Results of the Danish Head and Neck Cancer Group (DAHANCA). *Oral Oncol.* 2012 Feb;48(2):179-85.
- 26) Buchner A, Merrell PW, Carpenter WM. Relative frequency of intra-oral minor salivary gland tumors: a study of 380 cases from northern California and comparison to reports from other parts of the world. *J Oral Pathol Med.* 2007 Apr;36(4):207-14.
- 27) Jones AV, Craig GT, Speight PM, Franklin CD. The range and demographics of salivary gland tumours diagnosed in a UK population. *Oral Oncol.* 2008 Apr;44(4):407-17.
- 28) Abrahão AC, Santos Netto Jde N, Pires FR, Santos TC, Cabral MG. Clinicopathological characteristics of tumours of the intraoral minor salivary glands in 170 Brazilian patients. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2016 Jan;54(1):30-4.

29) Gao M, Hao Y, Huang MX, Ma DQ, Chen Y, Luo HY, Gao Y, Cao ZQ, Peng X, Yu GY. Salivary gland tumours in a northern Chinese population: a 50-year retrospective study of 7190 cases. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2017 Mar;46(3):343-349.

30) Stárek I, Salzman R, Skálová A, Chovanec M, Gál P Zábrodský M, Školoudík L, Rotnág J, Pár I, Štrympl P. Doporučené postupy v diagnostice a léčbě nádorů příušní žlázy. *Otorinolaryng. a Foniat*. 2017, č. 3, s. 119–126.

31) Miesbauerová M, Kholová I, Skálová A: Minireview: Nový systém pro sjednocené hodnocení tenkojehlových aspiračních cytologií slinných žláz: Co nového přinesl „tzv. Milánský systém reportování“ do cytodiagnostiky lézí slinných žláz? *Cesk Patol*. 2019 Winter;55(1):61-65

32) Faquin W, Rossi ED, (Eds): *The Milan System for Reporting Salivary Gland Cytopathology*. 1st edition. London: Springer, 2018. ISBN 978-3-319-71285-7.

33) Song IH, Song JS, Sung CO, Roh JL, Choi SH, Nam SY, Kim SY, Lee JH, Baek JH, Cho KJ. Accuracy of Core Needle Biopsy Versus Fine Needle Aspiration Cytology for Diagnosing Salivary Gland Tumors. *J Pathol Transl Med*. 2015 Mar;49(2):136-43.

34) El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ, (Eds). Chapter 7: Tumours of salivary glands. In: *WHO Classification of Head and Neck Tumours*. 4th edition. Lyon, France: IARC, 2017, pp 159-202. ISBN 978-92-832-2438-9.

35) Brandwein-Gensler M, Bell D, Inagaki H. et al. Mucoepidermoid carcinoma. In: El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ (Eds): *WHO Classification of Head and Neck Tumours*. 4th edition. Lyon, France: IARC, 2017, pp 163-164. ISBN 978-92-832-2438-9.

- 36) Skálová A, Lehtonen H, von Boguslawsky K, Leivo I. Prognostic significance of cell proliferation in mucoepidermoid carcinomas of the salivary gland: clinicopathological study using MIB 1 antibody in paraffin sections. *Hum Pathol.* 1994 Sep;25(9):929-35.
- 37) Goode RK, Auclair PL, Ellis GL. Mucoepidermoid carcinoma of the major salivary glands: clinical and histopathologic analysis of 234 cases with evaluation of grading criteria. *Cancer.* 1998 Apr 1; 82(7):1217-24.
- 38) Brandwein MS, Ferlito A, Bradley PJ, Hille JJ, Rinaldo A. Diagnosis and classification of salivary neoplasms: pathologic challenges and relevance to clinical outcomes. *Acta Otolaryngol.* 2002 Oct; 122(7):758-64.
- 39) Nance MA, Seethala RR, Wang Y, Chiosea SI, Myers EN, Johnson JT, Lai SY. Treatment and survival outcomes based on histologic grading in patients with head and neck mucoepidermoid carcinoma. *Cancer.* 2008 Oct 15; 113(8):2082-9.
- 40) Raja R, Seethala. An Update on Grading of Salivary Gland Carcinomas. *Head Neck Pathol.* 2009 Mar; 3(1): 69–77. Published online 2009 Feb 25.
- 41) Hellquist HB, Skálová A (Eds). Chapter 7: Mucoepidermoid Carcinoma. In: *Histopathology of the Salivary Glands*. 1st edition. London: Springer, 2014, pp 181-220. ISBN 978-3-540-46915-5.
- 42) Bullerdiek J, Haubrich J, Meyer K, Bartnitzke S. Translocation t(11;19)(q21;p13.1) as the sole chromosome abnormality in a cystadenolymphoma (Warthin's tumor) of the parotid gland. *Cancer Genet Cytogenet.* 1988 Oct 1;35(1):129-32.

- 43) Nordkvist A, Gustafsson H, Juberg-Ode M, Stenman G. Recurrent rearrangements of 11q14-22 in mucoepidermoid carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 1994 Jun;74(2):77-83.
- 44) El-Naggar AK, Lovell M, Killary AM, Clayman GL, Batsakis JG. A mucoepidermoid carcinoma of minor salivary gland with t(11;19)(q21;p13.1) as the only karyotypic abnormality. *Cancer Genet Cytogenet*. 1996 Mar;87(1):29-33.
- 45) Tonon G, Modi S, Wu L, Kubo A, Coxon AB, Komiya T, O'Neil K, Stover K, El-Naggar A, Griffin JD, Kirsch IR, Kaye FJ. t(11;19)(q21;p13) translocation in mucoepidermoid carcinoma creates a novel fusion product that disrupts a Notch signaling pathway. *Nat Genet*. 2003 Feb;33(2):208-13. Epub 2003 Jan 21.
- 46) Fehr A, Röser K, Heidorn K, Hallas C, Löning T, Bullerdiek J. A new type of MAML2 fusion in mucoepidermoid carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2008 Mar;47(3):203-6.
- 47) Okumura Y, Miyabe S, Nakayama T, Fujiyoshi Y, Hattori H, Shimosato K, Inagaki H. Impact of CRTC1/3-MAML2 fusions on histological classification and prognosis of mucoepidermoid carcinoma. *Histopathology*. 2011 Jul;59(1):90-7.
- 48) Nakayama T, Miyabe S, Okabe M, Sakuma H, Ijichi K, Hasegawa Y, Nagatsuka H, Shimosato K, Inagaki H. Clinicopathological significance of the CRTC3-MAML2 fusion transcript in mucoepidermoid carcinoma. *Mod Pathol*. 2009 Dec;22(12):1575-81.
- 49) Seethala RR, Chiosea SI. MAML2 Status in Mucoepidermoid Carcinoma Can No Longer Be Considered a Prognostic Marker. *Am J Surg Pathol*. 2016 Aug;40(8):1151-3.

50) Jee KJ, Persson M, Heikinheimo K, Passador-Santos F, Aro K, Knuutila S, Odell EW, Mäkitie A, Sundelin K, Stenman G, Leivo I. Genomic profiles and CRTC1-MAML2 fusion distinguish different subtypes of mucoepidermoid carcinoma. *Mod Pathol.* 2013 Feb;26(2):213-22.

51) Wang K, McDermott JD, Schrock AB, Elvin JA, Gay L, Karam SD, Raben D, Somerset H, Ali SM, Ross JS, Bowles DW. Comprehensive genomic profiling of salivary mucoepidermoid carcinomas reveals frequent BAP1, PIK3CA, and other actionable genomic alterations. *Ann Oncol.* 2017 Apr 1;28(4):748-753.

52) Stenman G, Licitra L, Said-Al-Naief N et al. Adenoid cystic carcinoma. In: El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ (Eds): *WHO Classification of Head and Neck Tumours*. 4th edition. Lyon, France: IARC, 2017, pp 164-165. ISBN 978-92-832-2438-9.

53) Zdanowski R, Dias FL, Barbosa MM, Lima RA, Faria PA, Loyola AM, Nascimento Souza KC. Sublingual gland tumors: Clinical, pathologic, and therapeutic analysis of 13 patients treated in a single institution. *Head Neck.* 2011 Apr;33(4):476-81.

54) Yu T, Gao QH, Wang XY, Wen YM, Li LJ. Malignant sublingual gland tumors: a retrospective clinicopathologic study of 28 cases. *Oncology.* 2007;72(1-2):39-44.

55) Michaels L, Hellquist HB. Malignant epithelial neoplasms. In: *Ear, nose and throat histopathology*. 2nd edition. London: Springer, 2001, pp 491-524. ISBN 978-1-4471-3332-2.

56) Perzin KH, Gullane P, Clairmont AC. Adenoid cystic carcinomas arising in salivary glands: a correlation of histologic features and clinical course. *Cancer.* 1978 Jul;42(1):265-82.

- 57) Szanto PA, Luna MA, Tortoledo ME, White RA. Histologic grading of adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. *Cancer*. 1984 Sep 15;54(6):1062-9.
- 58) Hellquist HB, Skálová A (Eds). Chapter 8: Adenoid Cystic Carcinoma. In: *Histopathology of the Salivary Glands*. 1st edition. London: Springer, 2014, pp 221-260. ISBN 978-3-540-46915-5.
- 59) Amit M, Binenbaum Y, Trejo-Leider L, Sharma K, Ramer N, Ramer I, Agbetoba A, Miles B, Yang X, Lei D, Bjørndal K, Godballe C, Mücke T, Wolff KD, Eckardt AM, Copelli C, Sesenna E, Palmer F, Ganly I, Patel S, Gil Z. International collaborative validation of intraneural invasion as a prognostic marker in adenoid cystic carcinoma of the head and neck. *Head Neck*. 2015; 37(7): 1038-1045.
- 60) Holst VA, Marshall CE, Moskaluk CA, Frierson HF Jr. KIT protein expression and analysis of c-kit gene mutation in adenoid cystic carcinoma. *Mod Pathol*. 1999 Oct;12(10):956-60.
- 61) Aslan DL, Oprea GM, Jagush SM, Gulbahce HE, Adams GL, Gaffney PM, Savik K, Pambuccian SE. C-kit expression in adenoid cystic carcinoma does not have an impact on local or distant tumor recurrence. *Head Neck*. 2005 Dec;27(12):1028-34.
- 62) Persson M, Andrén Y, Mark J, Horlings HM, Persson F, Stenman G. Recurrent fusion of MYB and NFIB transcription factor genes in carcinomas of the breast and head and neck. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Nov 3;106(44):18740-4.
- 63) Mitani Y, Li J, Rao PH, Zhao YJ, Bell D, Lippman SM, Weber RS, Caulin C, El-Naggar AK. Comprehensive analysis of the MYB-NFIB gene fusion in salivary adenoid cystic carcinoma:

Incidence, variability, and clinicopathologic significance. *Clin Cancer Res.* 2010 Oct 1;16(19):4722-31.

64) Brill LB 2nd, Kanner WA, Fehr A, Andrén Y, Moskaluk CA, Löning T, Stenman G, Frierson HF Jr. Analysis of MYB expression and MYB-NFIB gene fusions in adenoid cystic carcinoma and other salivary neoplasms. *Mod Pathol.* 2011 Sep;24(9):1169-76.

65) West RB, Kong C, Clarke N, Gilks T, Lipsick JS, Cao H, Kwok S, Montgomery KD, Varma S, Le QT. MYB expression and translocation in adenoid cystic carcinomas and other salivary gland tumors with clinicopathologic correlation. *Am J Surg Pathol.* 2011 Jan;35(1):92-9.

66) Poling JS, Yonescu R, Subhawong AP, Sharma R, Argani P, Ning Y, Cimino-Mathews A. MYB Labeling by Immunohistochemistry Is More Sensitive and Specific for Breast Adenoid Cystic Carcinoma than MYB Labeling by FISH. *Am J Surg Pathol.* 2017 Jul;41(7):973-979.

67) Mitani Y, Liu B, Rao PH, Borra VJ, Zafereo M, Weber RS, Kies M, Lozano G, Futreal PA, Caulin C, El-Naggar AK. Novel MYBL1 gene rearrangements with recurrent MYBL1-NFIB fusions in salivary adenoid cystic carcinomas lacking t(6;9) translocations. *Clin Cancer Res.* 2016 Feb 1; 22(3): 725-733.

68) Persson M, Andrén Y, Moskaluk CA, Frierson HF Jr, Cooke SL, Futreal PA, Kling T, Nelander S, Nordkvist A, Persson F, Stenman G. Clinically significant copy number alterations and complex rearrangements of MYB and NFIB in head and neck adenoid cystic carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 2012 Aug;51(8):805-17.

69) Rettig EM, Talbot CC, Sausen M, Jones S, Bishop JA, Wood LD, Tokheim C, Niknafs N, Karchin R, Fertig EJ, Wheelan SJ, Marchionni L, Considine M, Ling S, Fakhry C, Papadopoulos

N, Kinzler KW, Vogelstein B, Ha PK, Agrawal N. Whole-genome sequencing of salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2016 Apr; 9(4): 265-274.

70) Bagchi A, Mills AA. The quest for the 1p36 tumor suppressor. *Cancer Res*. 2008 Apr 15;68(8):2551-6.

71) Rao PH, Roberts D, Zhao YJ, Bell D, Harris CP, Weber RS, El-Naggar AK. 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 Aug 15;14(16):5181-7.

72) Šteiner P, Andreasen S, Grossmann P, Hauer L, Vaněček T, Miesbauerová M, Santana T, Kiss K, Slouka D, Skálová A. Prognostic significance of 1p36 locus deletion in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. *Virchows Arch*. 2018 Oct;473(4):471-480.

73) Simpson RHW, Chiosea S, Katabi N et al. Acinic cell carcinoma. In: El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ (Eds): *WHO Classification of Head and Neck Tumours*. 4th edition. Lyon, France: IARC, 2017, pp 166-167. ISBN 978-92-832-2438-9.

74) Kessler A, Handler SD. Salivary gland neoplasms in children: a 10-year survey at the Children's Hospital of Philadelphia. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 1994 Jun;29(3):195-202.

75) Michal M, Skálová A, Simpson RH, Leivo I, Ryska A, Stárek I. Well-differentiated acinic cell carcinoma of salivary glands associated with lymphoid stroma. *Hum Pathol*. 1997 May;28(5):595-600.

76) Skalova A, Vanecek T, Sima R, Laco J, Weinreb I, Perez-Ordóñez B, Starek I, Geierova M, Simpson RH, Passador-Santos F, Ryska A, Leivo I, Kinkor Z, Michal M. Mammary analogue

secretory carcinoma of salivary glands, containing the ETV6-NTRK3 fusion gene: a hitherto undescribed salivary gland tumor entity. *Am J Surg Pathol*. 2010 May;34(5):599-608.

77) Bishop JA, Yonescu R, Batista D, Eisele DW, Westra WH. Most nonparotid "acinic cell carcinomas" represent mammary analog secretory carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2013 Jul;37(7):1053-7.

78) Dahlin DC, Beabout JW. Dedifferentiation of low-grade chondrosarcomas. *Cancer*. 1971 Aug;28(2):461-6.

79) Skálová A, Sima R, Vanecek T, Muller S, Korabecna M, Nemcova J, Elmberger G, Leivo I, Passador-Santos F, Walter J, Rousarova M, Jedlickova K, Curik R, Geierova M, Michal M. Acinic cell carcinoma with high-grade transformation: a report of 9 cases with immunohistochemical study and analysis of TP53 and HER-2/neu genes. *Am J Surg Pathol*. 2009 Aug;33(8):1137-45.

80) Nagao T. "Dedifferentiation" and high-grade transformation in salivary gland carcinomas. *Head Neck Pathol*. 2013 Jul;7 Suppl 1:S37-47.

81) Stanley RJ, Weiland LH, Olsen KD, Pearson BW. Dedifferentiated acinic cell (acinous) carcinoma of the parotid gland. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1988 Feb;98(2):155-61.

82) Cheuk W, Chan JK, Ngan RK. Dedifferentiation in adenoid cystic carcinoma of salivary gland: an uncommon complication associated with an accelerated clinical course. *Am J Surg Pathol*. 1999 Apr;23(4):465-72.

83) Ide F, Mishima K, Saito I. Small foci of high-grade carcinoma cells in adenoid cystic carcinoma represent an incipient phase of dedifferentiation. *Histopathology*. 2003 Dec;43(6):604-6.

84) Alos L, Carrillo R, Ramos J, Baez JM, Mallofre C, Fernandez PL, Cardesa A. High-grade carcinoma component in epithelial-myoepithelial carcinoma of salivary glands clinicopathological, immunohistochemical and flow-cytometric study of three cases. *Virchows Arch*. 1999 Apr;434(4):291-9.

85) Seethala RR, Barnes EL, Hunt JL. Epithelial-myoepithelial carcinoma: a review of the clinicopathologic spectrum and immunophenotypic characteristics in 61 tumors of the salivary glands and upper aerodigestive tract. *Am J Surg Pathol*. 2007 Jan;31(1):44-57.

86) Lloreta J, Serrano S, Corominas JM, Ferrés-Padró E. Polymorphous low-grade adenocarcinoma arising in the nasal cavities with an associated undifferentiated carcinoma. *Ultrastruct Pathol*. 1995 Sep-Oct;19(5):365-70.

87) Simpson RH, Pereira EM, Ribeiro AC, Abdulkadir A, Reis-Filho JS. Polymorphous low-grade adenocarcinoma of the salivary glands with transformation to high-grade carcinoma. *Histopathology*. 2002 Sep;41(3):250-9.

88) Skálová A, Vanecek T, Majewska H, Laco J, Grossmann P, Simpson RH, Hauer L, Andrlé 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 Jan;38(1):23-33.

- 89) Xu B, Aryeequaye R, Wang L, Katabi N. Sinonasal Secretory Carcinoma of Salivary Gland with High Grade Transformation: A Case Report of this Under-Recognized Diagnostic Entity with Prognostic and Therapeutic Implications. *Head Neck Pathol.* 2018 Jun;12(2):274-278.
- 90) Diegel CR, Cho KR, El-Naggar AK, Williams BO, Lindvall C. Mammalian target of rapamycin-dependent acinar cell neoplasia after inactivation of Apc and Pten in the mouse salivary gland: implications for human acinic cell carcinoma. *Cancer Res.* 2010 Nov 15;70(22):9143-52.
- 91) Ettl T, Schwarz-Furlan S, Haubner F, Müller S, Zenk J, Gosau M, Reichert TE, Zeitler K. The PI3K/AKT/mTOR signalling pathway is active in salivary gland cancer and implies different functions and prognoses depending on cell localisation. *Oral Oncol.* 2012 Sep;48(9):822-30.
- 92) Evans HL, Batsakis JG. Polymorphous low-grade adenocarcinoma of minor salivary glands: A study of 14 cases of a distinctive neoplasm. *Cancer* 1984;53:935-42
- 93) Fonseca I, Assaad A, Katabi N et al. Polymorphous adenocarcinoma. In: El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ (Eds): *WHO Classification of Head and Neck Tumours*. 4th edition. Lyon, France: IARC, 2017, pp 167-168. ISBN 978-92-832-2438-9.
- 94) Arathi N, Bage AM. Polymorphous low-grade adenocarcinoma of parotid gland: a rare occurrence. *Indian J Pathol Microbiol.* 2009 Jan-Mar;52(1):103-5.
- 95) Luna MA, Batsakis JG, Ordóñez NG, Mackay B, Tortoledo ME. Salivary gland adenocarcinomas: a clinicopathologic analysis of three distinctive types. *Semin Diagn Pathol.* 1987 May;4(2):117-35. Review.

96) Perez-Ordóñez B, Linkov I, Huvos AG. Polymorphous low-grade adenocarcinoma of minor salivary glands: a study of 17 cases with emphasis on cell differentiation. *Histopathology*. 1998 Jun;32(6):521-9.

97) Castle JT, Thompson LD, Frommelt RA, Wenig BM, Kessler HP. Polymorphous low grade adenocarcinoma: a clinicopathologic study of 164 cases. *Cancer*. 1999 Jul 15;86(2):207-19

98) Michal M, Skálová A, Simpson RH, Raslan WF, Curík R, Leivo I, Mukensnábl P. Cribriform adenocarcinoma of the tongue: a hitherto unrecognized type of adenocarcinoma characteristically occurring in the tongue. *Histopathology*. 1999 Dec;35(6):495-501

99) Skalova A, Sima R, Kaspirkova-Nemcova J, Simpson RH, Elmberger G, Leivo I, Di Palma S, Jirasek T, Gnepp DR, Weinreb I, Perez-Ordóñez B, Mukensnabl P, Rychly B, Hrabal P, Michal M. Cribriform adenocarcinoma of minor salivary gland origin principally affecting the tongue: characterization of new entity. *Am J Surg Pathol*. 2011 Aug;35(8):1168-76.

100) Michal M, Kacerovska D, Kazakov DV. Cribriform adenocarcinoma of the tongue and minor salivary glands: a review. *Head Neck Pathol*. 2013 Jul;7 Suppl 1:S3-11.

101) Majewska H, Skálová A, Weinreb I, Stodulski D, Hycza M, Stankiewicz C, Biernat W. Giant cribriform adenocarcinoma of the tongue showing PRKD3 rearrangement. *Pol J Pathol*. 2016 Mar;67(1):84-90.

102) Coček A, Hronková K, Voldánová J, Sach J, Skálová A, Ambruš M, Vránová J, Hahn A. Cribriform adenocarcinoma of the base of the tongue and low-grade, polymorphic

adenocarcinomas of the salivary glands. *Oncol Lett.* 2011 Jan;2(1):135-138. Epub 2010 Nov 23.

103) Vander Poorten V, Triantafyllou A, Skálová A, Stenman G, Bishop JA, Hauben E, Hunt JL, Hellquist H, Feys S, De Bree R, Mäkitie AA, Quer M, Strojan P, Guntinas-Lichius O, Rinaldo A, Ferlito A. Polymorphous adenocarcinoma of the salivary glands: reappraisal and update. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2018 Jul;275(7):1681-1695.

104) Skálová A, Simpson RH, Lehtonen H, Leivo I. Assessment of proliferative activity using the MIB1 antibody help to distinguish polymorphous low grade adenocarcinoma from adenoid cystic carcinoma of salivary glands. *Pathol Res Pract.* 1997;193(10):695-703.

105) Weinreb I, Piscuoglio S, Martelotto LG, Waggott D, Ng CK, Perez-Ordóñez B, Harding NJ, Alfaro J, Chu KC, Viale A, Fusco N, da Cruz Paula A, Marchio C, Sakr RA, Lim R, Thompson LD, Chiosea SI, Seethala RR, Skalova A, Stelow EB, Fonseca I, Assaad A, How C, Wang J, de Borja R, Chan-Seng-Yue M, Howlett CJ, Nichols AC, Wen YH, Katabi N, Buchner N, Mullen L, Kislinger T, Wouters BG, Liu FF, Norton L, McPherson JD, Rubin BP, Clarke BA, Weigelt B, Boutros PC, Reis-Filho JS. Hotspot activating PRKD1 somatic mutations in polymorphous low-grade adenocarcinomas of the salivary glands. *Nat Genet.* 2014 Nov;46(11):1166-9.

106) Weinreb I, Zhang L, Tirunagari LM, Sung YS, Chen CL, Perez-Ordóñez B, Clarke BA, Skalova A, Chiosea SI, Seethala RR, Waggott D, Boutros PC, How C, Liu FF, Irish JC, Goldstein DP, Gilbert R, Ud Din N, Assaad A, Hornick JL, Thompson LD, Antonescu CR. Novel PRKD gene rearrangements and variant fusions in cribriform adenocarcinoma of salivary gland origin. *Genes Chromosomes Cancer.* 2014 Oct;53(10):845-56.

107) Skálová A, Stenman G, Simpson RHW, Hellquist H, Slouka D, Svoboda T, Bishop JA, Hunt JL, Nibu KI, Rinaldo A, Vander Poorten V, Devaney KO, Steiner P, Ferlito A. The Role of

Molecular Testing in the Differential Diagnosis of Salivary Gland Carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2018 Feb;42(2):e11-e27.

108) Wenig BM, Bell D, Chiosea S. et al. Clear cell carcinoma. In: El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ (Eds): *WHO Classification of Head and Neck Tumours*. 4th edition. Lyon, France: IARC, 2017, pp 168-169. ISBN 978-92-832-2438-9.

109) Milchgrub S, Gnepp DR, Vuitch F, Delgado R, Albores-Saavedra J. Hyalinizing clear cell carcinoma of salivary gland. *Am J Surg Pathol*. 1994 Jan;18(1):74-82.

110) Simpson RH, Sarsfield PT, Clarke T, Babajews AV. Clear cell carcinoma of minor salivary glands. *Histopathology*. 1990 Nov;17(5):433-8.

111) Wang B, Brandwein M, Gordon R, Robinson R, Urken M, Zarbo RJ. Primary salivary clear cell tumors - a diagnostic approach: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 20 patients with clear cell carcinoma, clear cell myoepithelial carcinoma, and epithelial-myoepithelial carcinoma. *Arch Pathol Lab Med*. 2002 Jun;126(6):676-85.

112) Barber B, Côté D, Seikaly H. Clearing up clear cell tumours of the head and neck: differentiation of hyalinizing and odontogenic varieties. *J Otolaryngol Head Neck Surg*. 2010 Oct;39(5):E56-60.

113) Bishop JA, Rooper LM, Chiosea SI, Westra WH. Clear Cell Carcinoma of Salivary Glands Is Frequently p16 Positive: A Pitfall in the Interpretation of Oropharyngeal Biopsies. *Am J Surg Pathol*. 2018 Mar;42(3):367-371.

- 114) Stenmark MH, McHugh JB, Schipper M, Walline HM, Komarck C, Feng FY, Worden FP, Wolf GT, Chepeha DB, Prince ME, Bradford CR, Mukherji SK, Eisbruch A, Carey TE. Nonendemic HPV-positive nasopharyngeal carcinoma: association with poor prognosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2014 Mar 1;88(3):580-8.
- 115) Antonescu CR, Katabi N, Zhang L, Sung YS, Seethala RR, Jordan RC, Perez-Ordoñez B, Have C, Asa SL, Leong IT, Bradley G, Klieb H, Weinreb I. EWSR1-ATF1 fusion is a novel and consistent finding in hyalinizing clear-cell carcinoma of salivary gland. *Genes Chromosomes Cancer*. 2011 Jul;50(7):559-70.
- 116) Félix A, Rosa JC, Nunes JF, Fonseca I, Cidadão A, Soares J. Hyalinizing clear cell carcinoma of salivary glands: a study of extracellular matrix. *Oral Oncol*. 2002 Jun;38(4):364-8.
- 117) Westra WH, Boy S, El-Mofty SK, et al. Squamous cell carcinoma, HPV-positive. In: El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ (Eds): *Classification of Head and Neck Tumours*. Lyon, France: IARC, 2017, pp 136-138. ISBN 978-92-832-2438-9.
- 118) Lewis JS Jr, Beadle B, Bishop JA, Chernock RD, Colasacco C, Lacchetti C, Moncur JT, Rocco JW, Schwartz MR, Seethala RR, Thomas NE, Westra WH, Faquin WC. Human Papillomavirus Testing in Head and Neck Carcinomas: Guideline From the College of American Pathologists. *Arch Pathol Lab Med*. 2018 May;142(5):559-597.
- 119) Zucman J, Delattre O, Desmaze C, Epstein AL, Stenman G, Speleman F, Fletchers CD, Aurias A, Thomas G. EWS and ATF-1 gene fusion induced by t(12;22) translocation in malignant melanoma of soft parts. *Nat Genet*. 1993 Aug;4(4):341-5.

120) Bilodeau EA, Weinreb I, Antonescu CR, Zhang L, Dacic S, Muller S, Barker B, Seethala RR. Clear cell odontogenic carcinomas show EWSR1 rearrangements: a novel finding and a biological link to salivary clear cell carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2013 Jul;37(7):1001-5.

121) Skálová A, Weinreb I, Hycza M, Simpson RH, Laco J, Agaimy A, Vazmitel M, Majewska H, Vanecek T, Talarčík P, Manajlovic S, Losito SN, Šteiner P, Klimkova A, Michal M. Clear cell myoepithelial carcinoma of salivary glands showing EWSR1 rearrangement: molecular analysis of 94 salivary gland carcinomas with prominent clear cell component. *Am J Surg Pathol*. 2015 Mar;39(3):338-48.

122) Chapman E, Skalova A, Ptakova N, Martinek P, Goytain A, Tucker T, Xiong W, Leader M, Kudlow BA, Haimes JD, Hayes MM, Bohus P, Miesbauerova M, Lee CH, Ng TL. Molecular Profiling of Hyalinizing Clear Cell Carcinomas Revealed a Subset of Tumors Harboring a Novel EWSR1-CREM Fusion: Report of 3 Cases. *Am J Surg Pathol*. 2018 Sep;42(9):1182-1189.

123) Skálová A, Bell D, Bishop JA, Inagaki H, Seethala R, Vielh P: Secretory carcinoma. In El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Sliotweg PJ (Eds): *WHO Classification of Head and Neck Tumours*. Lyon, France: IARC, 2017, pp 177-178. ISBN 978-92-832-2438-9.

124) Tognon C, Knezevich SR, Huntsman D, Roskelley CD, Melnyk N, Mathers JA, Becker L, Carneiro F, MacPherson N, Horsman D, Poremba C, Sorensen PH. Expression of the ETV6-NTRK3 gene fusion as a primary event in human secretory breast carcinoma. *Cancer Cell*. 2002 Nov;2(5):367-76.

125) Petersson F, Lian D, Chau YP, Yan B. Mammary analogue secretory carcinoma: the first submandibular case reported including findings on fine needle aspiration cytology. *Head Neck Pathol*. 2012 Mar;6(1):135-9.

126) Zardawi IM, Hook P. Mammary analogue secretory carcinoma of minor salivary glands. *Pathology*. 2014 Dec;46(7):667-9.

127) Lurquin E, Jorissen M, Debiec-Rychter M, Hermans R, Hauben E. Mammary analogue secretory carcinoma of the sinus ethmoidalis. *Histopathology*. 2015 Nov;67(5):749-51.

128) Baneckova M, Agaimy A, Andreasen S, Vanecek T, Steiner P, Slouka D, Svoboda T, Miesbauerova M, Michal M Jr, Skálová A. Mammary Analog Secretory Carcinoma of the Nasal Cavity: Characterization of 2 Cases and Their Distinction From Other Low-grade Sinonasal Adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2018 Jun;42(6):735-743.

129) Seethala RR, Chiosea SI, Liu CZ, Nikiforova M, Nikiforov YE. Clinical and Morphologic Features of ETV6-NTRK3 Translocated Papillary Thyroid Carcinoma in an Adult Population Without Radiation Exposure. *Am J Surg Pathol*. 2017 Apr;41(4):446-457.

130) Leeman-Neill RJ, Kelly LM, Liu P, Brenner AV, Little MP, Bogdanova TI, Evdokimova VN, Hatch M, Zurnadzy LY, Nikiforova MN, Yue NJ, Zhang M, Mabuchi K, Tronko MD, Nikiforov YE. ETV6-NTRK3 is a common chromosomal rearrangement in radiation-associated thyroid cancer. *Cancer*. 2014 Mar 15;120(6):799-807.

131) Hyrcza MD, Andreasen S, Melchior LC, Tucker T, Heegaard S, White VA. Primary Secretory Carcinoma of the Lacrimal Gland: Report of a New Entity. *Am J Ophthalmol*. 2018 Sep;193:178-183.

132) Brandt SM, Swistel AJ, Rosen PP. Secretory carcinoma in the axilla: probable origin from axillary skin appendage glands in a young girl. *Am J Surg Pathol*. 2009 Jun;33(6):950-3.

133) Bishop JA, Taube JM, Su A, Binder SW, Kazakov DV, Michal M, Westra WH. Secretory Carcinoma of the Skin Harboring ETV6 Gene Fusions: A Cutaneous Analogue to Secretory Carcinomas of the Breast and Salivary Glands. *Am J Surg Pathol*. 2017 Jan;41(1):62-66.

134) Skalova A. Mammary analogue secretory carcinoma of salivary gland origin: an update and expanded morphologic and immunohistochemical spectrum of recently described entity. *Head Neck Pathol*. 2013 Jul;7 Suppl 1:S30-6.

135) Cipriani NA, Blair EA, Finkle J, Kraninger JL, Straus CM, Villaflor VM, Ginat DT. Salivary Gland Secretory Carcinoma With High-Grade Transformation, CDKN2A/B Loss, Distant Metastasis, and Lack of Sustained Response to Crizotinib. *Int J Surg Pathol*. 2017 Oct;25(7):613-618.

136) Luo W, Lindley SW, Lindley PH, Krempl GA, Seethala RR, Fung KM. Mammary analog secretory carcinoma of salivary gland with high-grade histology arising in hard palate, report of a case and review of literature. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014 Dec 1;7(12):9008-22. eCollection 2014. Review

137) Chênevert J, Duvvuri U, Chiosea S, Dacic S, Cieply K, Kim J, Shiwerski D, Seethala RR. DOG1: a novel marker of salivary acinar and intercalated duct differentiation. *Mod Pathol*. 2012 Jul;25(7):919-29.

138) Laco J, Švajdler M Jr, Andrejs J, Hrubala D, Hácová M, Vaněček T, Skálová A, Ryška A. Mammary analog secretory carcinoma of salivary glands: report of 2 cases with expression of basal/myoepithelial markers (calponin, CD10 and p63 protein). *Pathol Res Pract*. 2013 Mar;209(3):167-72.

- 139) Progetti F, Lacroix-Triki M, Serrano E, Vergez S, Barres BH, Meilleroux J, Delisle MB, Uro-Coste E. A comparative immunohistochemistry study of diagnostic tools in salivary gland tumors: usefulness of mammaglobin, gross cystic disease fluid protein 15, and p63 cytoplasmic staining for the diagnosis of mammary analog secretory carcinoma? *J Oral Pathol Med.* 2015 Apr;44(4):244-51.
- 140) Ito Y, Ishibashi K, Masaki A, Fujii K, Fujiyoshi Y, Hattori H, Kawakita D, Matsumoto M, Miyabe S, Shimosato K, Nagao T, Inagaki H. Mammary analogue secretory carcinoma of salivary glands: a clinicopathologic and molecular study including 2 cases harboring ETV6-X fusion. *Am J Surg Pathol.* 2015 May;39(5):602-10.
- 141) Skálová A, Vanecek T, Simpson RH, Laco J, Majewska H, Baneckova M, Steiner P, Michal M. Mammary Analogue Secretory Carcinoma of Salivary Glands: Molecular Analysis of 25 ETV6 Gene Rearranged Tumors With Lack of Detection of Classical ETV6-NTRK3 Fusion Transcript by Standard RT-PCR: Report of 4 Cases Harboring ETV6-X Gene Fusion. *Am J Surg Pathol.* 2016 Jan;40(1):3-13.
- 142) Skalova A, Vanecek T, Martinek P, Weinreb I, Stevens TM, Simpson RHW, Hycza M, Rupp NJ, Baneckova M, Michal M Jr, Slouka D, Svoboda T, Metelkova A, Etebarian A, Pavelka J, Potts SJ, Christiansen J, Steiner P, Michal M. Molecular Profiling of Mammary Analog Secretory Carcinoma Revealed a Subset of Tumors Harboring a Novel ETV6-RET Translocation: Report of 10 Cases. *Am J Surg Pathol.* 2018 Feb;42(2):234-246
- 143) Rooper LM, Karantanos T, Ning Y, Bishop JA, Gordon SW, Kang H. Salivary Secretory Carcinoma With a Novel ETV6-MET Fusion: Expanding the Molecular Spectrum of a Recently Described Entity. *Am J Surg Pathol.* 2018 Aug;42(8):1121-1126.

144) Chiosea SI, Griffith C, Assaad A, Seethala RR. The profile of acinic cell carcinoma after recognition of mammary analog secretory carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2012 Mar;36(3):343-50.

145) Urano M, Nagao T, Miyabe S, Ishibashi K, Higuchi K, Kuroda M. Characterization of mammary analogue secretory carcinoma of the salivary gland: discrimination from its mimics by the presence of the ETV6-NTRK3 translocation and novel surrogate markers. *Hum Pathol*. 2015 Jan;46(1):94-103.

146) Loening T, Leivo I, Simpson RHW, Weinreb I: Intraductal carcinoma; in El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ (Eds): *WHO Classification of Head and Neck Tumours*. 4th edition. Lyon, France: IARC, 2017, pp 170-171. ISBN 978-92-832-2438-9.

147) Delgado R, Klimstra D, Albores-Saavedra J. Low grade salivary duct carcinoma. A distinctive variant with a low grade histology and a predominant intraductal growth pattern. *Cancer*. 1996 Sep 1;78(5):958-67.

148) Simpson RH, Desai S, Di Palma S. Salivary duct carcinoma in situ of the parotid gland. *Histopathology*. 2008 Oct;53(4):416-25.

149) Weinreb I, Tabanda-Lichauco R, Van der Kwast T, Perez-Ordoñez B. Low-grade intraductal carcinoma of salivary gland: report of 3 cases with marked apocrine differentiation. *Am J Surg Pathol*. 2006 Aug;30(8):1014-21.

150) Brandwein-Gensler M, Hille J, Wang BY, Urken M, Gordon R, Wang LJ, Simpson JR, Simpson RH, Gnepp DR. Low-grade salivary duct carcinoma: description of 16 cases. *Am J Surg Pathol*. 2004 Aug;28(8):1040-4.

151) Weinreb I, Bishop JA, Chiosea SI, Seethala RR, Perez-Ordóñez B, Zhang L, Sung YS, Chen CL, Assaad A, Oliari BR, Antonescu CR. Recurrent RET Gene Rearrangements in Intraductal Carcinomas of Salivary Gland. *Am J Surg Pathol*. 2018 Apr;42(4):442-452.

152) Skálová A, Vanecek T, Uro-Coste E, Bishop JA, Weinreb I, Thompson LDR, de Sanctis S, Schiavo-Lena M, Laco J, Badoual C, Santana Conceição T, Ptáková N, Baněčková M, Miesbauerová M, Michal M. Molecular Profiling of Salivary Gland Intraductal Carcinoma Revealed a Subset of Tumors Harboring NCOA4-RET and Novel TRIM27-RET Fusions: A Report of 17 cases. *Am J Surg Pathol*. 2018 Nov;42(11):1445-1455.

153) Barizzi J, Merlo E, Schönegg R, Pelloni R, Mazzuchelli L, Fulciniti F. Pure intraductal carcinoma of the parotid gland: Cytologic findings on FNA sample. Report of one case. *Diagn Cytopathol*. 2017 Nov;45(11):1046-1049.

154) Nagao T, Licitra L, Leoning T, Vielh P, Williams MD. Salivary duct carcinoma. In: El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Sroog PJ (Eds): *WHO Classification of Head and Neck Tumours*. 4th edition. Lyon, France: IARC, 2017, pp 173-174. ISBN 978-92-832-2438-9.

155) Kleinsasser O, Klein HJ, Hübner G. Salivary duct carcinoma. A group of salivary gland tumors analogous to mammary duct carcinoma. *Arch Klin Exp Ohren Nasen Kehlkopfheilkd*. 1968;192(1):100-5.

156) Grenko RT, Gemryd P, Tytor M, Lundqvist PG, Boeryd B. Salivary duct carcinoma. *Histopathology*. 1995 Mar;26(3):261-6.

157) Katabi N, Gomez D, Klimstra DS, Carlson DL, Lee N, Ghossein R. Prognostic factors of recurrence in salivary carcinoma ex pleomorphic adenoma, with emphasis on the carcinoma histologic subtype: a clinicopathologic study of 43 cases. *Hum Pathol*. 2010 Jul;41(7):927-34.

158) Jaehne M, Roeser K, Jaekel T, Schepers JD, Albert N, Löning T. Clinical and immunohistologic typing of salivary duct carcinoma: a report of 50 cases. *Cancer*. 2005 Jun 15;103(12):2526-33.

159) Barnes L, Rao U, Krause J, Contis L, Schwartz A, Scalamogna P. Salivary duct carcinoma. Part I. A clinicopathologic evaluation and DNA image analysis of 13 cases with review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1994 Jul;78(1):64-73.

160) Bahrami A, Perez-Ordóñez B, Dalton JD, Weinreb I. An analysis of PLAG1 and HMGA2 rearrangements in salivary duct carcinoma and examination of the role of precursor lesions. *Histopathology*. 2013 Aug;63(2):250-62.

161) Di Palma S, Simpson RH, Marchiò C, Skálová A, Ungari M, Sandison A, Whitaker S, Parry S, Reis-Filho JS. Salivary duct carcinomas can be classified into luminal androgen receptor-positive, HER2 and basal-like phenotypes. *Histopathology*. 2012 Oct;61(4):629-43.

162) Skálová A, Stárek I, Vanecek T, Kucerová V, Plank L, Szépe P, Di Palma S, Leivo I. Expression of HER-2/neu gene and protein in salivary duct carcinomas of parotid gland as revealed by fluorescence-in-situ hybridization and immunohistochemistry. *Histopathology*. 2003 Apr;42(4):348-56.

163) Masubuchi T, Tada Y, Maruya S, Osamura Y, Kamata SE, Miura K, Fushimi C, Takahashi H, Kawakita D, Kishimoto S, Nagao T. Clinicopathological significance of androgen receptor,

HER2, Ki-67 and EGFR expressions in salivary duct carcinoma. *Int J Clin Oncol*. 2015 Feb;20(1):35-44.

164) Falchook GS, Lippman SM, Bastida CC, Kurzrock R. Human epidermal receptor 2-amplified salivary duct carcinoma: regression with dual human epidermal receptor 2 inhibition and anti-vascular endothelial growth factor combination treatment. *Head Neck*. 2014 Mar;36(3):E25-7.

165) Limaye SA, Posner MR, Krane JF, Fonfria M, Lorch JH, Dillon DA, Shreenivas AV, Tishler RB, Haddad RI. Trastuzumab for the treatment of salivary duct carcinoma. *Oncologist*. 2013;18(3):294-300.

166) Griffith CC, Seethala RR, Luvison A, Miller M, Chiosea SI. PIK3CA mutations and PTEN loss in salivary duct carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2013 Aug;37(8):1201-7.

167) Nardi V, Sadow PM, Juric D, Zhao D, Cosper AK, Bergethon K, Scialabba VL, Batten JM, Borger DR, Iafrate AJ, Heist RS, Lawrence DP, Flaherty KT, Bendell JC, Deschler D, Li Y, Wirth LJ, Dias-Santagata D. Detection of novel actionable genetic changes in salivary duct carcinoma helps direct patient treatment. *Clin Cancer Res*. 2013 Jan 15;19(2):480-90.

168) Qiu W, Tong GX, Turk AT, Close LG, Caruana SM, Su GH. Oncogenic PIK3CA mutation and dysregulation in human salivary duct carcinoma. *Biomed Res Int*. 2014;2014:810487.

169) Dalin MG, Desrichard A, Katabi N, Makarov V, Walsh LA, Lee KW, Wang Q, Armenia J, West L, Dogan S, Wang L, Ramaswami D, Ho AL, Ganly I, Solit DB, Berger MF, Schultz ND, Reis-Filho JS, Chan TA, Morris LG. Comprehensive Molecular Characterization of Salivary

Duct Carcinoma Reveals Actionable Targets and Similarity to Apocrine Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* 2016 Sep 15;22(18):4623-33.

170) Stenman G. Fusion oncogenes in salivary gland tumors: molecular and clinical consequences. *Head Neck Pathol.* 2013 Jul;7 Suppl 1:S12-9.

171) Bullerdiek J, Wobst G, Meyer-Bolte K, Chilla R, Haubrich J, Thode B, Bartnitzke S. Cytogenetic subtyping of 220 salivary gland pleomorphic adenomas: correlation to occurrence, histological subtype, and in vitro cellular behavior. *Cancer Genet Cytogenet.* 1993 Jan;65(1):27-31.

172) Katabi N, Ghossein R, Ho A, Dogan S, Zhang L, Sung YS, Antonescu CR. Consistent PLAG1 and HMGA2 abnormalities distinguish carcinoma ex-pleomorphic adenoma from its de novo counterparts. *Hum Pathol.* 2015 Jan;46(1):26-33.

173) Chiosea SI, Thompson LD, Weinreb I, Bauman JE, Mahaffey AM, Miller C, Ferris RL, Gooding WE. Subsets of salivary duct carcinoma defined by morphologic evidence of pleomorphic adenoma, PLAG1 or HMGA2 rearrangements, and common genetic alterations. *Cancer.* 2016 Oct 15;122(20):3136-3144.

174) Bahrami A, Dalton JD, Shivakumar B, Krane JF. PLAG1 alteration in carcinoma ex pleomorphic adenoma: immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization studies of 22 cases. *Head Neck Pathol.* 2012 Sep;6(3):328-35.

175) Mito JK, Jo VY, Chiosea SI, Dal Cin P, Krane JF. HMGA2 is a specific immunohistochemical marker for pleomorphic adenoma and carcinoma ex-pleomorphic adenoma. *Histopathology.* 2017 Oct;71(4):511-521.

176) Seethala RR, Stenman G. Update from the 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: Tumors of the Salivary Gland. *Head Neck Pathol.* 2017 Mar; 11(1): 55–67.

177) Chen KT. Intraductal carcinoma of the minor salivary gland. *J Laryngol Otol.* 1983 Feb;97(2):189-91.

178) Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C (Eds): *TNM Classification of Malignant Tumours*. 8th Edition. Wiley-Blackwell, 2016. ISBN: 978-1-119-26357-9

179) *NTRK gene fusions: Novel targets of cancer therapy*. [online]. c2019. Dostupné z: <https://www.ntrkfusions.com>.

180) Ardini E, Menichincheri M, Banfi P, Bosotti R, De Ponti C, Pulci R, Ballinari D, Ciomei M, Texido G, Degrassi A, Avanzi N, Amboldi N, Saccardo MB, Casero D, Orsini P, Bandiera T, Mologni L, Anderson D, Wei G, Harris J, Vernier JM, Li G, Felder E, Donati D, Isacchi A, Pesenti E, Magnaghi P, Galvani A. Entrectinib, a Pan-TRK, ROS1, and ALK Inhibitor with Activity in Multiple Molecularly Defined Cancer Indications. *Mol Cancer Ther.* 2016 Apr;15(4):628-39.

181) Li GG, Somwar R, Joseph J, Smith RS, Hayashi T, Martin L, Franovic A, Schairer A, Martin E, Riely GJ, Harris J, Yan S, Wei G, Oliver JW, Patel R, Multani P, Ladanyi M, Drilon A. Antitumor Activity of RXDX-105 in Multiple Cancer Types with RET Rearrangements or Mutations. *Clin Cancer Res.* 2017 Jun 15;23(12):2981-2990.

182) Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science.* 1989 May 12;244(4905):707-12.

183) Thomson TA, Hayes MM, Spinelli JJ, Hilland E, Sawrenko C, Phillips D, Dupuis B, Parker RL. HER-2/neu in breast cancer: interobserver variability and performance of immunohistochemistry with 4 antibodies compared with fluorescent in situ hybridization. *Mod Pathol*. 2001 Nov;14(11):1079-86.

184) Sugano S, Mukai K, Tsuda H, Hirohashi S, Furuya S, Shimosato Y, Ebihara S, Takeyama I. Immunohistochemical study of c-erbB-2 oncoprotein overexpression in human major salivary gland carcinoma: an indicator of aggressiveness. *Laryngoscope*. 1992 Aug;102(8):923-7.

185) Press MF, Pike MC, Hung G, Zhou JY, Ma Y, George J, Dietz-Band J, James W, Slamon DJ, Batsakis JG, et al. Amplification and overexpression of HER-2/neu in carcinomas of the salivary gland: correlation with poor prognosis. *Cancer Res*. 1994 Nov 1;54(21):5675-82.

186) Murphy DA, Ely HA, Shoemaker R, Boomer A, Culver BP, Hoskins I, Haimes JD, Walters RD, Fernandez D, Stahl JA, Lee J, Kim KM, Lamoureux J, Christiansen J. Detecting Gene Rearrangements in Patient Populations Through a 2-Step Diagnostic Test Comprised of Rapid IHC Enrichment Followed by Sensitive Next-Generation Sequencing. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2017 Aug;25(7):513-523.

187) Amatu A, Sartore-Bianchi A, Siena S. NTRK gene fusions as novel targets of cancer therapy across multiple tumour types. *ESMO Open*. 2016 Mar 18;1(2):e000023. eCollection 2016. Review.

188) Liu D, Offin M, Harnicar S, Li BT, Drilon A. Entrectinib: an orally available, selective tyrosine kinase inhibitor for the treatment of NTRK, ROS1, and ALK fusion-positive solid tumors. *Ther Clin Risk Manag*. 2018 Jul 20;14:1247-1252.

189) Hechtman JF, Benayed R, Hyman DM, Drilon A, Zehir A, Frosina D, Arcila ME, Dogan S, Klimstra DS, Ladanyi M, Jungbluth AA. Pan-Trk Immunohistochemistry Is an Efficient and Reliable Screen for the Detection of NTRK Fusions. *Am J Surg Pathol*. 2017 Nov;41(11):1547-1551.

190) Rudzinski ER, Lockwood CM, Stohr BA, Vargas SO, Sheridan R, Black JO, Rajaram V, Laetsch TW, Davis JL. Pan-Trk Immunohistochemistry Identifies NTRK Rearrangements in Pediatric Mesenchymal Tumors. *Am J Surg Pathol*. 2018 Jul;42(7):927-935

191) Brodeur GM, Minturn JE, Ho R, Simpson AM, Iyer R, Varela CR, Light JE, Kolla V, Evans AE. Trk receptor expression and inhibition in neuroblastomas. *Clin Cancer Res*. 2009 May 15;15(10):3244-50.

192) Tapia V, Gabler F, Muñoz M, Yazigi R, Paredes A, Selman A, Vega M, Romero C. Tyrosine kinase A receptor (trkA): a potential marker in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2011 Apr;121(1):13-23.

193) Andreasen S, Skálová A, Agaimy A, Bishop JA, Laco J, Leivo I, Franchi A, Larsen SR, Erentaite D, Ulhøi BP, von Buchwald C, Melchior LC, Michal M, Kiss K. ETV6 Gene Rearrangements Characterize a Morphologically Distinct Subset of Sinonasal Low-grade Non-intestinal-type Adenocarcinoma: A Novel Translocation-associated Carcinoma Restricted to the Sinonasal Tract. *Am J Surg Pathol*. 2017 Nov;41(11):1552-1560.

194) Bourgeois JM, Knezevich SR, Mathers JA, et al. Molecular detection of the ETV6-NTRK3 gene fusion differentiates congenital fibrosarcoma from other childhood spindle cell tumors. *Am J Surg Pathol*. 2000;24:937-946.

- 195) Pisharodi L. Mammary analog secretory carcinoma of salivary gland: cytologic diagnosis and differential diagnosis of an unreported entity. *Diagn Cytopathol*. 2013 Mar;41(3):239-41.
- 196) Levine P, Fried K, Krevitt LD, Wang B, Wenig BM. Aspiration biopsy of mammary analogue secretory carcinoma of accessory parotid gland: another diagnostic dilemma in matrix-containing tumors of the salivary glands. *Diagn Cytopathol*. 2014 Jan;42(1):49-53.
- 197) Takeda M, Kasai T, Morita K, Takeuchi M, Nishikawa T, Yamashita A, Mikami S, Hosoi H, Ohbayashi C. Cytopathological features of mammary analogue secretory carcinoma- review of literature. *Diagn Cytopathol*. 2015 Feb;43(2):131-7.
- 198) Bajaj J, Gimenez C, Slim F, Aziz M, Das K. Fine-needle aspiration cytology of mammary analog secretory carcinoma masquerading as low-grade mucoepidermoid carcinoma: case report with a review of the literature. *Acta Cytol*. 2014;58(5):501-10.
- 199) Sethi R, Kozin E, Remenschneider A, Meier J, VanderLaan P, Faquin W, Deschler D, Frankenthaler R. Mammary analogue secretory carcinoma: update on a new diagnosis of salivary gland malignancy. *Laryngoscope*. 2014 Jan;124(1):188-195.
- 200) Samulski TD, LiVolsi VA, Baloch Z. The cytopathologic features of mammary analog secretory carcinoma and its mimics. *Cytojournal*. 2014 Aug 28;11:24.
- 201) Bellevicine C, Natella V, Somma A, De Rosa G, Troncone G. MASC is indistinguishable from acinic cell carcinoma, papillary-cystic variant on salivary gland FNA cytology: case report with histological and immunohistochemical correlates. *Cytopathology*. 2014 Oct;25(5):344-6.

202) Inaba T, Fukumura Y, Saito T, Yokoyama J, Ohba S, Arakawa A, Yao T. Cytological features of mammary analogue secretory carcinoma of the parotid gland in a 15-year-old girl: a case report with review of the literature. *Case Rep Pathol.* 2015;2015:656107.

203) Kai K, Minesaki A, Suzuki K, Monji M, Nakamura M, Tsugitomi H, Kuratomi Y, Aishima S. Difficulty in the Cytodiagnosis of Mammary Analogue Secretory Carcinoma: Survey of 109 Cytologists with a Case Originating from a Minor Salivary Gland. *Acta Cytol.* 2017;61(6):469-476.

204) Oza N, Sanghvi K, Shet T, Patil A, Menon S, Ramadwar M, Kane S. Mammary analogue secretory carcinoma of parotid: Is preoperative cytological diagnosis possible? *Diagn Cytopathol.* 2016 Jun;44(6):519-25.

205) Bishop JA, Yonescu R, Batista DA, Westra WH, Ali SZ. Cytopathologic features of mammary analogue secretory carcinoma. *Cancer Cytopathol.* 2013 May;121(5):228-33.

206) Griffith CC, Stelow EB, Saqi A, Khalbuss WE, Schneider F, Chiosea SI, Seethala RR. The cytological features of mammary analogue secretory carcinoma: a series of 6 molecularly confirmed cases. *Cancer Cytopathol.* 2013 May;121(5):234-41.

207) Higuchi K, Urano M, Takahashi RH, Oshiro H, Matsubayashi J, Nagai T, Obikane H, Shimojo H, Nagao T. Cytological features of mammary analogue secretory carcinoma of salivary gland: fine-needle aspiration of seven cases. *Diagn Cytopathol.* 2014 Oct;42(10):846-55.

208) Jung MJ, Kim SY, Nam SY, Roh JL, Choi SH, Lee JH, Baek JH, Cho KJ. Aspiration cytology of mammary analogue secretory carcinoma of the salivary gland. *Diagn Cytopathol*. 2015 Apr;43(4):287-93.

209) Jin R, Craddock KJ, Irish JC, Perez-Ordonez B, Weinreb I. Recurrent hyalinizing clear cell carcinoma of the base of tongue with high-grade transformation and EWSR1 gene rearrangement by FISH. *Head Neck Pathol*. 2012 Sep;6(3):389-94.

6. Přílohy

Případ	Lokalizace	Diagnóza	Nalezena relevantní translokace	Typ mutace/fúzní partneri
1	SŽ – dutina nosní	Sekreční karcinom	Ano	<i>ETV6-NTRK3</i>
2	SŽ – příušní	Sekreční karcinom	Ano	<i>ETV6-NTRK3</i>
3	SŽ – příušní	Sekreční karcinom	Ano	<i>ETV6-NTRK3</i>
4	SŽ – příušní	Sekreční karcinom	Ano	<i>ETV6-NTRK3</i>
5	SŽ – příušní	Sekreční karcinom	Ano	<i>ETV6-NTRK3</i>
6	SŽ – příušní	Sekreční karcinom	Ano	<i>ETV6-NTRK3</i>
7	SŽ – příušní	Sekreční karcinom	Ano	<i>ETV6-NTRK3</i>
8	SŽ – příušní	Sekreční karcinom	Ano	<i>ETV6-NTRK3</i>
9	SŽ – příušní	Sekreční karcinom	Ano	<i>ETV6-NTRK3</i>
10	SŽ – příušní	Sekreční karcinom	Ano	<i>ETV6-NTRK3</i>
11	SŽ – příušní	Sekreční karcinom	Ano	<i>ETV6-NTRK3</i>
12	SŽ – příušní	Sekreční karcinom	Ano	<i>ETV6-NTRK3</i>
13	SŽ – submandibulární	Sekreční karcinom	Ano	<i>ETV6-NTRK3</i>
14	SŽ – submandibulární	Sekreční karcinom	Ano	<i>ETV6-NTRK3</i>
15	SŽ – příušní	Sekreční karcinom HG	Ano	<i>ETV6-NTRK3</i>
16	SŽ – submandibulární	Sekreční karcinom HG	Ano	<i>ETV6-NTRK3</i>
17	SŽ – dutina ústní	Recidivující HG sekreční karcinom	Ano	<i>ETV6-NTRK3</i>
18	SŽ – submandibulární	Recidivující HG sekreční karcinom	Ano	<i>ETV6-NTRK3, MYB-SMR3B</i>
19	ŠŽ – příušní	Sekreční karcinom	Ne	<i>ETV6-RET</i>
20	ŠŽ – příušní	Sekreční karcinom	Ne	<i>ETV6-RET</i>
21	ŠŽ – příušní	Sekreční karcinom	Ne	<i>ETV6-RET</i>
22	ŠŽ – příušní	Sekreční karcinom	Ne	<i>ETV6-RET</i>
23	ŠŽ – příušní	Sekreční karcinom	Ne	<i>ETV6-RET</i>
24	ŠŽ – příušní	Sekreční karcinom	Ne	<i>ETV6-RET</i>
25	ŠŽ – příušní	Sekreční karcinom	Ne	<i>VIM-RET</i>
26	ŠŽ – příušní	LG intraduktální s metastázou v 1 LU	Ne	<i>NCOA4-RET</i>
27	ŠŽ – příušní	LG intraduktální karcinom	Ne	<i>NCOA4-RET, MYB-SMR3B</i>
28	ŠŽ – orofarynx	Světlobuněčný karcinom	Ne	<i>EWSR1-ATF1</i>
29	ŠŽ – příušní	HGT Acinický karcinom	Ne	<i>EWSR1-HYOU1</i>
30	ŠŽ – příušní	Acinický karcinom	Ne	<i>SYN2-PPARG</i>
31	ŠŽ – příušní	Onkocytický cystadenokarcinom	Ne	<i>SYN2-PPARG</i>
32	SŽ – dutina ústní	Adenoidně cystický karcinom	Ne	<i>MYB-NFIB</i>
33	Kůže	Sekreční karcinom kůže	Ano	<i>ETV6-NTRK3</i>
34	Kůže	Lentigo maligna melanoma	Ano	<i>LMNA-NTRK1</i>
35	Kůže	Nodulární melanom	Ano	<i>LMNA-NTRK1</i>
36	Kůže	Povrchově se šířící melanom	Ano	<i>LMNA-NTRK1</i>
37	Kůže	Povrchově se šířící melanom	Ano	<i>SQSTM1-NTRK2</i>
38	Kůže	Povrchově se šířící melanom	Ano	<i>SQSTM1-NTRK2</i>
39	Kůže	Povrchově se šířící melanom	Ano	<i>SQSTM1-NTRK2</i>
40	Kůže	Povrchově se šířící melanom	Ano	<i>TPM3-NTRK1</i>

41	Kůže	Povrchově se šířící melanom	Ano	<i>MYO5A-NTRK3</i>
42	Kůže	Povrchově se šířící melanom	Ano	<i>MYO5A-NTRK3</i>
43	Kůže	Povrchově se šířící melanom	Ano	<i>KIAA1598-ROS1</i>
44	Kůže	Povrchově se šířící melanom	Ne	<i>TMPRSS2-AXL</i>
45	Kůže	Atypický tumor Spitzové	Ano	<i>LMNA-NTRK1</i>
46	Kůže	Atypický tumor Spitzové	Ano	<i>ZCCHC8-ROS1</i>
47	Kůže	Atypický tumor Spitzové	Ano	<i>PWWP2A-ROS1</i>
48	Kůže	Atypický tumor Spitzové	Ano	<i>PWWP2A-ROS1</i>
49	Kůže	Atypický tumor Spitzové	Ano	<i>FIP1L1-ROS1</i>
50	Kůže	Atypický tumor Spitzové	Ne	<i>CLIP2-BRAF</i>
51	Kůže	Basocelulární karcinom	Ano	<i>PTCH1-ALK</i>
52	Kůže	Malobuněčný karcinom, dif.dg. Merkelův karcinom	Ne	<i>SDCCAG8-AKT3</i>
53	Kůže	Merkelův karcinom	Ne	<i>SYN2-PPARG</i>
54	Kůže	Merkelův karcinom	Ne	<i>SYN2-PPARG</i>
55	Kůže	Špatně diferencovaný karcinom	Ne	<i>DUSP14-PRKCA</i>
56	Kůže	Nevoidní melanom	Ano	<i>CAPRIN1-ROS1</i>
57	Kůže	Basoskvamózní karcinom	Ne	<i>ETV5-EGFR</i>
58	Prostata	Acinární adenokarcinom	Ne	<i>EWSR1-TFE3</i>
59	Prostata	Acinární adenokarcinom	Ne	<i>TMPRSS2-ERG</i>
60	Prostata	Mikroacinární adenokarcinom	Ne	<i>TMPRSS2-ERG</i>
61	Prostata	Acinární adenokarcinom	Ne	<i>TMPRSS2-ERG</i>
62	Prostata	Acinární adenokarcinom	Ne	<i>TMPRSS2-ERG</i>
63	Prostata	Acinární adenokarcinom	Ne	<i>TMPRSS2-ERG</i>
64	Prostata	Acinární adenokarcinom	Ne	<i>TMPRSS2-ERG</i>
65	Prostata	Mikroacinární adenokarcinom	Ne	<i>TMPRSS2-ERG</i>
66	Prostata	Acinární adenokarcinom	Ne	<i>TMPRSS2-ERG</i>
67	Prostata	Acinární adenokarcinom	Ne	<i>TMPRSS2-ERG</i>
68	Prostata	Acinární adenokarcinom	Ne	<i>TMPRSS2-ERG</i>
69	Prostata	Acinární adenokarcinom	Ne	<i>TMPRSS2-ERG</i>
70	Prostata	Acinární adenokarcinom	Ne	<i>TMPRSS2-ERG</i>
71	Prostata	Acinární adenokarcinom	Ne	<i>TMPRSS2-ERG</i>
72	Prostata	Acinární adenokarcinom	Ne	<i>TMPRSS2-ERG</i>
73	Prostata	Mikroacinózní adenokarcinom	Ne	<i>RBM33-BRAF out of frame</i>
74	Prostata	Urachální karcinom	Ne	<i>ESRP1-RSPO2</i>
75	Prostata	Acinární adenokarcinom	Ne	<i>NDRG1-ETV4</i>
76	Mozek	Oligodendrogliom grade II	Ne	<i>FGFR2-CTNNA3</i>
77	Mozek	Gioblastoma grade IV, IDH-wild type	Ne	<i>EGFR-SEPT14</i>
78	Mozek	Gioblastoma grade IV, IDH-wild type	Ne	<i>EGFR-SEPT14</i>
79	Mozek	Gioblastoma grade IV, IDH-wild type	Ne	<i>EGFR del ex 2-7</i>
80	Mozek	Gioblastoma grade IV, IDH-wild type	Ne	<i>EGFR del ex2-7</i>
81	Mozek	Gioblastoma grade IV, IDH-wild type	Ne	<i>EGFR del ex 2-7</i>
82	Mozek	Gioblastoma grade IV, IDH-wild type	Ne	<i>EGFR del ex 2-7</i>
83	Mozek	Gioblastoma grade IV, IDH-wild type	Ne	<i>EGFR del ex 2-7</i>
84	Mozek	Gioblastoma grade IV, IDH-wild type	Ne	<i>FGFR3-TACC3</i>
85	Mozek	Anaplastický astrocytom, IDH-wild type	Ne	<i>FGFR3-TACC3</i>

86	Mozek	Glioblastom grade IV	Ne	<i>FGFR3-TACC3</i>
87	Mozek	Glioblastom grade IV	Ne	<i>FGFR3-CKAP5</i>
88	Mozek	Anaplastický oligodendrogliom	Ne	<i>FGFR3-AMBRA1</i>
89	Prs	Sekreční karcinom	Ano	<i>ETV6-NTRK3</i>
90	Prs	IDC grade 2, Nottingham score 7	Ano	<i>SMG7-ALK</i>
91	Prs	IDC grade 1, Nottingham score 5	Ano	<i>ETV6-NTRK3</i>
92	Prs	IDC grade 3, Nottingham score 8	Ne	<i>FGFR3-TACC3</i>
93	Prs	IDC grade 3, Nottingham score 8	Ne	<i>C21orf33-ERG</i>
94	Prs	IDC grade 3, Nottingham score 8	Ne	<i>CTBP2-ERG</i>
95	Prs	IDC grade 3, Nottingham score 9	Ne	<i>MED27-RSPO2</i>
96	Prs	Metastáza světlobuněčného karcinomu ledviny	Ne	<i>EWSR1-TFE3</i>
97	Plíce	Adenokarcinom	Ano	<i>EML4-ALK</i>
98	Plíce	Adenokarcinom	Ano	<i>EML4-ALK</i>
99	Plíce	Světlobuněčný karcinom	Ne	<i>EWSR1-CREM</i>
100	Plíce	Adenokarcinom	Ne	<i>MET</i>
101	Plíce	Adenokarcinom	Ne	<i>KIF5B-RET</i>
102	Plíce	Nízce diferencovaný nemalobuněčný karcinom	Ne	<i>MET del ex14</i>
103	Štítná žláza	Papilární karcinom	Ano	<i>TPM3-NTRK1</i>
104	Štítná žláza	Folikulární karcinom	Ne	<i>PAX8-PPARG</i>
105	Ledvina	Metanefrický adenom	Ano	<i>STRN-ALK</i>
106	Ledvina	Mucinózní tubulární vřetenobuněčný karcinom	Ano	<i>KIF5B-ALK</i>
107	Střevo	Metastáza prostatického adenokarcinomu	Ne	<i>TMPRSS2-ERG</i>
108	Paranasální dutiny	Inflamatorní myofibroblastický tumor/sarkom	Ne	<i>ETV1-ERG</i>
109	Cervix	Adenoidně bazální ca klenby poševní	Ne	<i>FGFR2-SORBS1</i>

Tabulka 19 – Seznam všech nalezených genových aberací pomocí dvoustupňové screeningové metody. * SŽ: slinná žláza, ca: karcinom, IDC: invazivní duktální karcinom.