

Univerzita Palackého v Olomouci

Lékařská fakulta



Ústav klinické a molekulární patologie

MUDr. Jaroslav Michálek

Prognostické faktory nádorů hlavy a krku se zaměřením na kostní invazi

Dizertační práce

Školitel: doc. MUDr. Svetlana Brychtová, Ph.D.

Studijní obor: Patologická anatomie a soudní lékařství

Olomouc 2019

Prohlášení

Tímto prohlašuji, že jsem provedl veškerou vykonanou práci obsaženou v této dizertační práci, pokud není uvedeno níže jinak.

Dizertační práce obsahuje výsledky, které byly získány v kooperaci s těmito kolegy: doc. MUDr. Richard Pink, Ph.D. z Kliniky ústní, čelistní a obličejové chirurgie LF UP Olomouc (klinická data vstupující do studie), MDDr. David Král Kliniky ústní, čelistní a obličejové chirurgie LF UP Olomouc (klinická data vstupující do studie), Mgr. Eva Havlíčková Sedláková z Ústavu klinické a molekulární patologie LF UP (bioptická laboratoř a laboratoř imunohistochemie) a Mgr. Kateřina Langová, Ph.D. Ústav lékařské biofyziky LF UP (statistická analýza dat).

Poděkování

Děkuji za odborné příspěvky v patologii nádorů hlavy a krku patří mojí školitelce doc. MUDr. Svetlaně Brychtové, Ph.D. a prof. MUDr. Zdeňkovi Kolářovi, CSc. Za cenné rady a podporu. Taktéž doc. Mgr. Janu Bouchalovi, Ph. D. za zpracování statistiky a všem klinickým spolupracovníkům.

Obsah

1. Úvod	5
1.1 Nádory hlavy a krku	5
1.2 Maligní nádory dutiny ústní a orofaryngu	7
1.3 Potenciálně maligní nemoci dutiny ústní (OPMD)	7
1.4 Histologie orálních a orofaryngeálních karcinomů	8
1.5 Histopatologické prognostické faktory	8
1.5.1 Lokalizace nádoru	10
1.5.2 Velikost a hloubka invaze nádoru	10
1.5.3 Nádorový grading	11
1.5.4 Perineurální invaze	11
1.5.5 Vaskulární invaze	12
1.5.6 Histologický podtyp spinocelulárního karcinomu	13
1.5.7 Resekční okraje resekátu	14
1.5.8 Uzlinové metastázy a ECS	14
1.5.9 Invaze do skeletu	17
1.5.10 Molekulární prognostické faktory	20
1.5.10.1 p53	20
1.5.10.2 Faktory související s angiogenezí	21
1.5.10.3 Ki-67	21
1.5.10.4 EGFR	21
1.5.10.5 Cytokeratin 8/18	21
1.5.10.6 Lidský papilomavirus (HPV)	22
2. Cíl projektu	23
3. Materiál a metody	24
4. Výsledky studie	29
4.1 Histopatologické a klinicko-patologické prognostické znaky	29
4.2 Imunohistochemické prognostické znaky	38
5. Diskuze	42
6. Souhrn	48
7. Použité zkratky	51
8. Původní vědecké publikace, přehledové články, postery	53
9. Reference	90

1. Úvod

1.1 Nádory hlavy a krku

Nádory hlavy a krku představují heterogenní skupinu onemocnění kvůli zastoupení různých anatomických sublokalizací. Dle WHO klasifikace z roku 2017 se rozlišují následující samostatné sublokalizace [1]:

1. Nádory nosní dutiny, paranasálních dutin a baze lební
2. Nádory nazofaryngu
3. Nádory hypofaryngu, laryngu, trachey a parafaryngeálních prostorů
4. Nádory dutiny ústní a mobilního jazyka
5. Nádory orofaryngu (baze jazyka, patrové tonzily a nosní mandle)
6. Nádory slinných žláz
7. Odontogenní a maxillofaciální kostní tumory
8. Nádory ucha
9. Paragangliomy
10. Nádory a nádorovité léze krku a lymfatických uzlin

V České republice představují nádory hlavy a krku 6. nejčastější nádor u mužů a 17. u žen a incidence u obou pohlaví setrvale narůstá. Ročně je v ČR nově diagnostikováno cca 2000 nových pacientů se zhoubnými nádory hlavy a krku, z toho muži jsou postiženi 3× častěji než ženy. Nejčastěji jsou hlášeny nádory rtu a dutiny ústní, nádory hrtanu a hltanu - orofaryngu. Méně časté jsou zhoubné nádory hltanu - hypofaryngu, slinných žláz, dutiny nosní a paranasálních dutin a nádory nosohltanu [2]. V Evropě je výskyt nádorů hlavy a krku charakterizován stoupajícím množstvím od severu směrem ke Středozemnímu moři. Nejvyšší hodnoty jsou ve Švédsku a Anglii (9-10 na 100 000 obyvatel). Nejvyšší výskyt byl zaznamenán ve Francii, kde jsou nádory oblasti hlavy a krku stejně časté jako nádory plic (přibližně 50/100 000 obyvatel) [3].

Vznik karcinomů v oblasti hlavy a krku může být vyprovokován nejrůznějšími příčinami, nejvíce zde působí vlivy zevního prostředí. Převážná většina se vyskytuje u kuřáků cigaret (v tabákovém kouři je uváděno více než 40 karcinogenů). Časnější výskyt je prokázán při současném nadužívání tabáku a alkoholu. Relativní riziko pro vznik karcinomu je u těžkých pijáků 2 až 6× vyšší, při abusu tabáku je vyšší 5 až 25×. Karcinogenní účinek byl prokázán

také u marihuany. Při vzniku nádorů hlavy a krku hrají roli i některé typy virů, kromě viru Epsteinova a Barrova (EBV) spojovaného s nádory nosohltanu, jde zvláště o HPV (lidský papilomavirus) ve vztahu k nádorům orofaryngu. V rozsáhlé studii Castellsagué et al. (2016) byl na souboru 3680 pacientů prokázán vliv HPV infekce u 22,4 % orofaryngeálních karcinomů, u 4,4 % karcinomů dutiny ústní a u 3,5 % laryngeálních tumorů, což poukazuje na důležitou roli HPV infekce u orofaryngeálních karcinomů a současně ale ukazuje na výrazně nižší podíl u dalších nádorů hlavy a krku než se původně tvrdilo [4]. V práci Laco et al. (2015) byl zjištěn podíl high risk HPV infekce v etiopatogenezi signifikantní podskupiny (25 %) sinonazálních karcinomů [5]. Rizikovými faktory pro vznik nádorů ORL oblasti mohou být i karcinogenní látky v zaměstnání (dřevný prach, olovo, nikl, azbest, fluor, arzén, uhlovodíky v dehtu, sazích a průmyslových olejích). Malhygiena dutiny ústní je rizikovým faktorem pro vznik nádorů dutiny ústní, expozice ionizujícímu záření pak pro vznik nádorů slinných žláz. Dle randomizované studie dokonce stoupá incidence benigních i maligních nádorů parotis s počtem hovorových hodin mobilním telefonem [6]. U většiny nádorů se rizikové faktory především kombinují, příkladem je multifaktoriální etiopatogeneze nazofaryngeálního karcinomu, kde byl prokázán vliv genetických, infekčních, dietních a enviromentálních faktorů.

Histologické typy nádorů hlavy a krku jsou různorodé, ale v naprosté většině se jedná o spinocelulární karcinomy a různé jejich specifické podtypy (verukózní, bazaloidní, papilární, vřetenobuněčný). Další histologické typy jsou spíše orgánově specifické. Příkladem mohou být v oblasti nosu a paranazálních sinusů sinonazální nediferencovaný karcinom, NUT karcinom, adenokarcinom intestinálního/neintestinálního typu, teratokarcinosarkom, sinonazální papilomy, REAH; v oblasti nazofaryngu zejména nazofaryngeální karcinom nebo nazofaryngeální angiofibrom. Samostatnou kategorii tvoří nádory slinných žláz, které se nevyskytují jen ve velkých, ale i v malých slinných žlázách v různých lokalitách a dále odontogenní nádory jak maligní (odontogenní karcinomy a sarkomy), tak benigní (ameloblastom, CEOT, odontom, ameloblastický fibrom, odontogenní fibrom), nebo různé typy odontogenních a neodontogenních cyst (radikulární, folikulární, odontogenní keratocysta). V oblasti hlavy a krku se mohou vyskytnout i různé typy mezenchymových nádorů, hematolymfoidní tumory, orální slizniční melanom nebo karcinom z Merkelových buněk [1].

1.2 Maligní nádory dutiny ústní a orofaryngu

Maligní nádory dutiny ústní představují asi 30 % všech nádorů hlavy a krku. Histologicky se v 95 % případů jedná o spinocelulární karcinom [7]. V celosvětových statistikách, ve kterých se spinocelulární karcinom dutiny ústní (OSCC) uvádí dohromady s karcinomem hltanu, jde o šestý nejčastější zhoubný nádor. Ročně je diagnostikováno přibližně 300 000 nových případů OSCC, z toho asi 2/3 případů připadají na rozvojové země. Oblasti charakteristické vysokou incidencí jsou jižní a jihovýchodní Asie, východní Evropa a část latinské Ameriky [8]. V České republice dosáhla incidence a úmrtnost na rakovinu ústní dutiny a hltanu v roce 2016 hodnoty 1 654, resp. 756. Téměř polovina nově diagnostikovaných případů byla ve IV. stadiu onemocnění. U mužů, s výjimkou nemelanomových nádorů kůže, patří SCC ústní dutiny, hltanu a hrtanu mezi šest nejčastějších novotvarů z hlediska incidence a představuje pátou nejčastější příčinu úmrtí na rakovinu [2]. Více než 95 % OSCC vzniká u pacientů starších 40 let, muži jsou oproti ženám postiženi 2x častěji [9]. Hlavními rizikovými faktory jsou kouření, abusus alkoholu a žvýkání betelu [10]. Těžcí kuřáci a uživatelé alkoholu mají až 38x větší riziko vzniku nádoru oproti nekuřákům a abstinentům [8]. Lidský papillomavirus (HPV) hraje důležitou roli u karcinomu orofaryngu. V případě OSCC je role HPV méně důležitá, přičemž orálních karcinomů, které lze přičíst HPV, jsou asi 4 % případů [4]. Ukazuje se, že část orofaryngeálních karcinomů může souviset s anogenitální infekcí HPV, přičemž se uplatňuje nejen sexuální aktivita, ale i možnost autoinokulace [11]. HPV infekce je zároveň nezávislým příznivým prognostickým faktorem, čemuž odpovídá i možnost deescalace dávky radioterapie u HPV asociovaných nádorů orofaryngu [12].

1.3 Potenciálně maligní nemoci dutiny ústní (OPMD)

Potenciálně maligní nemoci dutiny ústní (OPMD) jsou klinické projevy, které nesou určité riziko rozvoje karcinomu dutiny ústní. Celková prevalence OPMD celosvětově je kolem 4,5 %. Zahrnují celou řadu stavů (tab. 1), ale nejčastěji se vyskytující léze tvoří leukoplakie a erytroplakie [1,13-20].

Tab. 1. Potenciálně maligní nemoci dutiny ústní dle WHO [El-Naggar et al., 2017]

Leukoplakie	Chronická kandidóza
Erytroplakie	Lichen planus
Erytroleukoplakie	Diskoidní lupus erythematosus
Orální submukózní fibróza	Syfilitická glositida
Dyskeratosis congenita	Aktinická keratóza (pouze ret)

1.4 Histologie orálních a orofaryngeálních karcinomů

Nejčastějším histologickým typem maligních nádorů dutiny ústní je spinocelulární karcinom, jehož histologická verifikace většinou není obtížná. V případě diagnostické nejistoty lze použít imunohistochemické metody (pozitivita p63, p40) k potvrzení původu nádoru z dlaždicového epitelu. Spinocelulární karcinom může být kromě klasické formy, která je nejčastější, rozdělen do několika podtypů, jejich výskyt je ale méně častý (tab. 2) [1].

Tab. 2. Subtypy spinocelulárního karcinomu dutiny ústní dle WHO [El-Naggar et al., 2017]

Bazaloidní SCC
Vřetenobuněčný SCC
Adenoskvamózní karcinom
Carcinoma cuniculatum
Verukózní SCC
Lymfoepitelový karcinom
Papilární SCC
Akantolytický SCC

1.5 Histopatologické prognostické faktory

Ke stanovení prognózy orálních spinocelulárních karcinomů existuje celá řada histopatologických parametrů, které se běžně stanovují při odečítání patologických vzorků resekátů a mohou mít dopad na pooperační onkologickou léčbu [21]. Patří k nim histologický typ a stupeň diferenciacie nádoru, lokalizace, velikost, hloubka invaze, intravaskulární a perineurální invaze, pozitivita resekčních okrajů a vzdálenost nádoru od okrajů, metastázy

v regionálních lymfatických uzlinách a extrakapsulární šíření, invaze a typ invaze do kosti (tab. 3). Kromě toho se hledají a vyvíjejí i molekulární prognostické faktory, které mohou pomoci ve stratifikaci prognostického rizika u jednotlivých pacientů s OSCC, nebo mohou mít i význam v indikaci nových terapeutických možností.

Tab. 3. Tabulka histopatologických znaků nádorů hlavy a krku na ÚKMP FN a LF UP Olomouc

<i>Histopatologické prognostické faktory orofaryngeálních nádorů – KLINIKA ÚČOCH a ÚKMP FNOL a LF UP</i>				
Jméno	Příjmení	Pohlaví	Datum narození	Rodné číslo
Datum přijetí preparátu	Datum popisu preparátu	Jméno patologa	Jméno operátora	Číslo preparátu
Klinické TNM	Předchozí chemoterapie (ano, ne, nevím)	Předchozí radioterapie (ano, ne, nevím)	Primární nádor, recidiva	Rekonstrukce defektu ANO/NE
Primární tumor	Lokalita tumoru, strana	Histologický typ nádoru	Perineurální invaze ANO/NE	Positivita okrajů ANO/NE
	Velikost nádoru v (mm)	Maximální hloubka invaze	Invaze do kosti ANO/NE	Vzdálenost okrajů slizničních/horizontálních
	Diferenciace nádoru	perivaskulární invaze	Typ invaze do kosti	Vzdálenost okrajů ve tkáni/vertikálních
		ANO/NE		
Mízní uzliny	Pravostranná krční bloková direkce		Levostranná krční bloková direkce	
	Exenterované uzliny z oblastí	IA, IB, IIA, III, IV, V	Exenterované uzliny z oblastí	IA, IB, IIA, III, IV, V
	Celkový počet uzlin		Celkový počet uzlin	
	Celkový počet metastatických uzlin		Celkový počet metastatických uzlin	
	Lokalizace metastatických uzlin dle regií	IA, IB, IIA, III, IV, V	Lokalizace metastatických uzlin dle regií	IA, IB, IIA, III, IV, V
	Rozměr metastatických uzlin		Rozměr metastatických uzlin	
	Extrakapsulární šíření	ANO/NE	Extrakapsulární šíření	ANO/NE
	<i>Mikroskopické</i>	ANO/NE	<i>Mikroskopické</i>	ANO/NE
<i>Makroskopické</i>	ANO/NE	<i>Makroskopické</i>	ANO/NE	
Celkové zhodnocení	pTNM		Stadium onemocnění	
Imunohistochemie	p16, p53, EGFR			

1.5.1 Lokalizace nádoru

Nejčastější lokalizace OSCC je na spodině dutiny ústní a na jazyku, v oblasti maxilly je to tvrdé patro. V studii Sundermann et al. (2018) byla prokázána signifikantní korelace mladšího věku a ženského pohlaví s výskytem nádorů v oblasti maxilly a jazyka [22]. V asijské populaci OSCC nejčastěji postihuje sliznici tváře, zejména kvůli žvýkání tabáku a betelu. Lokalizace primárního nádoru ovlivňuje jeho časné klinické projevy a tím včasnou diagnostiku a vlastní prognózu. Z karcinomů orofaryngu mají horší prognózu karcinomy kořene jazyka než nádory tonsily [23]. Nízkým stadiem v době diagnózy se vyznačují převážně nádory dolního rtu, většina nádorových lézí jazyka bývá naopak diagnostikována v pokročilém stadiu. Většina nádorů spodiny dutiny ústní a měkkého patra jsou klasifikovány jako pT4. Ukazuje se, že jazyk, měkké patro a spodina úst jsou spojeny s nejhorší prognózou OSCC [24]. Spinocelulární karcinom jazyka a ústní spodiny má obvykle špatnou prognózu v důsledku časté přítomnosti cervikálních metastáz, horší dostupnosti a pozdního hlášení pacientů [25].

1.5.2 Velikost a hloubka invaze nádoru

Velikost nádoru značně ovlivňuje prognózu pacientů s OSCC. Kromě velikosti nádoru, která byla až do 7. edice TNM klasifikace jediným určujícím faktorem stádií pT1-pT3, je důležitá také hloubka invaze. To vedlo v nové 8. edici TNM klasifikace maligních nádorů k zavedení hloubky invaze jako dalšího kritéria nádorového stagingu (pT) kromě prosté velikosti nádoru (viz tab. 4) [26]. Hloubka invaze je relativně spolehlivým parametrem pro predikci postižení lymfatických uzlin a celkové přežití pacientů s OSCC. Problémem může být určení „cutoff“ (kritické hodnoty) hloubky invaze, která může být rozdílná u různých lokalizací v dutině ústní. Pro OSCC je průměrná kritická hloubka invaze 4 mm a tyto pacienti by měli podstoupit elektivní krční disekci, vzhledem k zvýšenému riziku postižení regionálních lymfatických uzlin [27,28].

Tab. 4. TNM klasifikace (pT) karcinomu rtu, dutiny ústní a pohyblivé části jazyka (8. vyd. TNM) [Brierley et al., 2017]

TX: primární nádor nelze hodnotit
T0: bez známek primárního nádoru
Tis: karcinom in situ
T1: nádor do 2 cm včetně v největším rozměru a do 5 mm včetně v hloubce invaze
T2: nádor do 2 cm včetně v největším rozměru a více než 5 mm, ale méně než 10 mm v hloubce invaze nebo nádor větší než 2 cm, do 4 cm včetně v největším rozměru a hloubka invaze do 10 mm
T3: nádor větší než 4 cm v největším rozměru nebo více než 10 mm v hloubce invaze
T4a: <i>ret:</i> nádor zasahuje do kortikalis kosti, dolního alveolárního nervu, spodiny dutiny ústní nebo kůže (brady či nosu) <i>dutina ústní:</i> nádor zasahuje do kortikalis mandibuly nebo do čelistní dutiny nebo kůže tváře
T4b: nádor zasahuje do fossa infratemporalis (prostoru žvýkacích svalů), křídlovitých (pterygoidních) výběžků kosti klínové či baze lební nebo obrůstá a. carotis int.

1.5.3 Nádorový grading

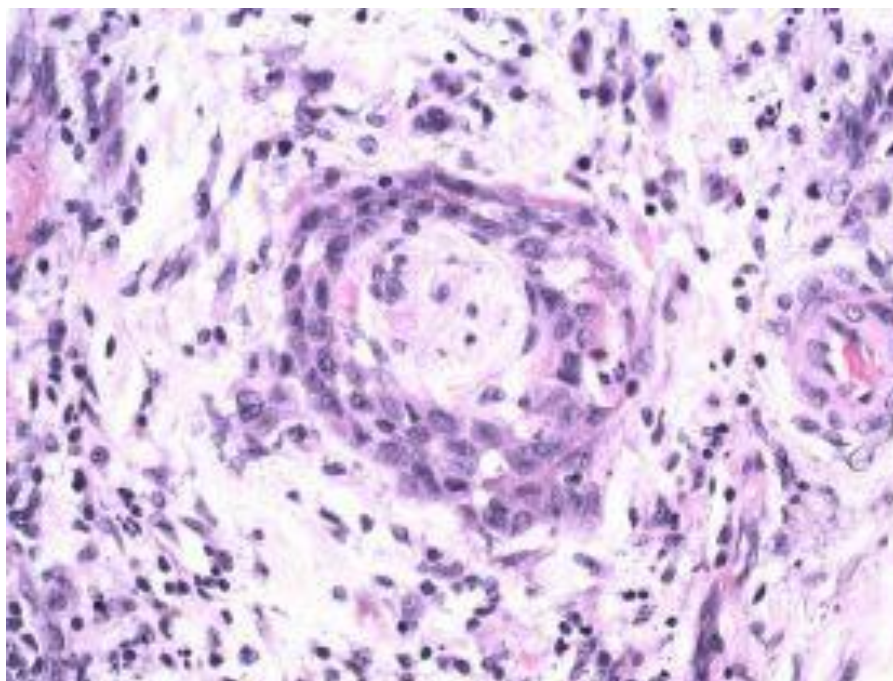
Nádorový grade byl poprvé popsán v roce 1920, později byla navržena nová schémata k jeho standardizaci (např. Akhter et al., 2011). Je založen na vyhodnocování stupně keratinizace, buněčného a jaderného polymorfizmu a mitotické aktivity. WHO klasifikace rozlišuje tři stupně diferenciaci: G1-G3 (dobře, středně a nízce diferencovaný), přičemž nízce diferencované nádory jsou spojeny s horší prognózou. Grading samotný může být nezávislý prognostický faktor OSCC, ale nízce diferencované nádory jsou i častěji spojeny s perineurální a lymfovaskulární invazí. Navíc, nízce diferencované nádory rostou spíše v podobě prstovitých výběžků, malých ostrůvků nebo disperzních jednotlivých buněk v invazivním čele nádoru, s větším rizikem positivity resekcčních okrajů a tím horší prognózou [29-34].

1.5.4 Perineurální invaze

Perineurální invazi (PI) můžeme definovat jako invazi nádoru v blízkosti nervu, zahrnující alespoň 1/3 obvodu nervu a/nebo vykazující přítomnost nádorových buněk v kterékoli ze tří nervových vrstev. Tato klasifikace bohužel nerozlišuje mezi perineurální

proliferací bez infiltrace nervového fasciklu a intraneurální propagací nebo pronikáním buněk přímo do nervu, což může mít přímý klinický dopad a ovlivnit prognózu pacienta [35]. Infiltrace perineurálních prostorů se vyskytuje až v 52 % OSCC. Je zprostředkována adhezivní molekulou nervových buněk (NCAM) na povrchu nádorových buněk, která se váže na receptory NCAM (exprimované neurální a perineurální tkání) [36]. Přítomnost perineurální invaze v primárním nádoru je prediktorem cervikálních metastáz a lokoregionální recidivy. Centripetální a centrifugální šíření nádorových buněk podél perineurálních prostorů a mimo primární nádor je zodpovědné za lokální recidivu [37]. U většiny nádorů je možné až 2 cm šíření nádorových buněk podél perineurálního prostoru, takže maligní buňky se takhle vyhýbají chirurgické excizi a radioterapii a mají tím za následek lokální recidivu. Vztah mezi PI a prognózou je nezávislý na průměru nervu, takže ve všech případech OSCC by měl být patologický vzorek vyšetřen ohledně přítomnosti event. perineurální invaze, i v nervech menších než 1 mm v průměru [38-52] (obr. 1).

Obr. 1. Perineurální šíření OSCC (HE, zvětšení 100×)



1.5.5 Vaskulární invaze

Vaskulární invaze je definována jako přítomnost neoplastických buněk v prostoru lemovaném endotelovými buňkami. Vyskytuje se u více než 50 % spinocelulárních karcinomů

hlavy a krku. To koreluje s přítomností konkomitantních cervikálních metastáz a vykazuje zvýšené riziko vzdáleného metastatického onemocnění [49]. Kůže obličeje a vlasaté části hlavy je nejčastěji postižena metastázami, což naznačuje, že krevní cévy a způsob inervace může ovlivnit šíření metastáz [53,54].

1.5.6 Histologický podtyp spinocelulárního karcinomu

Prognóza OSCC se liší i v závislosti na histologickém subtypu spinocelulárního karcinomu.

Bazaloidní SCC: high grade karcinom, četnější metastázy, ale celková prognóza srovnatelná s konvenčním SCC.

Vřetenobuněčný SCC: horší prognóza než konvenční SCC, typicky vzniká jako postradiační recidiva nebo jako duplicita.

Adenoskvamózní karcinom: vysoce infiltrativní a agresivní, četné metastázy, horší prognóza než konvenční SCC.

Carcinoma cuniculatum: dobře diferencovaný, obvykle na mukoperiostu, lokálně destruktivní, recidivuje lokálně, ale vzácně, jestli vůbec metastazuje.

Verukózní SCC: dobře diferencovaná, nemetastazující varianta s expanzivní povrchovou invazí, exofytický, postrádá výraznější atypie, dobrá prognóza; může progredovat do invazivního konvenčního SCC.

Lymfoepitelový karcinom: vzácný, obvykle diagnostikován ve vysokém stadiu, 70 % spojených s metastázami v regionálních lymfatických uzlinách; ne všechny jsou EBV pozitivní.

Papilární SCC: keratinizující a nekeratinizující typ, často vyrůstá na gingivě, lepší prognóza než konvenční SCC

Akantolytický SCC: vysoce riziková kožní varianta, která se může objevit na rtu; akantolýza může rezultovat v adenoidní vzhled u níže diferencovaných intraorálních SCC.

Lze tedy říct, že prognosticky nejpříznivějším podtypem spinocelulárního karcinomu je jeho verukózní forma s nízkým sklonem k metastazování. Naopak, adenoskvamózní, vřetenobuněčná, bazaloidní forma a lymfoepitelový karcinom se vyznačují agresivnějším chováním a častějším metastazováním [55-69].

1.5.7 Resekční okraje resektátu

Pozitivita resekčního okraje je jedním z nejdůležitějších prognostických znaků a zásadním způsobem má vliv na výskyt pooperačních recidiv nádoru. Hodnotí se jednak horizontální okraj (nejen slizniční, ale i v hloubce měkkých tkání), jednak spodina resektátu. Pro následnou onkologickou terapii i z hlediska prognostické stratifikace má význam dělení resekčních okrajů na volný, těsný a pozitivní. Jako volný okraj označujeme odstranění nádoru, jehož vzdálenost od okraje je minimálně 5 mm. Vzdálenost nádoru od okraje méně než 5 mm a více než 1 mm se označuje jako těsný okraj. Pozitivní okraj znamená přítomnost nádorových buněk přímo v resekčním okraji, ale i vzdálenost nádoru do 1 mm od okraje. Peroperační kryostatové vyšetření pro stanovení stavu resekčních okrajů může snížit míru lokální recidivy, která se u pozitivních okrajů pohybuje v rozmezí 64-84 %. Pacienti s volnými okraji mají průměrnou míru 5letého přežití 69 %, ve srovnání s 58 % u těsných a 38 % u pozitivních okrajů [70-74]. Okraje nádoru můžeme dále klasifikovat jako klinické okraje, chirurgické okraje, histologické okraje a molekulární okraje. Právě molekulární okraje mohou představovat nejpřesnější posouzení skutečného odstranění léze do „molekulárně zdravé tkáně“, s minimálním rizikem pooperační recidivy. Molekulární okraje představují posouzení genetických abnormalit na subcelulární úrovni v morfoloicky normálních buňkách. V souvislosti s tím proběhlo několik studií s cílem posoudit molekulární okraje resektátu. Brennan et al. vyšetřovali mutace p53 v histologicky negativních resekčních okrajích a zjistili, že 52 % pacientů nese mutace p53 v negativních resekčních okrajích, z nich u 38 % nastala lokální recidiva [75]. Ball et al. hodnotili nadměrnou expresi p53 v okrajích pomocí imunohistochemie a zjistili 5,3x větší riziko lokální recidivy v případech, kdy alespoň jeden okraj vykazoval nadměrnou expresi p53 [76]. Shaw et al. vyšetřovali metylaci promotorů 4 genů (p16, cytoglobin, E-cadherin, TMEFF2) a u 26 případů zjistili pozitivitu metylace promotoru, což poukázalo na submikroskopické genetické změny v negativních okrajích [77]. Franklin et al. zase zjistili, že nadměrná exprese eukaryotického translačního iniciačního faktoru 4E (eIF4E) v oblasti resekčního okraje, který se uplatňuje jako onkogen v časných stádiích karcinogeneze, může předpovídat větší riziko lokální recidivy [78].

1.5.8 Uzlinové metastázy a ECS

V souvislosti s hodnocením regionálních lymfatických uzlin se zdůrazňuje nejen vlastní pozitivita lymfatické uzliny, ale i další faktory, které mají vliv na celkovou prognózu [79].

Počet pozitivních lymfatických uzlin: Pozitivní lymfatické uzliny poskytují jeden z nejjednodušších a možná nejdůležitějších prognostických markerů u nádorů hlavy a krku. Počet pozitivních lymfatických uzlin vykazuje silnou korelaci s přežíváním. Rovněž indikuje riziko regionální recidivy a vzdálených metastáz. Relativní význam extrakapsulárního šíření (ECS) oproti počtu pozitivních uzlin zůstává poněkud kontroverzní. Moe et al. zjistili, že ECS, že počet pozitivních uzlin, byl nezávislým prediktorem špatného přežití [80].

Extrakapsulární šíření: ECS se vyskytuje u přibližně 60 % pacientů s pozitivními cervikálními uzlinami a má zásadní význam pro predikci prognózy pacientů. Pro význam ECS svědčí i zavedení tohoto kritéria do 8. edice TNM klasifikace (2017), v předešlé 7. edici se toto kritérium neobjevilo (tab. 5).

Rozsah ECS: Rozsah ECS lze rozdělit do následujících tří úrovní na základě morfologie postižených krčních lymfatických uzlin:

- a) Makroskopické extrakapsulární šíření s postižením sousedních anatomických struktur, jako je vnitřní jugulární žíla nebo kosterní sval;
- b) Makroskopické extrakapsulární šíření omezené na perinodální fibroadipózní tkáň;
- c) Mikroskopické extrakapsulární šíření. ECS je významným determinantem prognózy vzhledem k jeho spojení se zvýšeným rizikem recidivy na krku a vzdálenými metastázami. Přítomnost makroskopického ECS je spojena s trojnásobným rizikem recidivy na krku. U pacientů s makroskopickým ECS je 1,5-krát větší pravděpodobnost vzniku regionální recidivy ve srovnání s pacienty s mikroskopickým ECS. Šíření nádoru mimo pouzdro uzliny vyjadřuje míru agresivity vlastního nádoru [80-82].

Anatomická lokalizace uzlin: Mamelle et al. definovali sentinelové lymfatické uzliny jako skupiny uzlin, které poskytují primární lymfatickou drenáž pro konkrétní místo na hlavě a krku. Sentinelové lymfatické uzliny pro nádory ústní dutiny představují uzliny v regio I, II, III (obr. 2). Když je patrna přítomnost nodálních metastáz mimo sentinelovou lymfatickou uzlinu, dochází k poklesu 5leté míry přežití o 50 %. Přítomnost pozitivních lymfatických uzlin v dolní části krku ukázala, že riziko vzdálených metastáz vzrostlo o 33 % [79].

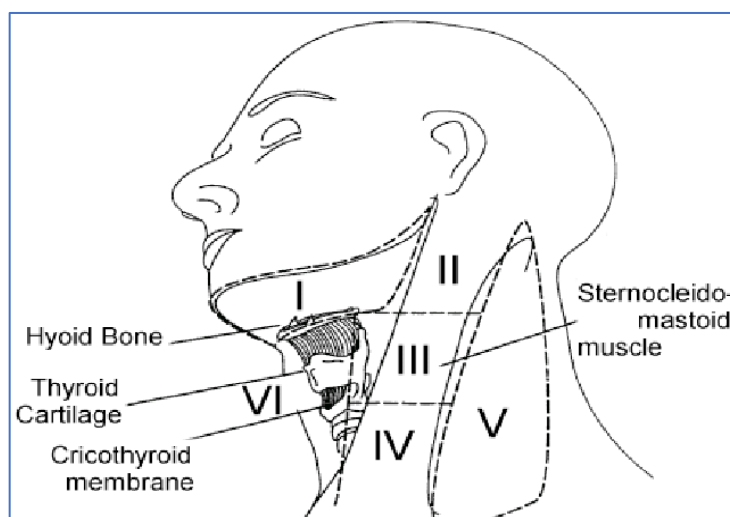
Velikost uzliny: Průměr největší metastatické cervikální lymfatické uzliny koreluje s pN stadiem TNM klasifikace pro OSCC (tab. 5). Carter et al. uvádějí, že když je velikost metastatické uzliny větší než 2 cm v průměru, existuje zvýšené riziko regionální recidivy [79].

Tab. 5. TNM klasifikace (pN) karcinomu rtu, dutiny ústní a pohyblivé části jazyka (8. vyd. TNM) [Brierley et al., 2017]

NX: regionální lymfatické uzliny nelze hodnotit
N0: regionální lymfatické uzliny bez metastáz
N1: metastáza v jediné stejnostranné lymfatické uzlině do 3 cm včetně v největším rozměru bez šíření mimo uzlinu
N2a: metastáza v jediné stejnostranné lymfatické uzlině do 3 cm včetně v největším rozměru se šířením mimo uzlinu, nebo větší než 3 cm, do 6 cm včetně v největším rozměru, bez šíření mimo uzlinu
N2b: metastáza(y) ve více stejnostranných lymfatických uzlinách do 6 cm včetně v největším rozměru bez šíření mimo uzlinu
N2c: metastáza(y) v oboustranných nebo druhostranných lymfatických uzlinách do 6 cm včetně v největším rozměru bez šíření mimo uzlinu
N3a: metastáza v lymfatické uzlině větší než 6 cm v největším rozměru bez šíření mimo uzlinu
N3b: metastáza(y) v lymfatické uzlině větší než 3 cm v největším rozměru se šířením mimo uzlinu, nebo metastáza(y) ve více stejnostranných nebo druhostranných nebo oboustranných lymfatických uzlinách se šířením mimo uzlinu

Obr. 2. Úrovně lymfatických uzlin dle regií.

Převzato z: A Brief History of Cervical Lymphadenectomy-Scientific Figure on ResearchGate. Available from: https://www.researchgate.net/figure/Lymph-node-levels-of-the-neck-as-first-defined-and-applied-by-the-Memorial-Hospital-head_fig1_221925267 [accessed 6 Jun, 2019]



1.5.9 Invaze do skeletu

Vzhledem k intimnímu vztahu k čelistním kostem a poměrně rychlému růstu, spinocelulární karcinomy poměrně často invadují do kostní tkáně (zejména gingivální karcinomy) [83]. Karcinomy, které prorůstají přes kortikalis jsou podle dnešní TNM klasifikace zařazeny do patologického stadia pT4a. Nález povrchové eroze kosti/zubního lůžka primárním nádorem dásně neopravňuje ke klasifikaci nádoru pT4 [26]. Invaze do maxilly/mandibuly může být dnes preoperačně částečně diagnostikována pomocí radiologických metod. Ty ale nedokážou spolehlivě odlišit, jestli tumor způsobuje invazivní resorpci kosti nebo jestli je tumor pouze v kontaktu s kostí, ale nevykazuje invazivní progresi do kosti. To znamená, že radiologická diagnostika samotná je nedostačující a je potřebný vývoj nových diagnostických technik, které umožní přesné zhodnocení rozsahu kostní invaze [84].

Histologicky rozeznáváme 3 typy kostní invaze: erozivní, infiltrativní a smíšený. Infiltrativní forma je charakterizována tvorbou nepravidelných hnízd a výběžků nádorových buněk směrem do kosti, jejich penetrací do Haversova systému a přítomností reziduálních kostních ostrůvků uvnitř tumoru. Erozivní forma kostní invaze je naopak charakterizována ostrým přechodem mezi tumorem a kostí, osteoklastickou kostní resorpcí, fibrózou podél tumoru a absencí kostních ostrůvků uvnitř nádoru. Smíšená forma kombinuje oba typy invaze [84-86].

Histologický charakter kostní invaze koreluje s klinickým chováním nádoru, infiltrativní léze mají větší pravděpodobnost primární, regionální nebo vzdálené recidivy. Invaze spinocelulárního karcinomu do kosti je histologický parametr, který zásadně určuje typ a rozsah onkologické léčby (resekci dolní čelisti) - erozivní forma kostní invaze může být léčena marginální mandibulektomií spíše než segmentální resekci [7]. Pooperační patologické zhodnocení typu kostní invaze poskytuje důležitou prognostickou informaci, proto by mělo být uvedeno v každé patologické zprávě u případů karcinomů s kostní invazí.

Molekulární mechanizmy kostní invaze

Aktivace osteoklastů resorbujících kost se jeví jako nejdůležitější při kostní invazi OSCC, také označovaná jako osteoklastogeneze [87-91]. Za fyziologické situace jsou kost resorbující osteoklasty a kost tvořící osteoblasty v rovnováze. Osteoklastogeneze může být aktivována několika způsoby, například aktivací osteoklastů řízenou dráhou RANK-RANKL-OPG, VEGF nebo mědí [92-95].

A) Působení RANKL-RANK-OPG

Kostní resorpce osteoklasty je důležitý krok v procesu kostní invaze. V regulaci osteoklastogeneze jsou důležité 3 klíčové molekuly: RANKL (exprimován na osteoblastech a stromálních buňkách kostní dřeně), jeho receptor RANK (na povrchu osteoklastických progenitorů a maturovaných osteoklastů) a jeho „falešný“ receptor osteoprotegerin - OPG (syntetizován osteoblasty a stromálními buňkami). Interakce mezi RANKL a RANK indukují diferenciaci z osteoklastických prekurzorů v osteoklasty. Rovnováha mezi RANKL a OPG je klíčová pro regulaci diferenciaci a funkce osteoklastů.

Nádorové buňky orálních spinocelulárních karcinomů produkují několik cytokinů jako je TGF- β , IL-1 β , IL-6, IL-11, IL-18, TNF α a PTHrP. Z výsledků studie Shibihara et al. (2005) vyplývá, že některé z nich (IL-6, IL-11, TNF α a PTHrP) jsou ve zvýšené míře exprimovány u nádorů s kostní invazí a tím hrají důležitou roli v procesu kostní invaze. Orální spinocelulární karcinomy poskytují vhodné mikroprostředí pro osteoklastogenezi nejenom produkcí IL-6 a PTHrP, ale i stimulací stromálních buněk k syntéze IL-6. To znamená, že stromální buňky regulují tvorbu osteoklastů indukovanou orálními spinocelulárními karcinomy. IL-6 a PTHrP produkované nádorovými buňkami a IL-6 produkovaný stromálními buňkami indukují osteoblasty a fibroblasty k syntéze RANKL a ty následně indukují tvorbu osteoklastů. Během kostní destrukce osteoklasty uvolňují různé růstové faktory, jako je IGF-1, FGF a TGF- β , které se ukládají do mineralizované kostní matrix. Tyto růstové faktory obohatí lokální mikroprostředí obklopující nádorové buňky, které exprimují receptory pro tyto růstové faktory a stimulují nádorové buňky k proliferaci a inhibují jejich apoptózu. Tento tzv. bludný kruh vysvětluje další šíření nádoru v kosti [96-100]. TGF- β a epidermální růstový faktor (EGF) jsou účinnými efekty epitelově-mesenchymální tranzice (EMT) – klíčového kroku v kostní invazi maligními epitelovými buňkami. EMT způsobuje, že se rakovinové buňky stávají více migratorními, což vede k invazi do stromatu, intravazaci a diseminaci [101-102]. Při EMT je exprese hlavní adhezivní molekuly epitelových buněk, E-cadherinu, potlačena expresí Snail, transkripčním represorem E-cadherinu a nádorové buňky tvořící nádorová hnízda tak ztrácejí vzájemný kontakt a jsou disociována. TGF- β indukuje EMT a působení TGF- β nejen potlačuje expresi E-cadherinu, ale také indukuje expresi mesenchymových markerů. Nedávné studie dále potvrdily, že rakovinové buňky s TGF- β signálem indukují matrix metaloproteinázy a generují nádorové kmenové buňky a fibroblasty spojené s karcinomem. Proto se očekává, že detekce EMT nebo EMT markerů, zahrnující snížení nebo ztrátu exprese E-cadherinu nebo indukci exprese N-cadherinu, Snail

a vimentinu v nádorových buňkách, bude hrát významnou roli v prognostických predikcích u pacientů s karcinomy [103]. EMT je také důležitý v progresi kostní invaze OSCC [104]. Ztráta E-cadherinu v nádorových buňkách může být využita monocyty k diferenciaci na osteoklasty, což dále vysvětluje základní mechanismy kostní invaze OSCC, které mohou poskytnout vodítka pro budoucí molekulární bioterapie [105]. Schematické znázornění mechanismů kostní invaze ukazuje obrázek 3.

B) VEGF

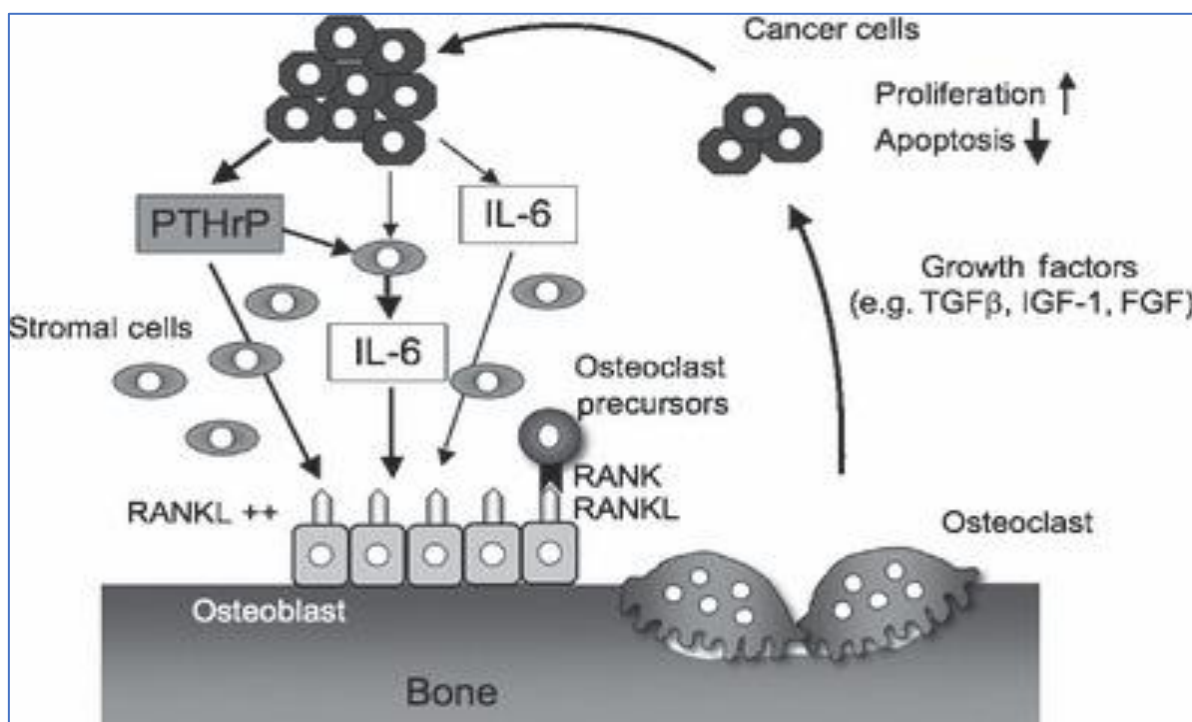
Vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF) je vysoce specifický signální protein pro vaskulární endotelové buňky, který hraje klíčovou roli v růstu nádorů a invazi prostřednictvím angiogeneze a může přispívat k buněčné migraci a aktivaci pre-osteoklastů, osteoklastů a některých nádorových buněk. Signalizace VEGF-Flt-1 indukuje osteoklastogenezi v OSCC dvěma způsoby:

- 1) VEGF produkovaný z buněk OSCC může přímo stimulovat Flt-1 dráhu v pre-osteoklastech, vedoucí k indukci jejich migrace do následné oblasti resorpce kosti a diferenciaci na osteoklasty.
- 2) Signalizace VEGF-Flt-1 „upreguluje“ expresi RANKL v buňkách OSCC, což nepřímo vede k diferenciaci osteoklastů [94].

C) Měď a lysyl oxidáza

Bylo prokázáno, že měď hraje klíčovou úlohu v remodelaci skeletu. Úloha mědi při destrukci kosti spojené s nádorem však není známa. Lysyl oxidáza (LOX) je enzym závislý na mědi, který podporuje osteoklastogenezi. Morisawa a kol. zkoumal účinky mědi na OSCC s kostní invazí pomocí chelátoru mědi, tetratiomolybdátu amonného (TM). Bylo prokázáno, že TM blokuje proliferaci buněk OSCC, inhibuje aktivaci LOX a snižuje expresi RANKL v osteoblastech a osteocytech, což následně potlačuje destrukci kosti [95].

Obr. 3. Molekulární mechanizmy kostní invaze. Převzato z Jimi et al.: The cellular and molecular mechanisms of bone invasion by oral squamous cell carcinoma. Oral diseases (2011) 17, 462-468.



1.5.10 Molekulární prognostické faktory

1.5.10.1 p53

p53 je transkripční faktor s funkcí tumor supresorového genu, který negativně reguluje buněčný cyklus a slouží k ochraně integrity genomu. Nachází se na chromozomu 17p1. p53 zprostředkovává zastavení G1 fáze během buněčného cyklu. Indukce p53 také vede k apoptóze. Proto p53 chrání buňku před množением mutací do dalších generací a je považován za „strážce genomu“. Když je DNA poškozena fyzikálními a/nebo chemickými faktory, transkripce genu p53 je zvýšena a „wild type“ protein p53 je koncentrován, což má za následek zastavení buněčného cyklu ve fázi G1/S a apoptózu nádorových buněk. Když je gen p53 mutován, mutantní protein p53 ztrácí svou funkci inhibice nádoru a podporuje transformaci normálních buněk na maligní buňky. Ukazuje se, že u pacientů s OSCC a mutacemi p53 je vyšší pravděpodobnost vzniku lokoregionální recidivy způsobené přítomností pozitivních krčních lymfatických uzlin. Jiné studie ale význam p53 jako významného determinanta prognózy nepotvrdily [106-119].

1.5.10.2 Faktory související s angiogenezí

Angiogeneze, růst nových krevních cév, je komplexním jevem, který je naprosto nezbytný pro pokračující růst a přežití solidních nádorů. Bez nových krevních cév, které by poskytovaly živiny a odstraňovaly odpadní látky, by nádory nemohly růst o více než 2-3 mm v průměru. Tvorba nových krevních cév z již existujícího endotelu umožňuje růst nádorů mimo primární nádorové ložisko. Bylo prokázáno, že mnoho růstových faktorů a cytokinů podporuje angiogenezi. Rodina vaskulárního endotelového růstového faktoru (VEGF) hraje klíčovou roli v angiogenezi a VEGFC v lymfangiogenezi. Zvýšená mikrovaskulární denzita (MVD) koreluje s rizikem metastatického postižení cervikálních lymfatických uzlin a zvýšeným rizikem lokoregionální recidivy u orálních karcinomů. Angiogenní aktivita může být hodnocena pomocí imunohistochemických proteinů jako je faktor VIII, CD31, CD34 a CD105. Studie uvádějí, že zvýšená exprese těchto markerů neovaskularizace silně koreluje s horším celkovým přežitím a kratší dobou bez nemoci, což naznačuje, že proliferující endotelová složka může být důležitým determinantem chování nádoru [120-129].

1.5.10.3 Ki-67

Ki-67 je marker buněčné proliferace popsáný poprvé v roce 1983. Jde o labilní, nehistonový jaderný protein exprimovaný ve fázích G1, S, G2 a M buněčného cyklu, poté je rychle katabolizován na konci M fáze a je nedetekovatelný v G0 a časných G1 buňkách. Obecně jsou nádory s vyšším proliferačním indexem považovány za agresivnější ve svém chování. U nádorů dutiny ústní a orofaryngu jsou výsledky studií různorodé, ale ukazuje se, že i u OSCC může být zvýšená detekce Ki-67 považována za nepříznivý prognostický faktor a indikátorem možného selhání terapie [130-138].

1.5.10.4 EGFR

EGFR je transmembránový receptor, který indukuje aktivitu tyrosinkinázy ovlivňující růst buněk. Je aktivován epidermálním růstovým faktorem (EGF) a transformujícím růstovým faktorem alfa (TGF α). EGFR i TGF α jsou často nadměrně exprimovány v OSCC. Expese EGFR může také modulovat nádorovou radiorezistenci. Klinické studie prokázaly korelaci nadměrné exprese EGFR se špatnou prognózou a radiační rezistencí [139-141].

1.5.10.5 Cytokeratin 8/18

Expese cytokeratinu 8/18 v orálních spinocelulárních karcinomech je nezávislým prognostickým markerem a indikuje pokles celkového přežití a doby bez progresu. Byla prokázána významná asociace mezi expresí CK8/18 a vyšším nádorovým gradem, deregulací proteinů buněčného cyklu a převažující lokalizací nádorů na spodině dutiny ústní [142].

1.5.10.6 Lidský papilomavirus (HPV)

Běžným kmenem HPV asociovaným s OSCC je typ HPV 16 (63,5 %), následovaný typem HPV 18 (30,8 %). Přítomnost HPV infekce významně koreluje s lepším přežitím u pacientů s OSCC. Toto lepší přežití je přičítáno skutečnosti, že nádorové buňky infikované HPV jsou radiosenzitivnější ve srovnání s HPV negativními nádorovými buňkami [143-150].

2. Cíl projektu

V dizertační práci jsem se věnoval posouzení vybraných prognostických histologických znaků orálních spinocelulárních karcinomů a prognostického vlivu typu kostní invaze u OSCC, kde jsme se zaměřili na srovnání typu kostní invaze ve vztahu k histopatologickým faktorům (stupeň diferenciacce nádoru, velikost nádoru, postižení regionálních lymfatických uzlin) a klinicko-patologickým faktorům (výskyt recidiv, 5leté přežití nemocných). Dalším cílem je srovnání typu kostní invaze, nádorového gradu a postižení lymfatických uzlin ve vztahu k molekulárním prognostickým faktorům detekovaným imunohistochemicky – p53, Ki-67, CD34 (mikrovaskulární denzitě).

3. Materiál a metody

V souboru bylo zahrnuto 49 pacientů se spinocelulárními karcinomy dutiny ústní stádií pT1 až pT4, u kterých byla v letech 2005-2014 provedena resekce horní nebo dolní čelisti na Klinice ústní, čelistní a obličejové chirurgie LF UP a FNOL. Soubor tvořilo 34 mužů (69,39%) a 15 žen (30,61%). Preparáty byly odvápňené pomocí standardních dekalcificačních roztoků (DC1, Krutsay). Histologické vzorky resekátů byly odečítány prospektivně (po roce 2013), resp. retrospektivně (před rokem 2013, šlo o revizi nálezů s doplněním chybějících histologických prognostických znaků a typu kostní invaze) jedním patologem. Byly využity tkáňové bločky fixované ve formalinu a zalité do parafinu. Pacienti byli následně rozděleni dle klinických stádií, dle přítomnosti kostní invaze a dle typu kostní invaze (erozivní, infiltrativní, smíšený – obr. 4, 5), výsledky byly srovnány s dalšími sledovanými parametry (grading, metastázy v regionálních lymfatických uzlinách, velikost nádoru, 5leté přežití, výskyt recidivy) a statisticky vyhodnoceny. Výsledky byly statisticky zpracovány a vyhodnoceny pomocí Pearsonova chí-kvadrát testu a McNamarova testu v programu Statistica 12 (StatSoft). Hodnota $p < 0,05$ byla považována za statisticky signifikantní.

Tyto parametry jsme dále srovnávali s expresí imunohistochemických prognostických markerů. Pro stanovení exprese sledovaných znaků jsme použili nepřímou imunohistochemickou metodu s využitím protilátek anti CD34, Ki-67, p53 (tab. 6, obr. 6-9). V případě CD34 byla hodnocena mikrovaskulární denzita peritumorózně na hranici s nenádorovou tkání v oblasti invazivního čela nádoru a dále v nádorovém stromatu intratumorózně. Hodnocen byl průměrný počet CD34 pozitivních cév na 1 velké zorné pole (HPF) v místech tzv. „hot spots”. Ki-67 bylo hodnoceno jako procentuální zastoupení pozitivních nádorových buněk ze všech nádorových buněk, p53 jako mutovaný nebo „wild type”.

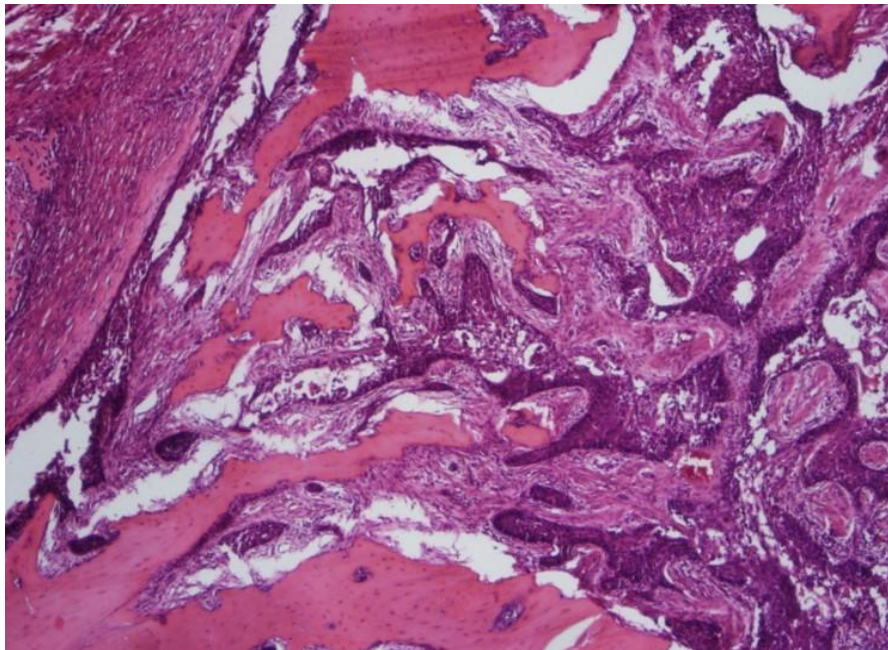
Metoda nepřímé imunohistochemie: Po obnovení antigenicity natrávením nebo mikrovlnným ošetřením byla metodou nepřímé imunohistochemie s použitím komerčně dostupných primárních protilátek pro zjišťovaný znak, resp. proti jeho antigenní determinantě ve stanoveném ředění, a sekundární protilátky pro vizualizaci standardní technikou avidin-biotin sledována pozitivita daného znaku. Parafinové bločky byly nařezány na cca 4-6 μm vzorky (optimálně 5 μm), inkubovány v termostatu přes noc při 60°C, následně neparafinovány v xylénu, rehydratovány sestupnou řadou alkoholu. Tepelně indukovaný „retrieval” cílového epitopu antigenu daného vzorku na sklíčku byl proveden v citrátovém pufru při pH 6 v mikrovlnné troubě při 1000 W po dobu 20 min. (4x5 min.), následně byly vzorky zchlazeny při pokojové teplotě (přibližně 20 minut), opláchnuty destilovanou vodou a umístěny do

solného roztoku Tris pufru po dobu přibližně 5 min. Endogenní peroxidázová reakce byla zablokována standardně dodávaným roztokem „peroxidase block solution” v kitu EnVision kit a to po dobu přibližně 5 min. Následně byla sklíčka se vzorky opět opláchnuta v solném roztoku Tris pufru. Každý ze vzorků byl inkubován s primární protilátkou po dobu přibližně 30 min. při pokojové teplotě. Pro vizualizaci imunohistochemického vyšetření byl použit EnVision kit s uvedeným metodickým postupem dle výrobce.

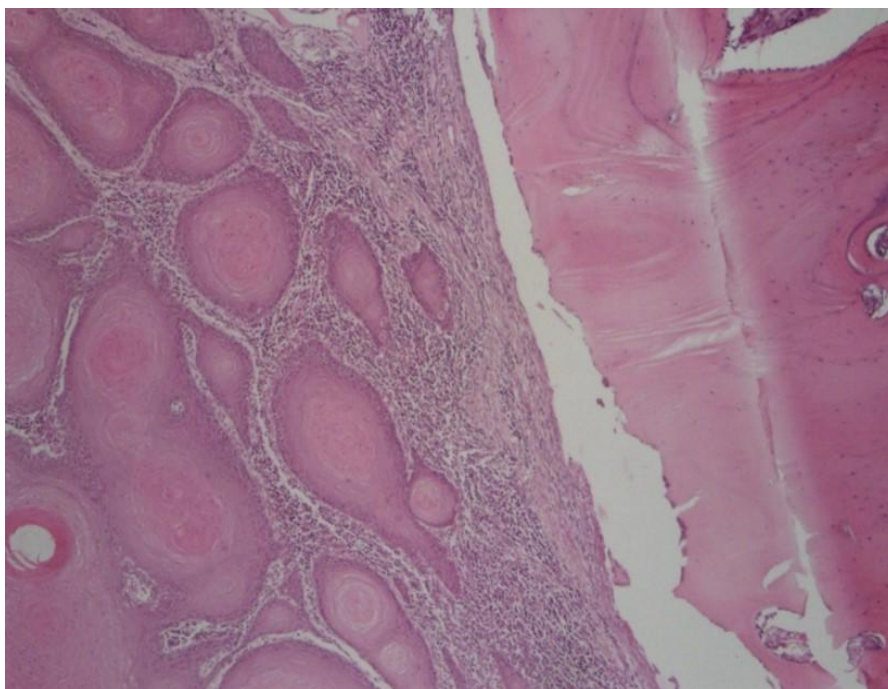
Tab. 6. Seznam použitých protilátek včetně daného klonu a použitého ředění

Protilátka anti-	Klon	Antigen retrieval	Ředění	Firma
CD34	QBEnd 10	MW citrátový pufr pH6, sekundární systém BioSB	1:50	Agilent-Dako
Ki-67	MIB1	MW citrátový pufr pH6, sekundární systém BioSB	1:200	Agilent-Dako
p53	DO-7	MW citrátový pufr pH6, sekundární systém BioSB	1:50	Agilent-Dako

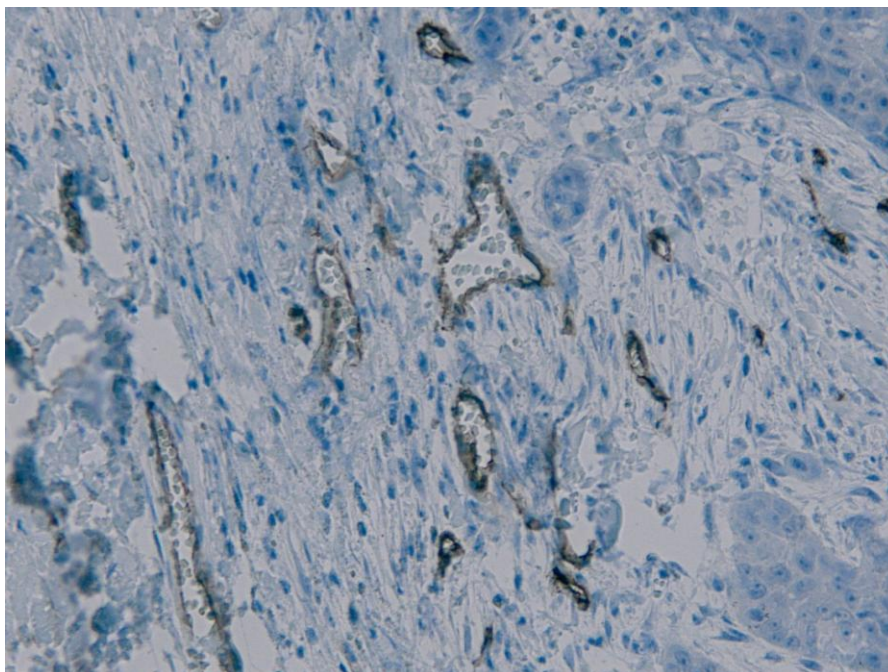
Obr. 4. Infiltrativní forma kostní invaze spinocelulárního karcinomu dutiny ústní
(HE, zvětšení 40×)



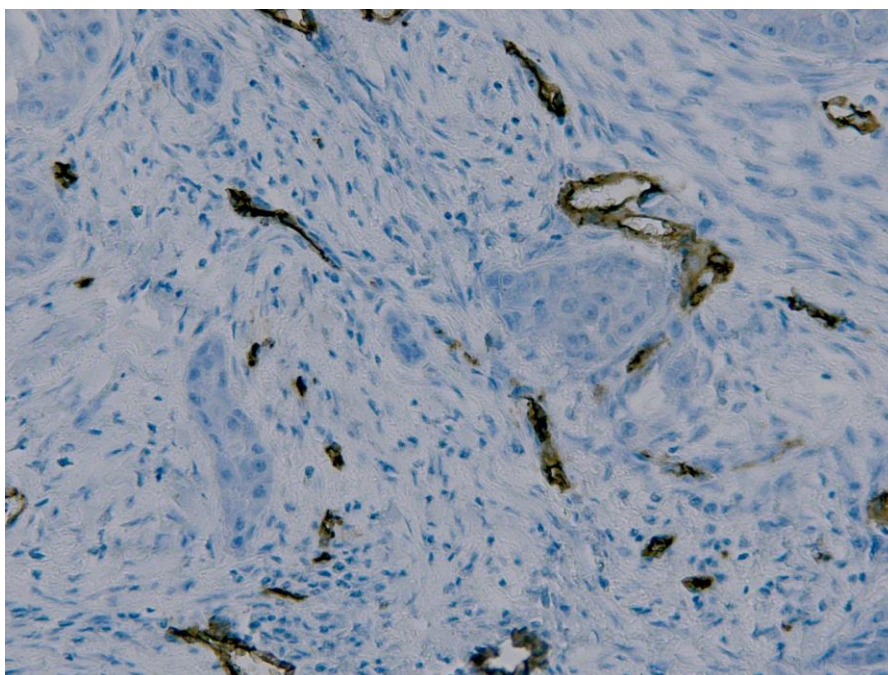
Obr. 5. Erozivní forma kostní invaze spinocelulárního karcinomu dutiny ústní
(HE, zvětšení 40×)



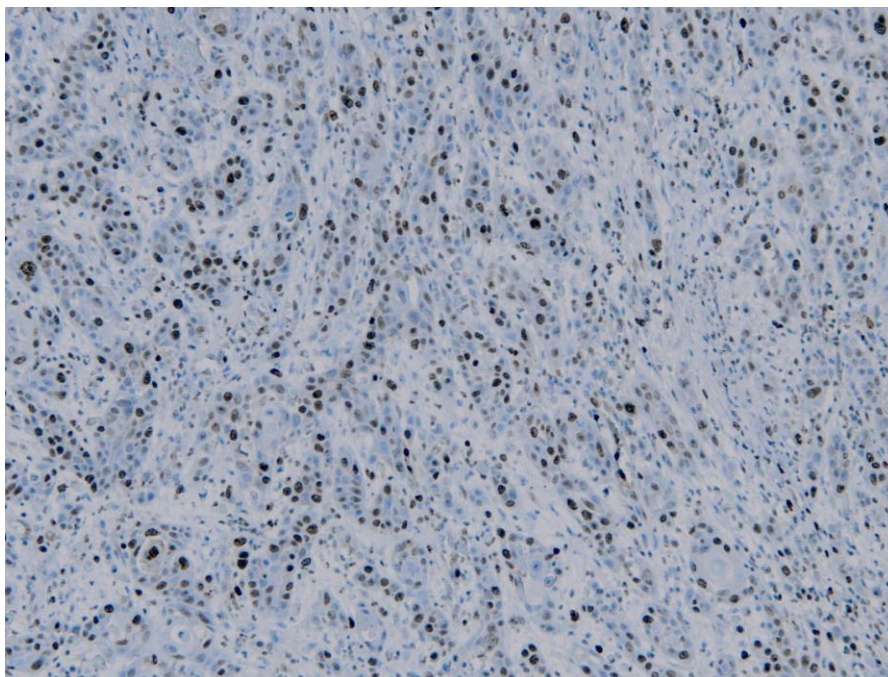
Obr. 6. Imunohistochemické vyšetření CD34, peritumorózní cévy, zvětšení 200×



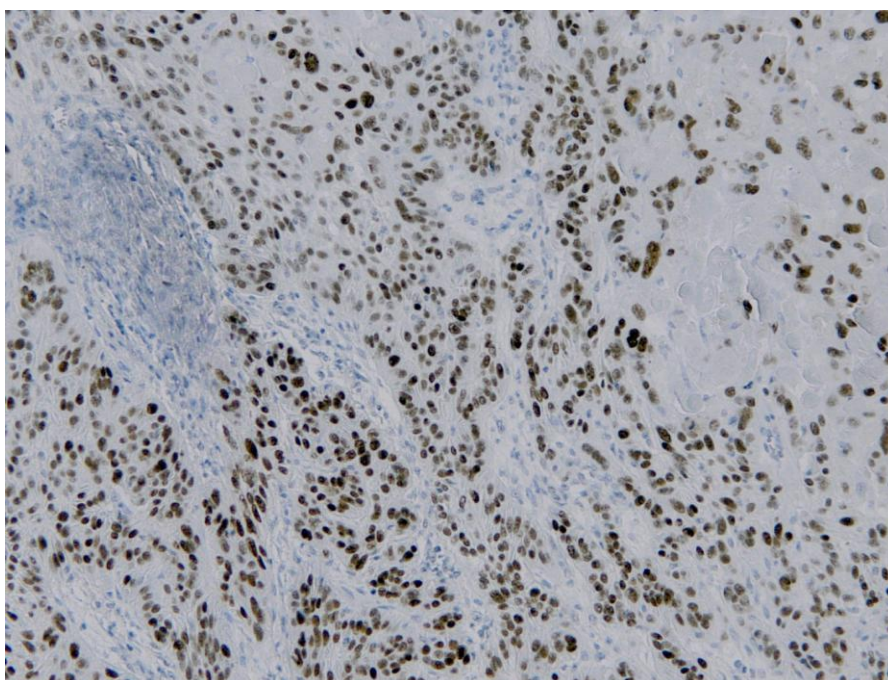
Obr. 7. Imunohistochemické vyšetření CD34, intratumorózní cévy, zvětšení 200×



Obr. 8. Imunohistochemické vyšetření Ki-67, jaderná pozitivita, zvětšení 100×



Obr. 9. Imunohistochemické vyšetření p53, jaderná pozitivita, zvětšení 100×



4. Výsledky studie

Soubor 49 pacientů tvořilo 34 mužů (69,39 %) a 15 žen (30,61 %), medián věku byl 61 let (rozmezí 36-85). U 30 nemocných (61,22 %) byla prokázána kostní invaze (tj. jde o pacienty IV. stadia onemocnění), u 19 pacientů (38,78 %) nádor do kosti neprorůstal, navzdory provedené resekci čelistní kosti (tj. jde o pacienty II. a III. stadia nemoci). Nejčastější lokalizací nádoru v dutině ústní celého souboru pacientů byl zubní alveol + retromolární oblast (59,18 %), dále následuje spodina dutiny ústní (22,45 %), tvář (8,16 %), patro (6,12 %) a jazyk (4,08 %) – graf 1.

4.1 Histopatologické a klinicko-patologické prognostické znaky

Nejdříve byly sledovány ve vztahu ke stadiu nádorového onemocnění následující histopatologické znaky: maximální hloubka invaze, nádorový grade, vzdálenost od resekčního okraje, perineurální šíření, postižení regionálních lymfatických uzlin včetně ECS.

U pacientů ve II. stadiu onemocnění (n=11) byla průměrná maximální hloubka invaze 8 mm. Dobře diferencované nádory (G1) tvořily 54,54 %, středně diferencované nádory (G2) 36,36 % a nízcě diferencované nádory (G3) 9,09 %. Nádory byly odstraněny u většiny nemocných s bezpečnostním lem zdravé tkáně ≥ 5 mm (63,63 %), kromě dvou pacientů (18,18 %), u kterých byly okraje resekátu pozitivní (u obou nastala recidiva). Jen ve dvou případech (18,18 %) byly okraje nádoru těsné (< 5 mm a > 1 mm), v obou případech ale nádor nerecidivoval. U žádného nemocného ve II. stadiu onemocnění jsme nezaznamenali uzlinovou metastázu ani známky perineurálního šíření nádorových buněk (0 %).

U pacientů ve III. stadiu onemocnění (n=8) byla průměrná maximální hloubka invaze 9,4 mm. Dobře diferencované nádory (G1) nebyly diagnostikovány (0 %), středně šiferencované nádory (G2) tvořily 62,5 % a nízcě diferencované nádory (G3) 37,5 %. Ve většině případů byly okraje resekátu těsné, tj. < 5 mm a > 1 mm (62,5 %), pouze ve 25 % byly okraje volné a u 12,5 % případů byly okraje resekátu pozitivní, tj. ≤ 1 mm. Perineurální šíření nádoru bylo zaznamenáno ve 37,5 % případů. Uzlinové metastázy byly u nemocných léčených ve III. stadiu onemocnění časté (87,5 %), pouze u jednoho pacienta (12,5 %) nádor nemetastazoval lymfatickou cestou. Z pacientů s metastatickým postižením uzlin připadala na 1 pacienta průměrně 1 metastatická lymfatická uzlina. Extrakapsulární šíření nádoru přes pouzdro uzliny (ECS) nebylo diagnostikováno v žádném případě (0 %).

Většina nemocných byla léčena ve IV. stadiu onemocnění (n=30). Průměrná maximální hloubka invaze byla 17 mm. Dobře diferencované nádory (G1) tvořily 26,67 %, středně

diferencované nádory (G2) 46,66 % a níže diferencované nádory (G3) 26,67 %. Celkově převažovaly pozitivní okraje ≤ 1 mm (65,21 %), těsné okraje tvořily 13,04 % a pouze 21,73 % okrajů bylo volných ≥ 5 mm. Perineurální šíření nádoru bylo zaznamenáno ve 34,78 %. Uzlinové metastázy byly zaznamenány u 42,86 % pacientů. Z pacientů s metastatickým postižením uzlin připadalo na 1 pacienta průměrně 2,76 metastatických lymfatických uzlin. ECS nádoru v lymfatických uzlinách bylo diagnostikováno u 39,13 %. Souhrn srovnání vybraných histopatologických parametrů u jednotlivých stadií je uveden v tab. 7.

U pacientů léčených ve IV. stadiu jsme se dále detailněji zaměřili na prognostické faktory související s kostní invazí, resp. typem kostní invaze. Z 30 pacientů s prokázanou kostní invazí tvořil erozivní typ 26,67 % (8/30), infiltrativní typ 40 % (12/30) a smíšený typ 33,33 % (10/30) – graf 2. Nejčastější lokalizací nádoru s prokázanou kostní invazí byl zubní alveol + retromolární oblast (60 %), dále následuje spodina dutiny ústní (26,67 %), tvář (10 %) a patro (3,33 %) – graf 3. Sledovali jsme vztah typu kostní invaze orálních spinocelulárních karcinomů ke stupni diferenciaci nádoru, postižení regionálních lymfatických uzlin, velikosti nádoru, výskytu lokoregionálních recidiv a přežití nemocných.

Vzhledem k nemožnosti vždy jednoznačného odlišení středně a níže diferencovaných spinocelulárních karcinomů (G2 a G3), byly tyto 2 skupiny nádorové diferenciaci zahrnuty do jedné skupiny (G2+G3). Srovnáním nádorového gradu u případů s jakoukoliv kostní invazí tvořily nádory G1 26,67 % a nádory G2+G3 73,33 %. U erozivního typu kostní invaze tvořily karcinomy G1 50 % (4/8), G2+G3 50 % (4/8), u infiltrativního typu G1 16,7 % (2/12), G2+G3 83,3 % (10/12) a u smíšeného typu G1 20 % (2/10), G2+G3 80 % (8/10) - graf 4. V McNemarově testu jsme prokázali statisticky významnou signifikanci mezi typem kostní invaze a nádorovým gradem, pokud se jedná o infiltrativní a smíšený typ vůči erozivnímu typu kostní invaze ($p=0,00558$).

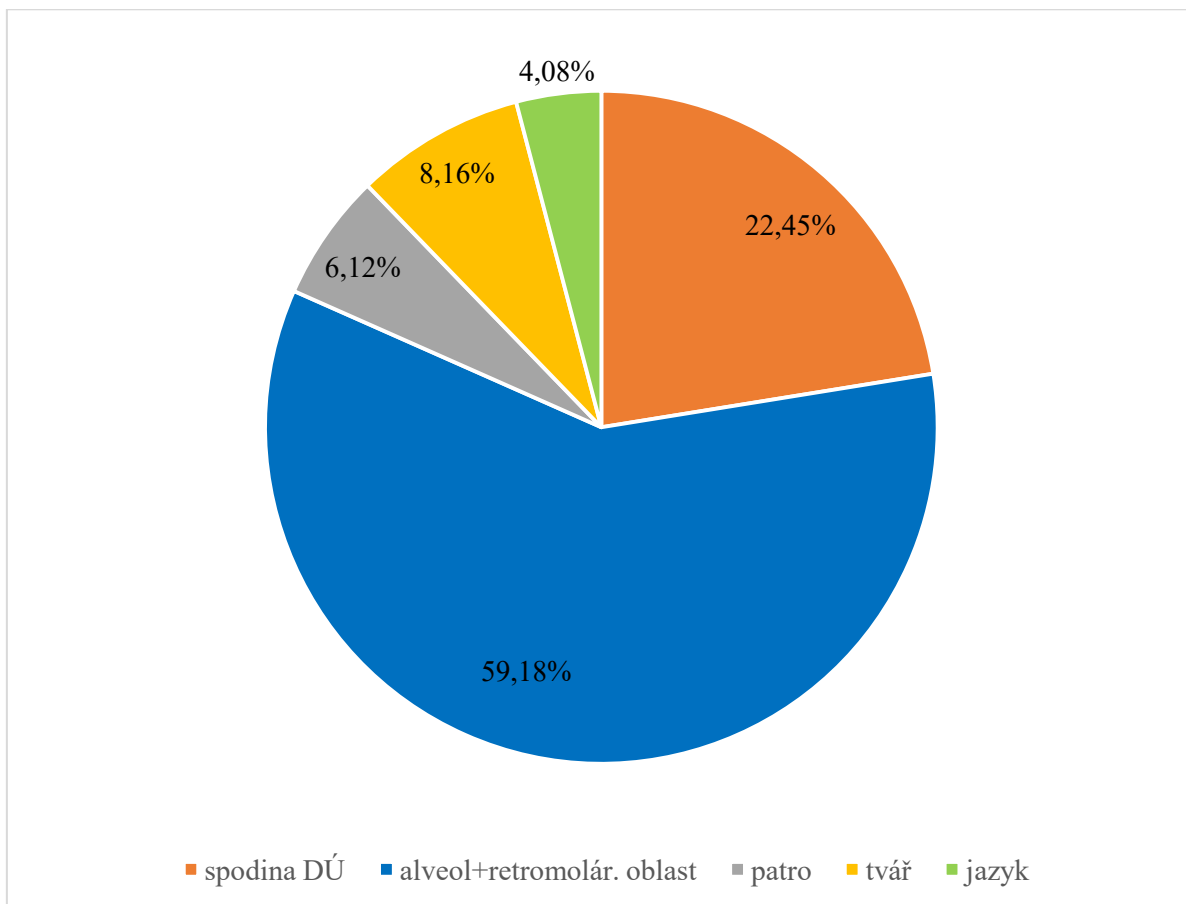
Nádory s histologicky prokázanou kostní invazí neměly metastázy v regionálních lymfatických uzlinách (pN0) v 57,14 %, u 42,86 % byly prokázány metastatické uzliny (pN1-pN2b). Rozdíly v postižení regionálních lymfatických uzlin (pN1-pN2b) nebyly z hlediska typu kostní invaze statisticky signifikantní ($p=0,79$) – erozivní typ: 50 % (4/8), infiltrativní typ 40 % (4/10), smíšený typ 40 % (4/10). Nebyla tak prokázána významná korelace mezi typem kostní invaze a metastatickým postižením uzlin (grafy 5 a 6). U 2 pacientů s infiltrativním typem kostní invaze nebyl status lymfatických uzlin vyšetřen (pNX), proto v tomto sledovaném znaku tvoří kohortu pacientů s infiltrativním typem kostní invaze pouze 10 pacientů.

Dále jsme se pokoušeli zjistit, zda existuje vztah mezi největší velikostí nádoru a typem kostní invaze. Nádory jsme rozdělili na 3 skupiny dle velikosti: <2 cm, 2-4 cm a >4 cm. U erozivního typu kostní invaze tvořily nádory <2 cm 11 %, 2-4 cm 78 % a >4 cm 11 %, u infiltrativního typu nebyly nádory <2 cm diagnostikovány, nádory velikosti 2-4 cm tvořily 77 % a velikosti >4 cm 23 %, u smíšeného typu byly nálezy obdobné – nádory velikosti 2-4 cm tvořily 80 % a velikosti >4 cm 20 % (graf 7). Průměrná velikost nádoru u erozivního typu byla 34 mm, u infiltrativního typu 36 mm a u smíšeného typu 34 mm. Bylo tak prokázáno, že typ kostní invaze nesouvisí s velikostí nádoru.

Dále jsme sledovali vztah typu kostní invaze ke klinicko-patologickým faktorům: výskytu recidiv a přežití pacientů. U pacientů s erozivním typem kostní invaze nebyly recidivy zaznamenány u 37,5 % pacientů, s infiltrativním typem u 23 %, se smíšeným typem u 50 %. Naopak, výskyt lokální nebo regionální recidivy byl zaznamenán u 62,5 % pacientů s erozivním typem, u 77 % s infiltrativním typem a u 50 % se smíšeným typem (graf 8). U nádorů s infiltrativním typem kostní invaze tak byly zaznamenány o něco častější loko-regionální recidivy, rozdíly ale nebyly statisticky signifikantní.

Srovnáním přežití pacientů ve vztahu k typu kostní invaze byly nalezeny rozdíly v mediánu přežití i v procentu pacientů s 5letým přežitím. Medián přežití u erozivního typu invaze byl 66 měsíců, u smíšeného typu 20 měsíců a u infiltrativního typu 13 měsíců. 5leté přežití od stanovení diagnózy bylo u erozivního typu cca 60 %, u smíšeného typu 40 % a u infiltrativního typu pouze 15 % (graf 9). Ukazuje se tak, že infiltrativní typ kostní invaze je spojen s velice špatnou prognózou.

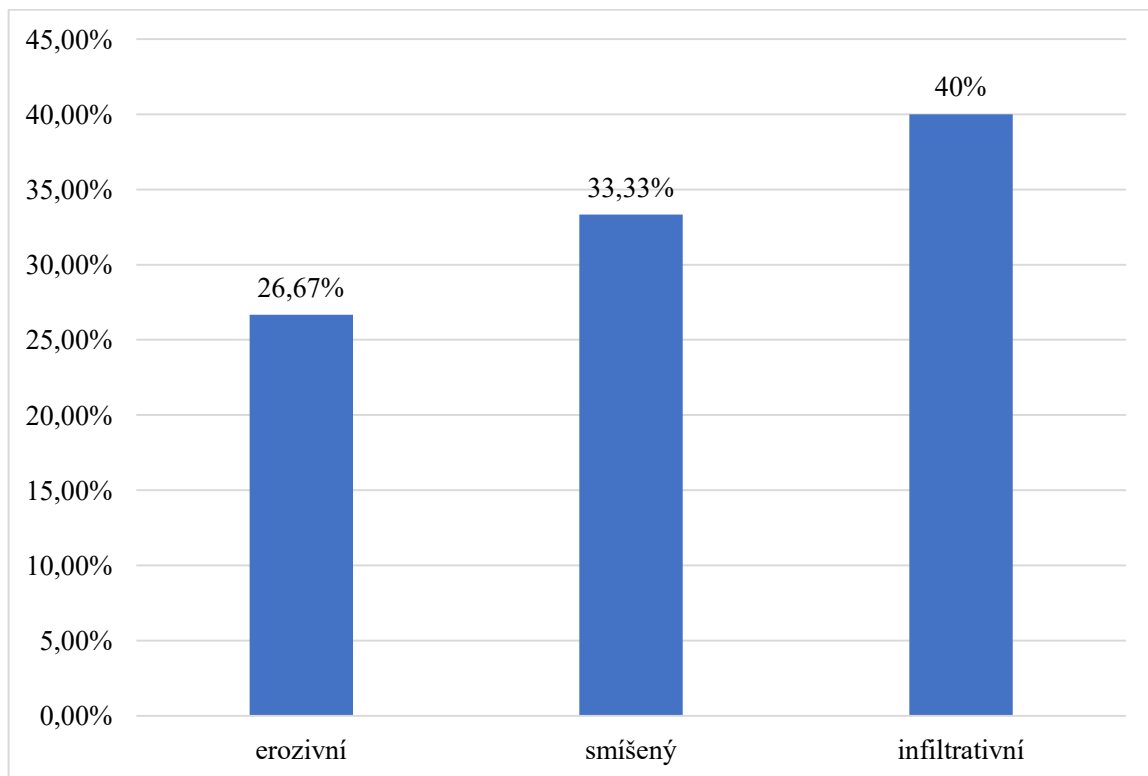
Graf 1. Distribuce nádorů dutiny ústní celého souboru pacientů, n=49



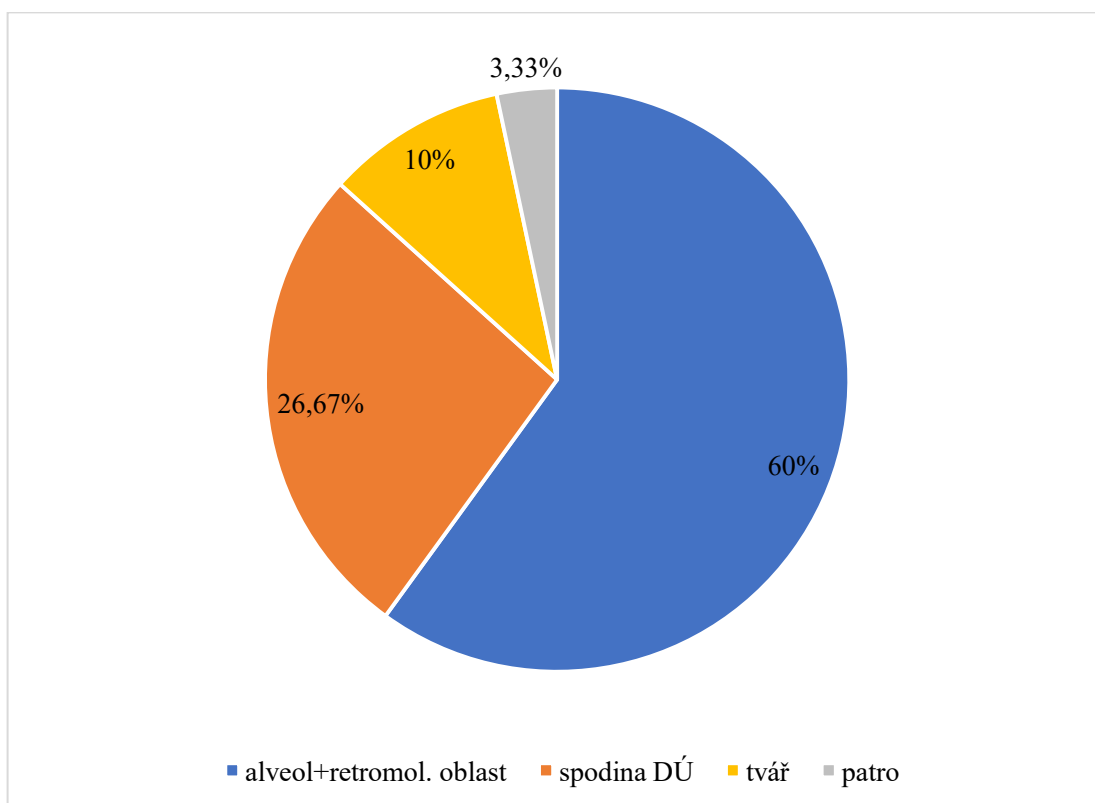
Tab. 7. Srovnání histopatologických prognostických faktorů dle klinických stadií

Stadium nemoci	Průměr. max. hloubka invaze	G1	G2	G3	Res. okraj volný	Res. okraj těsný	Res. okraj pozit.	Perin. šíření	Meta LU	ECS
II	8 mm	54,54%	36,36%	9,09%	63,63%	18,18%	18,18%	0%	0%	0%
III	9,4 mm	0%	62,50%	37,50%	25%	62,50%	12,50%	37,50%	87,50%	0%
IV	17 mm	26,67%	46,66%	26,67%	21,73%	13,04%	65,21%	34,78%	42,86%	39,13%

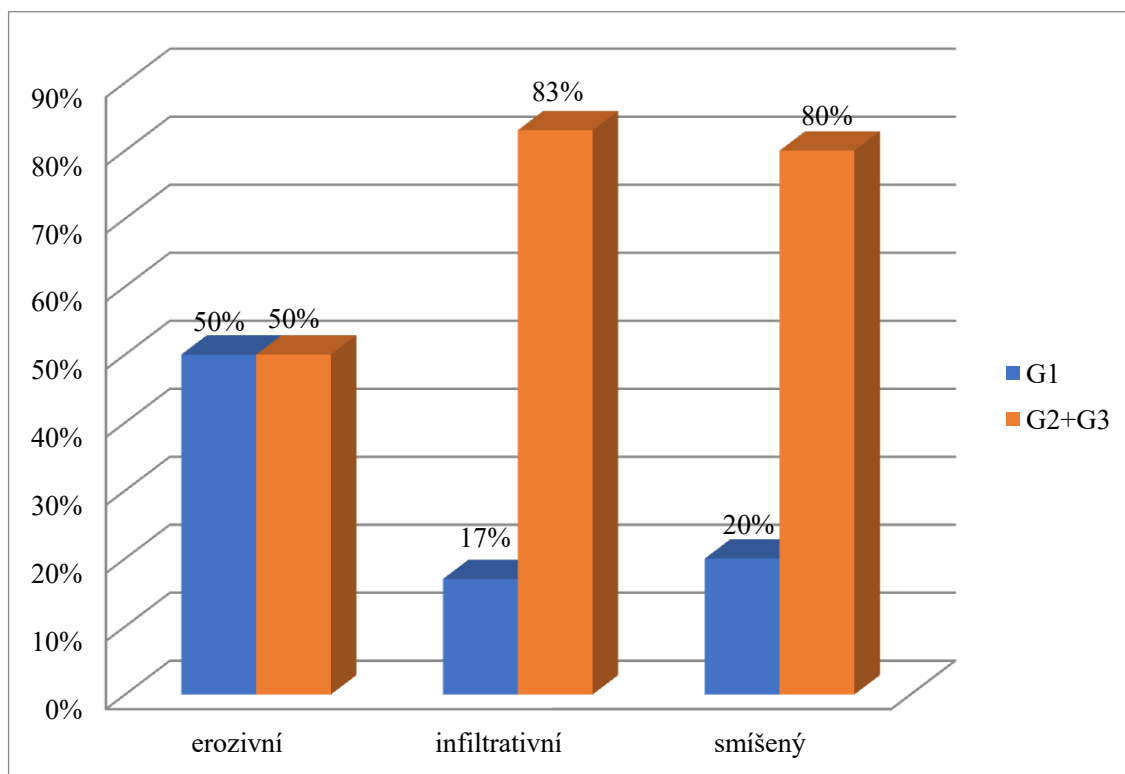
Graf 2. Distribuce typu kostní invaze u pacientů s histol. prokázanou kostní invazí, n=30



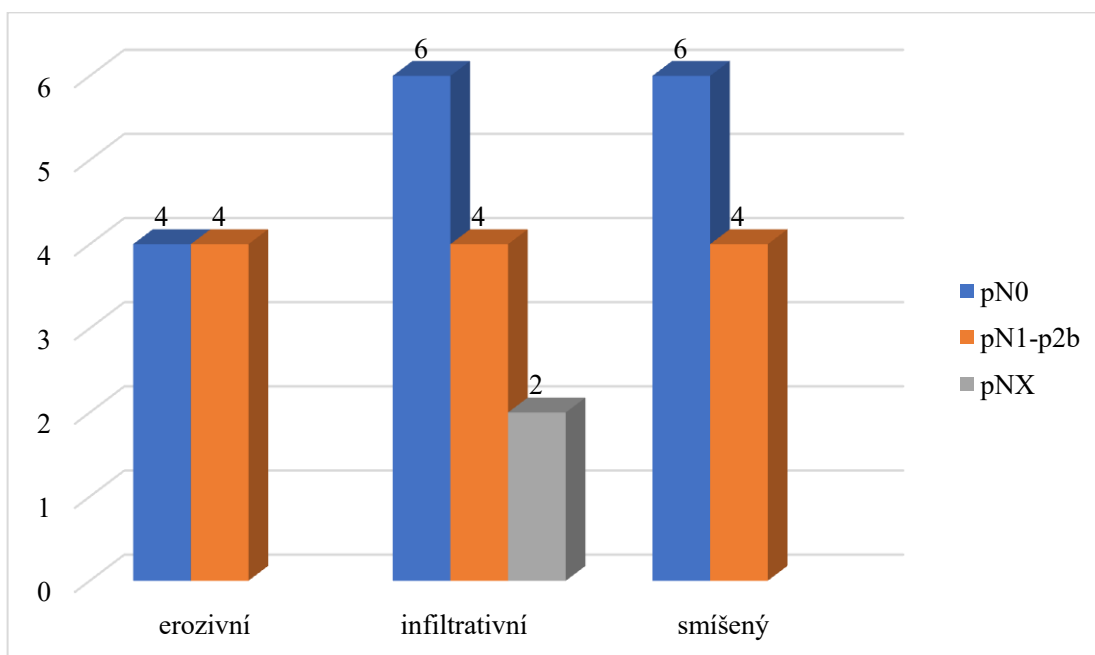
Graf 3. Distribuce nádorů dutiny ústní s histologicky prokázanou kostní invazí, n=30



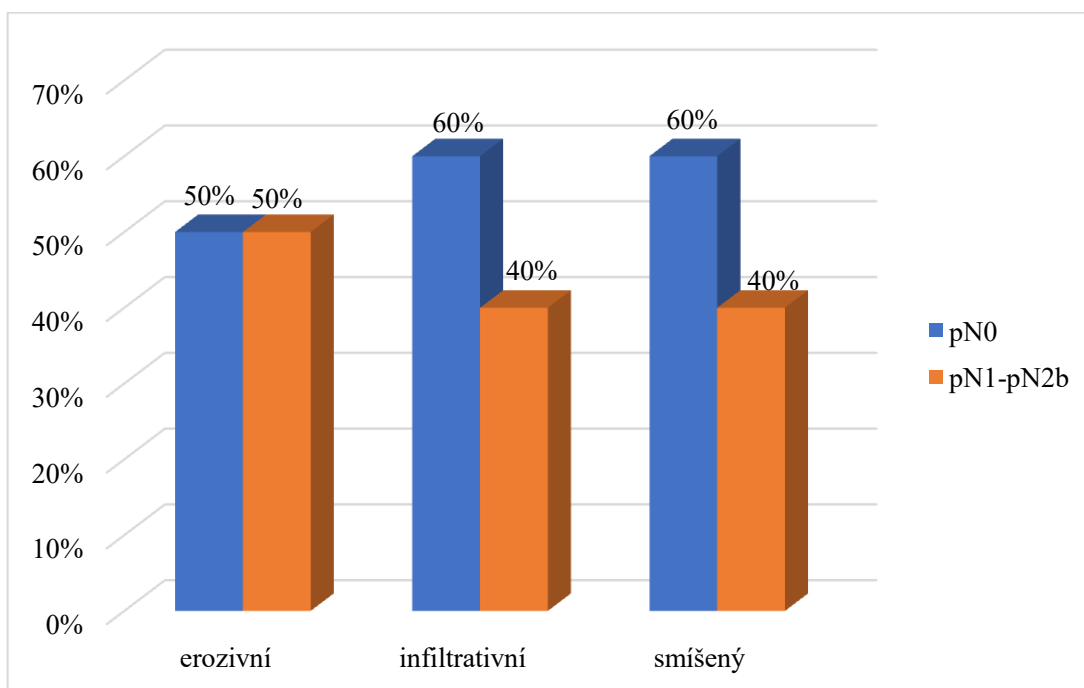
Graf 4. Typ invaze do kosti a nádorový grade



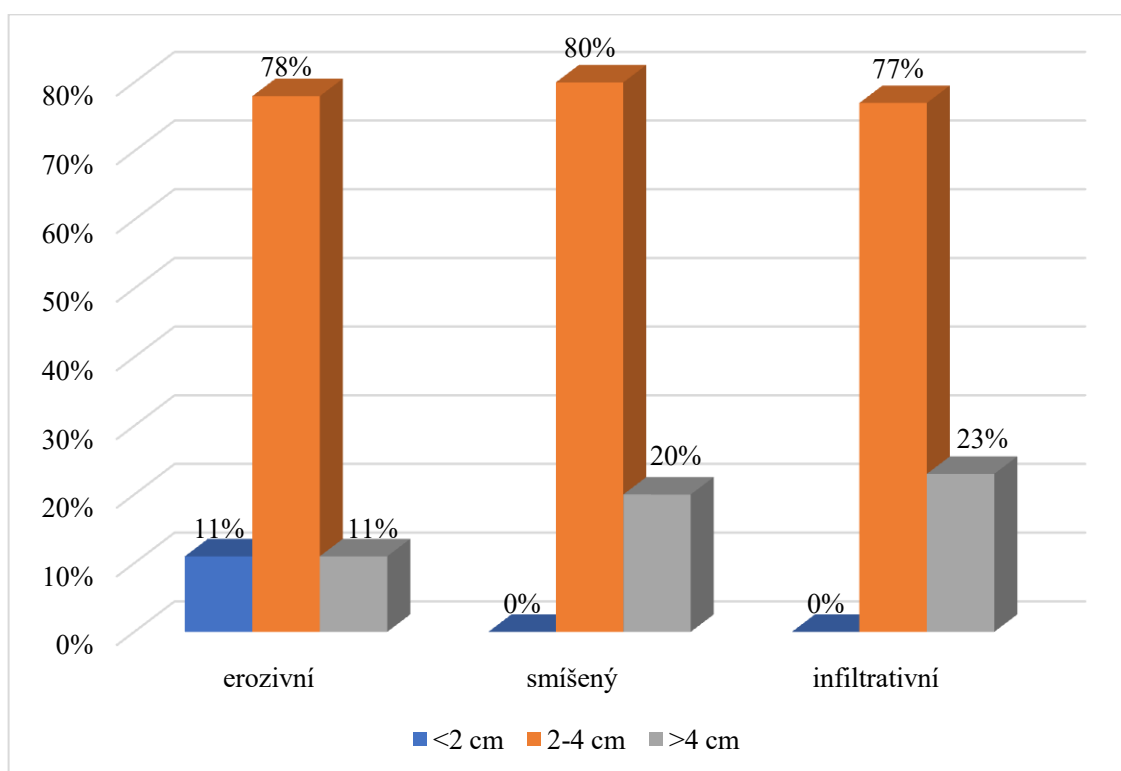
Graf 5. Typ invaze do kosti a postižení regionálních lymfatických uzlin – absolutní počty



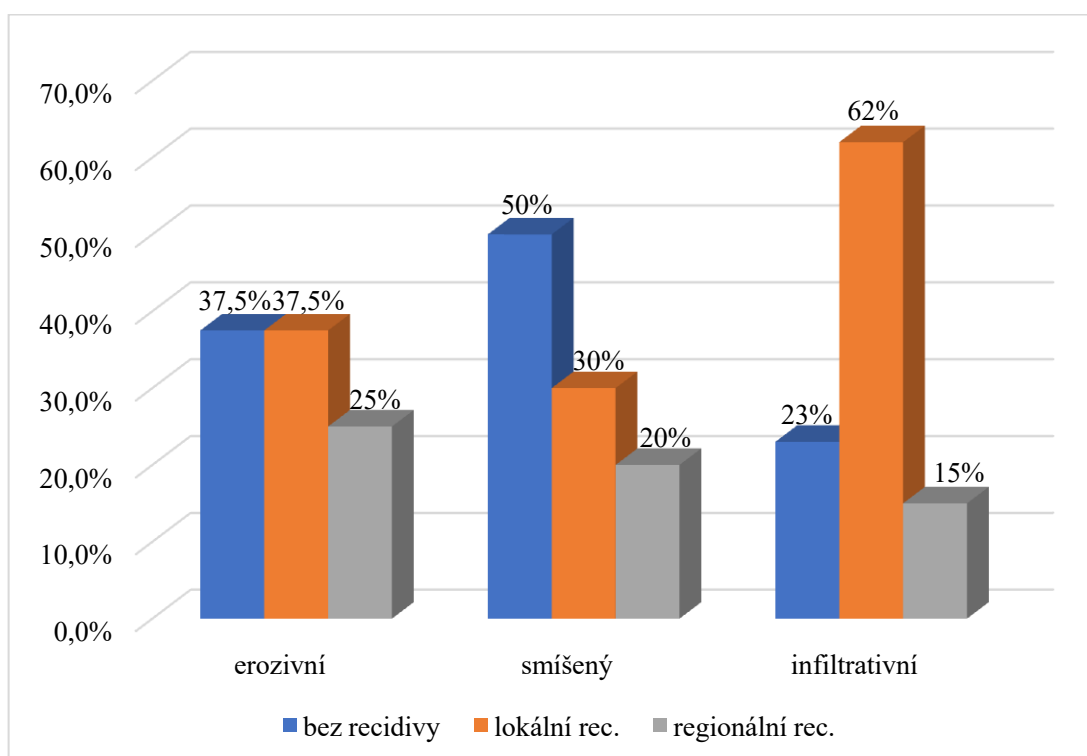
Graf 6. Typ invaze do kosti a postižení regionálních lymfatických uzlin – relativní počty v % po vyloučení pNX



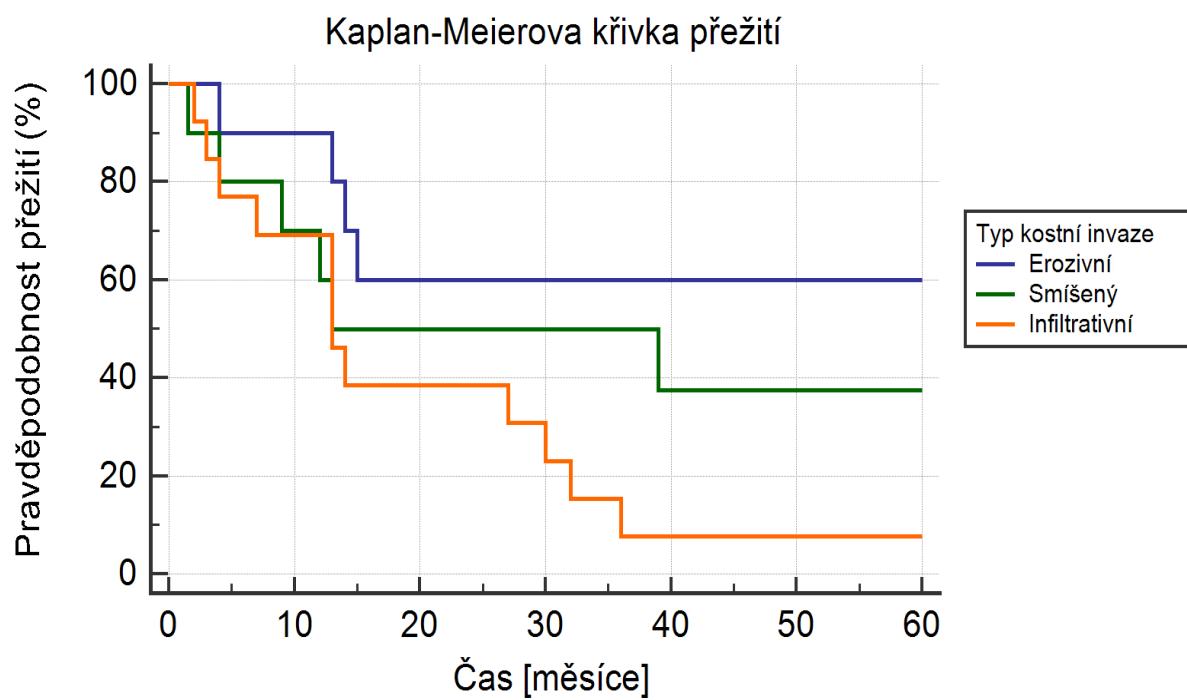
Graf 7. Vztah mezi velikostí nádoru a typem kostní invaze



Graf 8. Typ invaze do kosti a výskyt recidiv



Graf 9. Typ invaze do kosti a přežití pacientů



4.2 Imunohistochemické prognostické znaky

V další části práce jsme posuzovali vztah vybraných imunohistochemických prognostických markerů (CD34, Ki-67, p53) k typu kostní invaze a k dalším klinicko-patologickým znakům (nádorový grade, postižení regionálních lymfatických uzlin).

Mikrovaskulární denzita (MVD) stanovená pomocí markeru CD34 byla hodnocena jak peritumorózně, tak intratumorózně. V případě erozivního typu kostní invaze bylo peritumorózně zjištěno průměrně 22 cév/HPF (medián 16,5), u infiltrativního typu 19 cév/HPF (medián 17), u smíšeného typu 16,5 cév/HPF (medián 14). Celkem bylo u jakéhokoliv typu kostní invaze zjištěno peritumorózně průměrně 19,2 cév/HPF (medián 16,5). V souboru pacientů bez histologicky verifikované kostní invaze byla průměrná peritumorózní MVD 18,6 cév/HPF (medián 15) – tab. 8. Ukázalo se, že korelace peritumorózní MVD u pacientů s kostní invazí a bez kostní invaze nebyla významná, ani nebyly významné rozdíly mezi jednotlivými typy kostní invaze.

Při hodnocení intratumorózní MVD bylo v případě erozivního typu kostní invaze zjištěno průměrně 21 cév/HPF (medián 20), v případě infiltrativního typu 24,6 cév/HPF (medián 27,5) a smíšeného typu 18 cév/HPF (medián 16,5). Celkem bylo u jakéhokoliv typu kostní invaze zjištěno intratumorózně průměrně 21,2 cév/HPF (medián 20). V souboru pacientů bez histologicky verifikované kostní invaze byla průměrná intratumorózní MVD 17,7 cév/HPF (medián 18) – tab. 9. Ukázalo se, že infiltrativní typ kostní invaze vykazuje signifikantně vyšší intratumorózní MVD ve srovnání s erozivním a smíšeným typem kostní invaze a dále byl zjištěn trend zvýšené intratumorózní MVD v případě jakéhokoliv kostní invaze ve srovnání s případy bez kostní invaze.

Průměrná proliferační aktivita měřená pomocí markeru Ki-67 byla u erozivního typu kostní invaze 14 %, u infiltrativního typu 17,3 %, u smíšeného typu 9,2 %. Celková průměrná proliferační aktivita v souboru pacientů s kostní invazí byla 13,5 %, u pacientů bez kostní invaze 19,1 %. Korelace zvýšené proliferační aktivity Ki-67 u případů OSCC s přítomnou kostní invazí tak nebyla prokázána.

Přítomnost mutovaného p53 byla u erozivního typu kostní invaze zjištěna u 83 % případů, u infiltrativního typu u 66,6 %, u smíšeného typu u 57,1 %. Celková průměrná četnost mutovaného p53 v souboru pacientů s kostní invazí byla 68,2 %, u pacientů bez kostní invaze 63,6 %. Nebyly tak potvrzeny statisticky významné rozdíly v četnosti mutovaného p53 mezi případy s kostní invazí a bez kostní invaze.

Dále jsme srovnávali markery CD34, Ki-67 a p53 ve vztahu k nádorovému gradu. V případě peritumorózní MVD bylo u případů grade 1 (G1) zjištěno průměrně 16,6 cév/HPF (medián 15), u grade 2 (G2) 20,2 cév/HPF (medián 20) a u grade 3 (G3) 19,8 cév/HPF (medián 17) – tab. 10. V případě intratumorózní MVD bylo u případů grade 1 (G1) zjištěno průměrně 16,4 cév/HPF (medián 16), u grade 2 (G2) 21,2 cév/HPF (medián 20) a u grade 3 (G3) 25,4 cév/HPF (medián 25) – tab. 11. Prokázala se tak tendence zvýšené MVD (zejména intratumorózní) s vyšším nádorovým gradem. Průměrná proliferační aktivita Ki-67 byla u G1 případů 4,25 %, u G2 21,1 %, u G3 12 %. Četnost mutovaného p53 byla u případů G1 16,7 %, u G2 80 % a u G3 71,4 %. Prokázala se tak zvýšená proliferační aktivita Ki-67 a četnost mutovaného p53 s horší diferenciací nádoru (zejména ve vztahu G1 vůči G2 a G3).

U případů bez metastáz v regionálních lymfatických uzlinách (pN0) byla průměrná peritumorózní MVD 15,7 cév/HPF (medián 16), u případů s metastatickým postižením uzlin (pN1-pN2b) 22,6 cév/HPF (medián 22) – tab. 12. V případě intratumorózní MVD byly rozdíly taky významné, u případů bez uzlinových metastáz bylo zjištěno průměrně 19,5 cév/HPF (medián 14,5), u případů s uzlinovými metastázami až 24 cév/HPF (medián 25) – tab. 13. Prokázala se tak korelace mezi zvýšenou MVD a přítomností uzlinových metastáz. Průměrná proliferační aktivita Ki-67 byla u případů bez uzlinových metastáz 12,9 % a u případů s pozitivními lymfatickými uzlinami 19,3 %. Rovněž byla zjištěna zvýšená frekvence mutovaného p53 u případů s uzlinovými metastázami (80 %) než u případů bez metastáz (41,7 %).

Tab. 8. Mikrovaskulární denzita (MVD) peritumorózně ve vztahu ke kostní invazi

typ kostní invaze	průměr. počet cév/HPF	medián cév/HPF
erozivní	22	16,5
infiltrativní	19	17
smíšený	16,5	14
celkem (jakákoliv invaze)	19,2	16,5
bez kostní invaze	18,6	15

Tab. 9. Mikrovaskulární denzita (MVD) intratumorózně ve vztahu ke kostní invazi

typ kostní invaze	průměr. počet cév/HPF	medián cév/HPF
erozivní	21	20
infiltrativní	24,6	27,5
smíšený	18	16,5
celkem (jakákoliv invaze)	21,2	20
bez kostní invaze	17,7	18

Tab. 10. Mikrovaskulární denzita (MVD) peritumorózně ve vztahu k nádorovému gradu

Nádorový grade	průměr. počet cév/HPF	medián cév/HPF
grade 1	16,6	15
grade 2	20,2	20
grade 3	19,8	17

Tab. 11 Mikrovaskulární denzita (MVD) intratumorózně ve vztahu k nádorovému gradu

Nádorový grade	průměr. počet cév/HPF	medián cév/HPF
grade 1	16,4	16
grade 2	21,2	20
grade 3	25,4	25

Tab 12. Mikrovaskulární denzita (MVD) peritumorózně ve vztahu k postižení LU

Postižení uzlin	průměr. počet cév/HPF	medián cév/HPF
pN0	15,7	16
pN1-pN2b	22,6	22

Tab 13. Mikrovaskulární denzita (MVD) intratumorózně ve vztahu k postižení LU

Postižení uzlin	průměr. počet cév/HPF	medián cév/HPF
pN0	19,5	14,5
pN1-pN2b	24	25

5. Diskuze

Nádory hlavy a krku představují nezanedbatelnou složku lidských nádorových onemocnění, zejména u mužského pohlaví. Z velkého množství sublokalizací této topografie představují dominující složku zejména nádory dutiny ústní a orofaryngu, z nichž se v naprosté většině případů jedná o spinocelulární karcinomy. Problematika nádorových onemocnění hlavy a krku je umocněna tím, že kromě destrukční části operace se vyžaduje ve většině případů i přiměřená rekonstrukční fáze s přiměřenou estetikou a funkcí. I vzhledem k tomu je kladen značný důraz na přesné posouzení nejrůznějších histopatologických faktorů, které mají značný vliv na další prognózu pacienta. Jejich správné ačasné zhodnocení umožňuje modifikovat event. následnou chirurgickou terapii (reresekce, v případě peroperačního vyšetření dokonce ještě během primárního chirurgického výkonu) i komplexní onkologickou terapii (radioterapie, chemoterapie). Proto je žádoucí vypracovat jakýsi algoritmus histopatologického vyšetření s uvedením všech důležitých prognostických faktorů (viz tab. 3). Patří k nim lokalizace, velikost, hloubka invaze, histologický typ, stupeň diferenciacetumoru, intravaskulární a perineurální invaze, pozitivita resekčních okrajů a vzdálenost nádoru od okrajů, metastázy v regionálních lymfatických uzlinách s posouzením extrakapsulárního šíření, invaze a typ invaze do kosti.

Nejčastější lokalizace OSCC je na spodině dutiny ústní a na jazyku, v asijské populaci je to kvůli žvýkání tabáku a betelu nejčastěji sliznice tváře. Uvádí se, že jazyk, měkké patro a spodina úst jsou spojeny s nejhorší prognózou OSCC, v oblasti orofaryngu má nejhorší prognózu zejména kořen jazyka [23,24]. V souboru našich pacientů byla nejčastější lokalizace nádoru v oblasti zubního alveolu/dásně + retromolární oblasti, následována lokalizací v oblasti spodiny dutiny ústní, tváře, patra a jazyka.

Velikost a hloubka invaze nádoru představují důležitý prognostický ukazatel, ale také rozhodují o operabilitě nádoru. Jak dokládají zahraniční práce, větší velikost nádoru je spojena nejen se zvýšeným počtem pozitivních resekčních okrajů, ale i četností metastatických uzlin [151]. Zejména hloubka invaze se ukazuje jako faktor, který značně ovlivňuje prognózu pacientů. Její význam dokládá i zavedení tohoto parametru do nejnovější 8. edice pTNM klasifikace zhoubných nádorů dutiny ústní, přičemž v předchozí 7. edici byla kritériem stadií pT1 až pT3 pouze největší velikost nádoru, bez ohledu na hloubku invaze [26-28]. Naše studie také potvrdila trend stoupající maximální hloubky invaze se vzrůstajícím stadiem nemoci (průměrně 8 mm ve II. stadiu; 9,4 mm ve III. stadiu a 17 mm ve IV. stadiu).

Nádorový grade je mnohdy podceňovaný ukazatel vzhledem k jeho subjektivnímu vyhodnocování, ale dnes existují standardní kritéria jeho hodnocení [Anneroth et al., 1987; Akhter et al., 2011]. Grading samotný může být nezávislý prognostický faktor OSCC, ale nízce diferencované nádory jsou i častěji spojeny s perineurální a lymfovaskulární invazí. Navíc, i způsob růstu nízce diferencovaných nádorů (malé ostrůvky nebo jednotlivé buňky v invazivním čele nádoru) se ukazuje jako prognosticky nepříznivý [32-34]. V naší studii se ukázala tendence dominující lepší diferenciaci nádoru ve stadiu II ve srovnání se stadii III a IV, kde naopak převládaly hůře diferencované nádory (G2 a G3), což potvrzuje neprávem podceňovanou roli nádorového gradu jako prognostického ukazatele.

Pozitivita resekčního okraje je jedním z nejvýznamnějších nepříznivých histopatologických prognostických znaků. Cílem chirurgické léčby OSCC je radikální odstranění nádoru s bezpečnostním lemlem zdravé tkáně o rozsahu 5 mm a více. Okraj nádoru s lemlem zdravé tkáně menším než 5 mm a větším než 1 mm se označuje jako těsný. O pozitivním okraji mluvíme v případech, kdy nádorová tkáň dosahuje do okraje resekátu, event. vzdálenost nádorových buněk od okraje resekátu je menší než 1 mm [136]. Pooperační recidiva tumoru je v těchto případech velmi pravděpodobná. Pozitivní resekční okraje jsou nejčastější příčinou lokálních recidiv tumoru. V sestavě našich nemocných právě převažuje pozitivita resekčních okrajů u pacientů léčených ve IV. klinickém stadiu, která signifikantně převyšuje nad pozitivitou okrajů v III. a II. stadiu ($p=0,0054$). To ukazuje, že pozitivní resekční okraj může být považován za indikátor agresivnější nemoci, jako vyplývá i ze studie Sutton et al. [72].

Ačkoli lokoregionální recidiva souvisí ve většině případů s blízkostí nebo pozitivitou resekčních okrajů, může se na ní uplatňovat i perineurální šíření nádorových buněk [Fagan et al., 1998]. U většiny nádorů je možné až 2 cm šíření nádorových buněk podél perineurálního prostoru, takže maligní buňky se takhle mohou vyhnout terapeutickým metodám (chirurgickým, radioterapeutickým) a mají tím za následek lokální recidivu. V našem souboru byla perineurální invaze ve vyšší frekvenci zjištěna ve III. a IV. stadiu nemoci (37,5 %, resp. 34,78 %) ve srovnání s II. stadiem (0 %), statistická signifikance nebyla významná, byl ale patrný její trend ($p=0,07$).

Metastázy v regionálních lymfatických uzlinách představují jeden z nejvýznamnějších prognostických údajů, ale nejde jen o samotnou pozitivitu uzlin, ale i o další faktory jako je počet postižených lymfatických uzlin, anatomická lokalizace uzlin, velikost metastáz a zejména extrakapsulární šíření nádorových buněk do extranodálních měkkých tkání (ECS).

ECS je významným determinantem prognózy vzhledem k jeho spojení se zvýšeným rizikem recidivy na krku a vzdálenými metastázami. Woolgar et al. (1999) uvádějí, že pacienti s makroskopickým ECS přežívají výrazně kratší dobu po operačním výkonu [80], většinou v důsledku regionální recidivy. Význam ECS vedlo k jeho zavedení do pTNM klasifikace jako další determinanty složky pN. Naše práce prokazuje, že se zvyšujícím se stadiem onemocnění signifikantně stoupá četnost uzlinových metastáz v III. a IV. stadiu nemoci ve srovnání s II. stadiem, stoupá průměrný počet postižených lymfatických uzlin u jednoho pacienta a extrakapsulární šíření nádoru v postižených uzlinách ($p=0,0044$). ECS bylo prokázáno pouze u pacientů s pokročilými nádory IV. stadia a je tedy jednoznačným ukazatelem velice špatné prognózy.

Invaze do kostní tkáně mandibuly/maxilly je známkou IV. stadia nemoci (pT4a dle TNM klasifikace). Tato klasifikace ale nerozlišuje typ kostní invaze (erozivní, infiltrativní, smíšený), přičemž existují důkazy o tom, že prognóza jednotlivých typů kostní invaze se může lišit. Wong et al. (2000) uvádějí, že 3leté přežití bez nemoci u infiltrativní formy dosahovalo 30 %, u erozivní formy 73 % [7]. Infiltrativní léze mají větší pravděpodobnost regionální nebo vzdálené recidivy nádoru. Invaze spinocelulárního karcinomu do kosti je histologický parametr, který zásadně určuje typ a rozsah onkologické léčby (resekci dolní čelisti) - erozivní forma kostní invaze může být léčena marginální mandibulektomií spíše než segmentální resekci [7]. V dalším cíli práce byl proto sledován vztah typu kostní invaze ve vztahu k dalším prognostickým faktorům. Ukázalo se, že invaze do kosti je důležitým prognostickým parametrem spinocelulárního karcinomu dutiny ústní a jeho hodnocení by mohlo pomoci ve volbě radikalitě chirurgického výkonu a onkologické léčby. Určitá korelace byla mezi nádorovým gradem a typem kostní invaze (u infiltrativního a smíšeného typu horší diferenciací nádoru), naopak postižení regionálních lymfatických uzlin je relativně nezávislé na typu kostní invaze, stejně tak nebyla zjištěna korelace mezi velikostí nádoru a typem kostní invaze. Z hlediska 5letého přežití měl nejhorší prognózu infiltrativní typ (pouze 15 % přežití), nicméně samotná invaze do kosti má špatnou prognózu u všech typů invaze (i u erozivní formě přežívalo pouze 60 % pacientů). Ukázalo se, že výskyt recidiv je poměrně častou komplikací přítomné kostní invaze, rovněž v nejvyšší frekvenci byl zjištěn u infiltrativní formy invaze do kosti, ale jakákoliv invaze do kosti musí klinika upozornit na možnost výskytu lokální nebo regionální recidivy a tito pacienti by proto měli být řádně dispenzarizováni. Některé podobné výsledky jednotlivých prognostických ukazatelů u infiltrativního a smíšeného typu kostní invaze lze vysvětlit tím, že součástí smíšené formy kostní invaze je

i infiltrativní složka, která pravděpodobně determinuje horší vlastnosti daného nádoru. Stojí proto za zvážení, jestli by do budoucna nebylo vhodné klasifikovat typ invaze do kosti pouze binárně, tj. erozivní a infiltrativní. Smíšená forma zřejmě představuje pouze kontinuum mezi oběma typy invaze. Naše studie dále poukazuje na potřebný vývoj nových diagnostických technik, které umožní předoperačně přesné hodnocení rozsahu kostní invaze a následné volby radikality chirurgického výkonu, s možným snížením následků eventuálních komplikací vlastní resekce kosti nebo rekonstrukčních výkonů (u 38 % pacientů v našem souboru nádor do kosti neprorůstal, navzdory provedené resekci čelisti). Mezi III. a IV. stadiem nemoci byly nalezeny místy podobné výsledky některých prognostických parametrů (výskyt perineurálního šíření, nádorový grade, metastázy v lymfatických uzlinách), naopak pozitivní resekcí okraj a ECS byly signifikantně vyšší zejména ve IV. stadiu nemoci. Determinantem IV. stadia nemoci je ve většině případů přítomnost kostní invaze. Pozitivní resekcí okraj a ECS jsou zase hlavní determinanty výskytu lokoregionálních recidiv a tím i úmrtnosti na pokročilost vlastní nemoci. Nabízí se tedy spojitost, že přítomnost kostní invaze může být nezávislým prognostickým faktorem OSCC a jeho precizní hodnocení by mělo být standardní součástí histopatologického diagnostického algoritmu, s ohledem na prognostickou stratifikaci pacientů. Souhrnně lze říci, že z histopatologického hlediska maligních nádorů hlavy a krku se zdají být prognosticky nejdůležitější následující parametry:

- Pozitivní resekcí okraj
- Přítomnost a typ kostní invaze
- Hloubka invaze nádoru
- Počet uzlinových metastáz, zejména ve spojení s extrakapsulárním šířením

V současnosti probíhají různé studie hledající kromě histologických i vhodné molekulární prognostické faktory, které by mohly predikovat agresivitu nádoru. Mikrovaskulární denzita (MVD) se ukazuje jako možný prediktor metastatického postižení lymfatických uzlin [120]. Další sledované prognostické markery jsou p53 a Ki-67. Ukazuje se, že u pacientů s mutacemi p53 je vyšší pravděpodobnost vzniku lokoregionální recidivy způsobené přítomností pozitivních krčních lymfatických uzlin [Bello IO et al., 2010]. Jiné studie ale význam p53 jako významného determinanta prognózy nepotvrdily [Sittel C et al., 1999]. Nádory s vyšším proliferčním indexem Ki-67 jsou považovány za agresivnější. U nádorů dutiny ústní a orofaryngu jsou výsledky studií různorodé, ale ukazuje se, že i u OSCC může být zvýšená detekce Ki-67 považována za nepříznivý prognostický faktor a indikátorem možného selhání terapie

[Sittel C et al., 1999]. V naší práci jsme se zaměřili na vztah uvedených markerů k typu kostní invaze, ale i na jejich vztah k nádorovému gradu a riziku postižení lymfatických uzlin.

Mikrovaskulární denzita (MVD) stanovená pomocí markeru CD34 byla hodnocena jak peritumorózně, tak intratumorózně. V obou skupinách (s kostní invazí, bez kostní invaze) byla zjištěna vyšší MVD intratumorózně než v periférii tumoru na hranici s nenádorovým stromatem. Ukázalo se, že korelace peritumorózní MVD u pacientů s kostní invazí a bez kostní invaze nebyla významná, ani nebyly významné rozdíly mezi jednotlivými typy kostní invaze. Při hodnocení intratumorózní MVD se ukázalo se, že infiltrativní typ kostní invaze vykazuje signifikantně vyšší intratumorózní MVD (medián 27,5 cév/HPF) ve srovnání s erozivním (medián 20 cév/HPF) a smíšeným (medián 18 cév/HPF) typem kostní invaze a dále byl zjištěn trend zvýšené intratumorózní MVD v případě jakékoliv kostní invaze ve srovnání s případy bez kostní invaze (medián 20 vs. 18 cév/HPF). Naopak korelace zvýšené proliferativní aktivity Ki-67 ani četnosti mutovaného p53 u případů OSCC s přítomnou kostní invazí nebyla signifikantně prokázána. Vysvětlením proč Ki-67 postrádá významnější prognostickou hodnotu může být pravděpodobně to, že je markerem celkové frakce proliferujících buněk, což odpovídá nejen buňkám v konstantní proliferaci, ale také proliferujícím buňkám určeným pro terminální diferenciaci [130].

Dále byl srovnáván vztah markerů CD34, Ki-67 a p53 k nádorovému gradu a byla prokázána tendence zvýšené MVD (zejména intratumorózní) s vyšším nádorovým gradem (intratumorózně medián 16 cév/HPF u G1 vs. 25 cév/HPF u G3). Současně se prokázala zvýšená proliferativní aktivita Ki-67 a četnost mutovaného p53 u případů s nižší diferenciací nádoru (zejména ve vztahu G1 oproti G2 a G3).

Dále byla prokázána korelace mezi zvýšenou MVD a přítomností uzlinových metastáz (intratumorózně medián 14,5 cév/HPF u pN0 vs. 25 cév/HPF u případů s uzlinovými metastázami). Průměrná proliferativní aktivita Ki-67 byla u případů bez uzlinových metastáz nižší (12,9 %) než u případů s pozitivními lymfatickými uzlinami (19,3 %). Rovněž byla zjištěna zvýšená frekvence mutovaného p53 u případů s uzlinovými metastázami (80 %) než u případů bez metastáz (41,7 %).

Ukazuje se tak, že uvedené imunohistochemické markery mají vztah spíše k nádorovému gradu a k postižení lymfatických uzlin, zatímco těsnější vztah těchto markerů ke kostní invazi se zatím neprokázal a je potřeba hledat další molekulární markery se vztahem ke kostní invazi. Mohlo by se jednat o markery, které by nám pomohli predikovat lokální agresivitu

nádoru a tím i možnost kostní invaze, např. by se mohlo jednat o molekuly nádorových kmenových buněk (CD44, CD133, Oct-4), markery epitelově-mezenchymální tranzice (např. E-cadherin, vimentin), molekuly ve vztahu k nádorovému a nenádorovému mezenchymu (úloha OPG, RANKL, PTHrP, TNF alfa, IL-6, IL-11, TGF-beta), metylační markery [153]. Jednou z možností jak by mohla být kostní invaze v budoucnu zkoumána, může představovat tkáň získaná pomocí 3D tiskárny [154].

6. Souhrn

Nádory hlavy a krku jsou v současné onkologii nezanedbatelnou složkou nádorových onemocnění a představují jedny z nádorů, jejichž incidence v posledních letech trvale narůstá. V onkologii nádorů hlavy a krku je důležitá těsná spolupráce všech složek, podílejících se na diagnostice a terapii těchto nádorů (zubní lékař, chirurg, patolog, onkolog). Důsledné histopatologické zhodnocení všech prognostických faktorů je důležitou součástí tohoto komplexu. Prognostický význam má zejména lokalizace, velikost, hloubka invaze, histologický typ, stupeň diferenciacie tumoru, intravaskulární a perineurální invaze, pozitivita resekčních okrajů a vzdálenost nádoru od okrajů, metastázy v regionálních lymfatických uzlinách a extrakapsulární šíření, invaze a typ invaze do kosti. Cílem projektu bylo posoudit vztah těchto histopatologických parametrů spinocelulárních karcinomů dutiny ústní ke stadiu nádorového onemocnění, dále jsme se zaměřili na srovnání typu kostní invaze ve vztahu k histopatologickým faktorům (stupeň diferenciacie nádoru, velikost nádoru, postižení regionálních lymfatických uzlin) a klinicko-patologickým faktorům (výskyt recidiv, 5leté přežití nemocných). Dalším cílem je srovnání typu kostní invaze, nádorového gradu a postižení lymfatických uzlin ve vztahu k prognostickým faktorům detekovaným imunohistochemicky – p53, Ki-67 a mikrovaskulární denzitě. Výsledky byly statisticky zpracovány a jejich signifikance ověřována pomocí Pearsonova a McNemarova chí-kvadrát testu v programu Statistica 12 (StatSoft).

Soubor 49 pacientů tvořilo 34 mužů (69,39 %) a 15 žen (30,61 %), medián věku byl 61 let (rozmezí 36-85). U 30 nemocných (61,22 %) byla prokázána kostní invaze (tj. o IV. stadium nemoci), u 19 pacientů (38,78 %) nádor do kosti neprorůstal, navzdory provedené resekci čelistní kosti (tj. jde o II. a III. stadium nemoci). Nejčastější lokalizací nádoru v dutině ústní celého souboru pacientů byl zubní alveol + retromolární oblast (59,18 %), dále následuje spodina dutiny ústní (22,45 %), tvář (8,16 %), patro (6,12 %) a jazyk (4,08 %). Nejdříve jsme srovnávali histopatologické znaky mezi jednotlivými stadii nemoci (II-IV). Základním předpokladem úspěchu chirurgické léčby orálních karcinomů je radikální odstranění nádoru s bezpečnostním lemem zdravé tkáně o rozsahu 5 mm a více. V sestavě našich nemocných převažuje pozitivita resekčních okrajů u pacientů léčených ve IV. klinickém stadiu, která signifikantně převyšuje nad pozitivitou okrajů v III. a II. stadiu ($p=0,005$). To ukazuje, že výskyt nádorových struktur v blízkosti resekčního okraje může být považován za indikátor agresivnější nemoci. Naše práce je v souladu s předpokladem, že se zvyšujícím se stadiem onemocnění stoupá četnost uzlinových metastáz (zejména ve III. a IV. stadiu vůči II. stadiu

nemoci), extrakapsulární šíření nádoru (ECS) v postižených uzlinách, které bylo zaznamenáno jen ve IV. stadiu a ukazuje tak na fakt, že ECS je známkou pokročilosti nádoru a špatné prognózy, dále také stoupá maximální hloubka invaze (průměrně 8 mm ve II. stadiu; 9,4 mm ve III. stadiu a 17 mm ve IV. stadiu) a nízká diferenciacie nádorů (rovněž zejména ve III. a IV. stadiu vůči II. stadiu). Ve třetím a čtvrtém stadiu onemocnění byl dále zaznamenán nárůst frekvence perineurálního šíření nádorových buněk ($p=0,07$).

Invaze do kostní tkáně je známkou IV. stadia nemoci a může tak být prediktorem špatné prognózy. U pacientů léčených ve IV. stadiu jsme se proto dále detailněji zaměřili na prognostické faktory související s kostní invazí, resp. typem kostní invaze. Z 30 pacientů s prokázanou kostní invazí tvořil erozivní typ 26,67 %, infiltrativní typ 40 % a smíšený typ 33,33 %. Nejčastější lokalizací nádoru s prokázanou kostní invazí byl zubní alveol + retromolární oblast (60 %), dále následuje spodina dutiny ústní (26,67 %), tvář (10 %) a patro (3,33 %). Srovnáním nádorového gradu u případů s jakoukoli kostní invazí tvořily nádory G1 26,67 % a nádory G2+G3 73,33 %. U erozivního typu kostní invaze tvořily karcinomy G1 50 %, G2+G3 50 %, u infiltrativního typu G1 16,7 %, G2+G3 83,3 % a u smíšeného typu G1 20 %, G2+G3 80 %. Prokázali jsme statisticky významnou signifikanci mezi typem kostní invaze a nádorovým gradem, pokud se jedná o infiltrativní a smíšený typ vůči erozivnímu typu kostní invaze ($p=0,005$). Ze všech nádorů s prokázanou kostní invazí byly metastázy v regionálních lymfatických uzlinách ve 42,86 % případů. Rozdíly v postižení regionálních lymfatických uzlin nebyly z hlediska typu kostní invaze statisticky signifikantní ($p=0,79$) – erozivní typ: 50 %, infiltrativní typ 40 %, smíšený typ 40 %. Dále jsme se pokoušeli zjistit, zda existuje vztah mezi největší velikostí nádoru a typem kostní invaze. U erozivního typu kostní invaze tvořily nádory <2 cm 11 %, 2-4 cm 78 % a >4 cm 11 %, u infiltrativního typu nebyly nádory <2 cm diagnostikovány, nádory velikosti 2-4 cm tvořily 77 % a velikosti > 4 cm 23 %, u smíšeného typu byly nálezy obdobné - nádory velikosti 2-4 cm tvořily 80 % a velikosti >4 cm 20 %. Průměrná velikost nádoru u erozivního typu byla 34 mm, u infiltrativního typu 36 mm a u smíšeného typu 34 mm. Zjistili jsme tak, že typ kostní invaze nesouvisí s velikostí nádoru. Dále jsme sledovali vztah typu kostní invaze k výskytu recidiv a přežití pacientů. U pacientů s erozivním typem kostní invaze byly lokoregionální recidivy zaznamenány u 62,5 % pacientů, s infiltrativním typem u 77 % a se smíšeným typem u 50 %. Nádory s infiltrativním typem kostní invaze tak představovaly vyšší riziko lokoregionální recidivy, rozdíly ale nebyly statisticky signifikantní. Medián přežití u erozivního typu invaze byl 66 měsíců, u smíšeného typu 20 měsíců a u infiltrativního typu 13 měsíců. 5leté přežití

bylo u erozivního typu cca 60 %, u smíšeného typu 40 % a u infiltrativního typu pouze 15 %. Ukázalo se tak, že infiltrativní typ kostní invaze je spojen s kratším přežitím a špatnou prognózou.

Kromě histologických znaků jsme dále sledovali imunohistochemicky mikrovaskulární denzitu (MVD) pomocí exprese CD34 a dále četnost mutovaného p53 a četnost Ki-67. Byla zjištěna vyšší MVD intratumorózně než peritumorózně. Ukázalo se, že korelace peritumorózní MVD u pacientů s kostní invazí a bez kostní invaze nebyla významná, ani nebyly významné rozdíly mezi jednotlivými typy kostní invaze. Při hodnocení intratumorózní MVD se ukázalo se, že infiltrativní typ kostní invaze vykazuje vyšší intratumorózní MVD ve srovnání s erozivním a smíšeným typem kostní invaze a dále byl zjištěn trend zvýšené intratumorózní MVD v případě jakékoliv kostní invaze ve srovnání s případy bez kostní invaze. Naopak korelace zvýšené proliferační aktivity Ki-67 ani četnosti mutovaného p53 s přítomnou kostní invazí nebyla signifikantně prokázána. Dále byl srovnáván vztah markerů CD34, Ki-67 a p53 k nádorovému gradu a byla prokázána tendence zvýšené MVD (zejména intratumorózní) s vyšším nádorovým gradem. Současně se prokázala zvýšená proliferační aktivita Ki-67 a četnost mutovaného p53 u případů s nižší diferenciací nádoru (zejména ve vztahu G1 vůči G2 a G3). Dále byla prokázána korelace mezi zvýšenou MVD a přítomností uzlinových metastáz. Průměrná proliferační aktivita Ki-67 byla u případů bez uzlinových metastáz nižší než u případů s pozitivními lymfatickými uzlinami. Rovněž byla zjištěna zvýšená frekvence mutovaného p53 u případů s uzlinovými metastázami (80 %) než u případů bez metastáz (41,7 %).

Závěrem lze říct, že prognóza pacientů s OSCC ve IV. stadiu nádorového onemocnění (kterou determinuje zejména přítomná kostní invaze) je špatná a je potřeba hledat nové markery, které by nám pomohly dále stratifikovat nemocné dle prognózy a mohly by mít i terapeutický dopad.

7. Použité zkratky

Bcl-2 – B-cell lymphoma 2

CD34 - Cluster of differentiation 34

ČR – Česká republika

EBV – Epstein-Barr virus

eIF4E - Eukaryotic translation initiation factor 4E

ECS - Extracapsular spread

EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid

EGF - Epidermal growth factor

EGFR - Epidermal growth factor receptor

EMT - Epithelial–mesenchymal transition

FGF - Fibroblast growth factor

FNOL – Fakultní nemocnice Olomouc

G1 – grade 1

G2 – grade 2

G3 – grade 3

HE - hematoxylin-eosin

HPF – high power field

HPV - Human Papillomavirus

IGF-1 - Insulin Like Growth Factor 1

IL-1 β - Interleukin 1 beta

IL-10 – Interleukin 10

IL-11 – Interleukin 11

IL-12 – Interleukin 12

IL-18 – Interleukin 18

IL- 4 – Interleukin 4

IL-6 – Interleukin 6

LF UP – Lékařská fakulta Univerzity Palackého

LOX - Lysyl oxidase

LU – lymfatická uzlina

min. – minuta

mm – milimetr

MR – magnetická rezonance

NCAM - Neural cell adhesion molecule

OPG – Osteoprotegerin

OPMD – Oral potentially malignant disorders

ORL - Otorhinolaryngology

OSCC – oral squamous cell carcinoma

PCNA - Proliferating cell nuclear antigen

pH - potential of hydrogen (pondus hydrogenia)

PI – perineurální invaze

PTHrP - Parathyroid hormone-related protein

RANK - Receptor activator of nuclear factor kappa-B

RANKL - Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand

SCC - Squamous cell carcinoma

TGF- β - Transforming growth factor β

TM – Tetrathiomolybdate

TNF- α - Tumor necrosis factor α

ÚKMP – Ústav klinické a molekulární patologie

VEGF - Vascular endothelial growth factor

W – watt

WHO - World Health Organization

8. Původní vědecké publikace, přehledové články, postery

Původní vědecké publikace

1. **Michálek J.**, Pink R., Dvořák Z., Brychtová S., Král D., Tvrdý P., Kolář Z.: Srovnání histopatologických a klinických prognostických faktorů spinocelulárních karcinomů dutiny ústní. Česká stomatologie a Praktické zubní lékařství 2019 – přijato k publikaci.
2. Chmelarova M, Laco J, Kovarikova H, Baranova I, Dundr P, Nemejcova K, **Michalek J**, Vosmik M, Palicka V. Elevated DNA methylation in malignant tumors of the sinonasal tract and its association with patient survival. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2018 Sep; 162(3): 232-238. (IF 1,087)
3. Laco J, Kovaříková H, Chmelařová M, Vošmiková H, Siegllová K, Baranová I, Dundr P, Němejcová K, **Michálek J**, Šatanková J, Vošmik M, Ryška A. MicroRNA expression in SMARCB1/INI1-deficient sinonasal carcinoma: a clinicopathological and molecular genetic study. Virchows Arch. 2018 May; 472(5): 871-875. (IF 2,936)
4. Laco J, Kovarikova H, Chmelarova M, Vosmikova H, Siegllova K, Bubancova I, Dundr P, Nemejcova K, **Michalek J**, Celakovsky P, Mottl R, Sirak I, Vosmik M, Marek I, Geryk T, Mejzlik J, Satankova J, Ryska A. Analysis of DNA methylation and microRNA expression in NUT (nuclear protein in testis) midline carcinoma of the sinonasal tract: a clinicopathological, immunohistochemical and molecular genetic study. Neoplasma. 2018; 65(1): 113-123. (IF 1,696)
5. Kovarikova H, Bubancova I, Laco J, Siegllova K, Vosmikova H, Vosmik M, Dundr P, Nemejcova K, **Michalek J**, Palicka V, Chmelarova M. Deregulation of selected microRNAs in sinonasal carcinoma: Value of miR-21 as prognostic biomarker in sinonasal squamous cell carcinoma. Head Neck. 2017 Dec; 39(12): 2528-2536. (IF 2,471)
6. Laco J, Chmelařová M, Vošmiková H, Siegllová K, Bubancová I, Dundr P, Němejcová K, **Michálek J**, Čelakovský P, Mottl R, Sirák I, Vošmik M, Ryška A. SMARCB1/INI1-deficient sinonasal carcinoma shows methylation of RASSF1 gene: A clinicopathological,

immunohistochemical and molecular genetic study of a recently described entity. *Pathol Res Pract*. 2017 Feb; 213(2): 133-142. (IF 1,466)

7. Laco J, Sieglová K, Vošmiková H, Dundr P, Němejcová K, **Michálek J**, Čelakovský P, Chrobok V, Mottl R, Mottlová A, Tuček L, Slezák R, Chmelařová M, Sirák I, Vošmik M, Ryška A. The presence of high-risk human papillomavirus (HPV) E6/E7 mRNA transcripts in a subset of sinonasal carcinomas is evidence of involvement of HPV in its etiopathogenesis. *Virchows Arch*. 2015 Oct; 467(4): 405-15. (IF 2,936)
8. Chmelařová M, Sirák I, Mžik M, Sieglová K, Vošmiková H, Dundr P, Němejcová K, **Michálek J**, Vošmik M, Palička V, Laco J. Importance of Tumour Suppressor Gene Methylation in Sinonasal Carcinomas. *Folia Biol (Praha)*. 2016; 62(3): 110-9. (IF 1,044)
9. Mihál V, Potyszova D, Krahulik D, **Michálek J**, Michalkova K. Segmentová bolest zad jako následek vzácného schwannomu páteřního kanálu. *Pediatric pro praxi*. 2015; 16(6):420-422.
10. Mihál V, Malý T, **Michálek J**, Kratochvílová T, Sobková K, Michálková K. Choledochální cysta III. typu s malrotací jako příčina novorozenecké duodenální obstrukce. *Pediatric pro praxi*. 2018; 19(5):290-295.

Přehledové články

1. **Michalek J**, Brychtova S, Pink R. Prognostic and predictive markers for perineural and bone invasion of oral squamous cell carcinoma. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. **(IF 1,087)** – přijato k publikaci.
2. Kral M, **Michalek J**, Skarda J, Tichy T, Smakal O, Kodet R, Student V. High-grade urothelial bladder cancer in children: A case report and critical analysis of the literature. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2016 Dec;160(4):578-582. **(IF 1,087)**

Postery

1. **Michálek J.** Distální typ epiteloidního sarkomu u 31leté ženy. 21. sjezd českých a slovenských patologů, Praha, 7.-8. 11. 2014.
2. **Michálek J, Brychtová S, Pink R.** Význam hodnocení typu kostní invaze spinocelulárních karcinomů dutiny ústní, retrospektivní studie. 23. sjezd českých a slovenských patologů, Ostrava, 11.-12. 11. 2016.
3. **Michálek J, Brychtová S, Pink R.** Význam hodnocení typu kostní invaze spinocelulárních karcinomů dutiny ústní, retrospektivní studie. 20. seminář mladých patologů a 44. sjezd Společnosti českých patologů, Litomyšl, 31. 3.-1. 4. 2017.

Elevated DNA methylation in malignant tumors of the sinonasal tract and its association with patient survival

Marcela Chmelarova^a, Jan Laco^b, Helena Kovarikova^a, Ivana Baranova^a, Pavel Dundr^c, Kristyna Nemejcova^c, Jaroslav Michalek^d, Milan Vosmik^e, Vladimir Palicka^a

Background. Epigenetic modifications have been recognized as an important mechanism underlying carcinoma progression. DNA methylation plays an important role in cancer biology and represents potentially heritable changes in gene expression that do not involve DNA sequence. The aim of this study was to investigate promoter methylation of selected genes in sinonasal carcinoma by comparison with noncancerous sinonasal tissue.

Methods. To search for epigenetic events (methylation in 25 tumor suppressor genes) we used MS-MLPA (Methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification) to compare methylation status of 59 formalin fixed, paraffin embedded tissue samples of sinonasal carcinomas with 18 control samples. The most important changes in methylation were confirmed using MSP (Methylation specific PCR). Detected alterations in methylation were compared with clinicopathological characteristics.

Results. Using a 20% cut-off for methylation (MS-MLPA), we found significantly higher methylation in *GATA5* ($P=0.0005$), *THSB1* ($P=0.0002$) and *PAX5* ($P=0.03$) genes in the sinonasal cancer group compared to the control group. Methylation in five or more genes was associated with impaired overall survival ($P=0.017$).

Conclusion. These findings provide evidence that alterations in methylation profile may be one of the major mechanisms in sinonasal carcinogenesis. In addition, changes in methylation could potentially be used as prognostic factors of sinonasal carcinoma and may have implications for future individualized therapy based on epigenetic changes.

Key words: biomarkers, DNA methylation, sinonasal carcinoma, epigenetics

Received: November 27, 2017; Accepted: March 21, 2018; Available online: March 27, 2018
<https://doi.org/10.5507/bp.2018.012>

^aInstitute for Clinical Biochemistry and Diagnostics, Charles University, Faculty of Medicine in Hradec Kralove and University Hospital Hradec Kralove, Czech Republic

^bThe Fingerland Department of Pathology, Charles University, Faculty of Medicine in Hradec Kralove and University Hospital Hradec Kralove, Czech Republic

^cDepartment of Pathology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Czech Republic

^dDepartment of Clinical and Molecular Pathology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc and University Hospital Olomouc, Czech Republic

^eDepartment of Oncology and Radiotherapy, Charles University, Faculty of Medicine in Hradec Kralove and University Hospital Hradec Kralove, Czech Republic

Corresponding author: Marcela Chmelarova, e-mail: ChmelarovaMarcela@seznam.cz

INTRODUCTION

Malignant tumors of the sinonasal tract are rare tumors of the head and neck area that account for approximately 3% to 5% of all upper respiratory tract malignancies¹. In 2014, 49 new cases in men and 39 in women were diagnosed in the Czech Republic, giving the incidence rate 0.84/100,000 (ref.²). These figures probably reflect the general status in Europe and worldwide³⁻⁴. The average age at which patients are diagnosed with sinonasal carcinomas is between 50-60 years. However, there are some risk factors including exposure to wood and leather dust, tobacco smoke exposure, contact with chemical substances such as formaldehyde, chrome pigment, nickel and asbestos and HPV infection⁵. Diagnosis and treatment of these tumors pose several problems due to their very low incidence, histological diversity and production of non-specific symptoms in the early stages that can

closely mimic inflammatory conditions. Their prognosis largely depends on histology, location and staging⁶.

Sinonasal carcinoma has been considered as a disease driven by progressive genetic alterations, such as mutations involving oncogenes or tumor suppressor genes, as well as chromosomal abnormalities⁵. In addition, approximately 20-30% of these tumors harbor transcriptionally active high risk human papillomavirus infection⁷. More recently, it has been demonstrated that sinonasal cancer is also driven by epigenetic alterations⁸⁻⁹. Currently, DNA methylation is one of the most broadly studied and well-characterized epigenetic modifications. Our knowledge about it is dating back to 1969, when Griffith and Mahler suggested that DNA methylation may be important in long term memory function¹⁰. DNA methylation is mediated by DNA methyltransferases, which catalyze the covalent addition of a methyl group to the 5-carbon of the cytosine in CpG context dispersed throughout the

genome or in DNA repetitive regions. Promoter DNA methylation at CpG sites represses gene expression by impeding access to transcription factors and inhibiting RNA polymerase II (ref. 11). In cancer, aberrant DNA methylation is typically observed in the promoter/exon 1 regions of various tumor suppressor genes¹², transcription factors¹³, DNA repair genes and cell cycle regulators leading to their transcriptional silence¹⁴. However, various tumor types have different patterns of hypermethylated genes.

As sinonasal carcinomas are group of aggressive tumors with poor prognosis, it is very important to know their molecular parameters to be able to establish diagnostic strategies and individualized therapies. Sinonasal malignancies are rare, which makes it difficult to conduct extensive methylation studies. In the present study we were able to gather, thanks to cooperation of three university hospitals in Czech Republic, a huge and unique group of sinonasal cancer patients. The aim of this study was to investigate promoter methylation of specific genes in sinonasal carcinoma by comparison with nonmalignant sinonasal tissue. We are fully aware of the fact that the absence of mRNA expression analysis may be the main weakness of this study. However, we are unable to provide relevant information about gene expression of selected genes, because we were limited to work only with FFPE tissue samples, which are generally not suitable for RNA isolation and subsequent gene expression analysis due to high fragmentation of RNA.

MATERIALS AND METHODS

Formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples of sinonasal carcinomas and noncancerous sinonasal tissue were obtained from 77 patients: 59 patients with sinonasal cancer, and 18 patients with noncancerous sinonasal tissue. Only tumors primarily originating from the nasal cavity, maxillary sinuses and ethmoid complex were included. No tumors were found in the frontal or sphenoid sinuses. The samples of noncancerous tissue (9 mucosal specimens from the nasal cavity and 9 from the maxillary sinus) were obtained from patients treated for chronic rhinitis and sinusitis. The paraffin blocks were retrieved from the archives of the Fingerland Department of Pathology, University Hospital Hradec Kralove; the Department of Pathology, General University Hospital, Prague, Czech Republic; and the Department of Pathology, University Hospital Olomouc, Czech Republic. All slides were reviewed by experienced head and neck pathologist (J.L.) and the carcinomas were classified according to the current WHO classification¹⁵. The study was approved by the Ethics Committee of University Hospital Hradec Kralove. The need for informed consent was waived by the review board in view of the retrospective nature of the study and long archival period of the formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples involved.

For every patient were recorded data such as gender, age at the time of diagnosis, smoking history (non-smoker vs. ex-smoker vs. current smoker), occupation (risky vs.

non-risky), and tumor localization, including the nasal cavity, maxillary sinus, and ethmoid complex, laterality and pathological TNM. During the follow-up period local recurrence, regional recurrence, distant recurrence, death, and tumor-related death staging were recorded. When radical surgery was not performed, clinical TNM staging was used instead. Treatment modalities were radical surgery, radiotherapy, and chemotherapy in various combinations.

The tumor types included squamous cell carcinoma (SCC), lymphoepithelial carcinoma (LEC), sinonasal undifferentiated carcinoma (SNUC), adenocarcinoma, and neuroendocrine carcinoma. Vascular invasion, perineural spread, status of resection margins (in the case of radical surgery), and microscopic findings in the surrounding mucosa were also noted.

DNA for methylation analysis was extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples using a Qiagen DNA extraction kit (Hilden, Germany).

Methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification (MS-MLPA)

All tumor and control noncancerous samples were tested by the MS-MLPA probe set ME002 (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands), which can simultaneously check for aberrant methylation in 25 tumor suppressor genes (*BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *TP53*, *PTEN*, *MGMTa*, *PAX5*, *CDH13*, *TP73*, *WT1*, *VHL*, *GSTP1*, *CHFR*, *ESR1*, *RB1a*, *MSH6*, *MGMTb*, *THBS1*, *CADM1*, *STK1*, *PYCARD*, *PAX6*, *CDKN2A*, *GATA5*, *RARB*, *CD44*, *RB1b*). Probe sequences, gene loci and chromosome locations can be found at <http://www.mlpa.com>. The experimental procedure was carried out according to the manufacturer's instructions, with minor modifications as previously described⁸.

Methylation-specific polymerase chain reaction (MSP)

The most important genes showing highly significant methylation ($P < 0.001$) in MS-MLPA (*GATA4* and *THSB1*) were further tested by means of MSP for confirmation. MSP requires bisulfite treatment of genomic DNA, which is used for conversion of all unmethylated cytosines to uracils, leaving methylated cytosines unaffected. A total of 500 ng of genomic DNA was treated with bisulfite using the EZ DNA Methylation-Gold™ Kit according to the manufacturer's protocol (Zymo Research Corporation Irvine, CA, USA). MSP was performed on the Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden, Germany) in two types of reaction mixture within one run, for amplifying methylated and unmethylated DNA, respectively. Primers were designed using MethPrimer with consideration of the MS-MLPA probe locations and the FFPE DNA fragmentation. Primer sequences with amplicon lengths are listed in Table 1. MSP reaction mixture contained 10x PCR Buffer, MgCl₂ (25 mM), dNTPs solution Takara (2.5 mM), primers (10 μM), Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Foster City, CA, USA), SYTO®9 Dye (0.05 mM), bisulfite converted DNA and water. Each run included a bisulfite-converted universal methylated and unmethylated DNA (Qiagen, Hilden, Germany) and a no template control. Fluorescence data were analyzed using Rotor Gene Q

Table 1. MSP primers and amplicon information.

Amplicon name	Primer sequence 5'-3'	Amplicon size (bp)	CpGs/Primer
GATA5-M	Fw: TTAGCGTTGGGGTTTCGGTC	92	Fw: 3
	Rv: TAACCGCCCCGTATCGTACG		Rv: 4
GATA5-U	Fw: GGTTAGTGTGGGGTTTTGGTTGT	95	Fw: 3
	Rv: CTAACCACCCCATATCATAATC		Rv: 4
THBS1-M	Fw: AGCGTTTTTTTAAAAGCGCGC	109	Fw: 4
	Rv: TCCGAAATAAAAATTACTCCTAAAAAACGA		Rv: 2
THBS1-U	Fw: GAGTGTTTTTTTAAAAGTGTGTGG	110	Fw: 4
	Rv: TCCAAAATAAAAATTACTCCTAAAAACAA		Rv: 2

M - methylated, U - unmethylated

software. Amplicon was considered as methylated when there was amplification in reaction mixture with methylated primers or both types of reaction mixture. When there was amplification only in mixture with primer pair for unmethylated DNA, the amplicon was considered as unmethylated.

Statistical analysis

Basic descriptive statistics were adopted for the analysis: median, mean, and 95% confidence interval for continuous data, and absolute and relative frequencies for categorical data. The relationship between gene methylation and other independent factors was analyzed using the chi-square test, Fisher's exact test, or Logistic regression analysis. Kaplan-Maier and Logrank tests were used for survival analysis; Cox regression analysis was used to determine the influence of gene methylation upon survival. We considered $P < 0.05$ to be statistically significant. All statistical analyses were performed using STATISTICA Cz (data analysis software system) version 12 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).

RESULTS

Using a 20% cut-off for methylation (MS-MLPA), we observed significantly higher methylation in *GATA5* ($P=0.0005$), *THBS1* ($P=0.0002$) and *PAX5* ($P=0.03$) genes in the sinonasal cancer group compared to the control noncancerous group. For genes *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *VHL*, and *RB1a* the methylation rate did not exceed the 20% threshold; the other genes also showed relevant differences in methylation between samples with sinonasal carcinoma and control samples (see Fig. 1). Using MSP, we confirmed significantly higher methylation of *GATA5* gene in samples of sinonasal carcinoma in comparison with noncancerous sinonasal tissue ($P=0.03$). Using MSP we weren't able to confirm the presence of methylation of *THBS1* gene in cancer samples, but it could be the result of the assay strategy (6 CpGs in primers, compared to 2 CpG restriction sites in MS-MLPA probe).

Correlation with clinicopathological features

Clinicopathological data are listed below. Due to a few

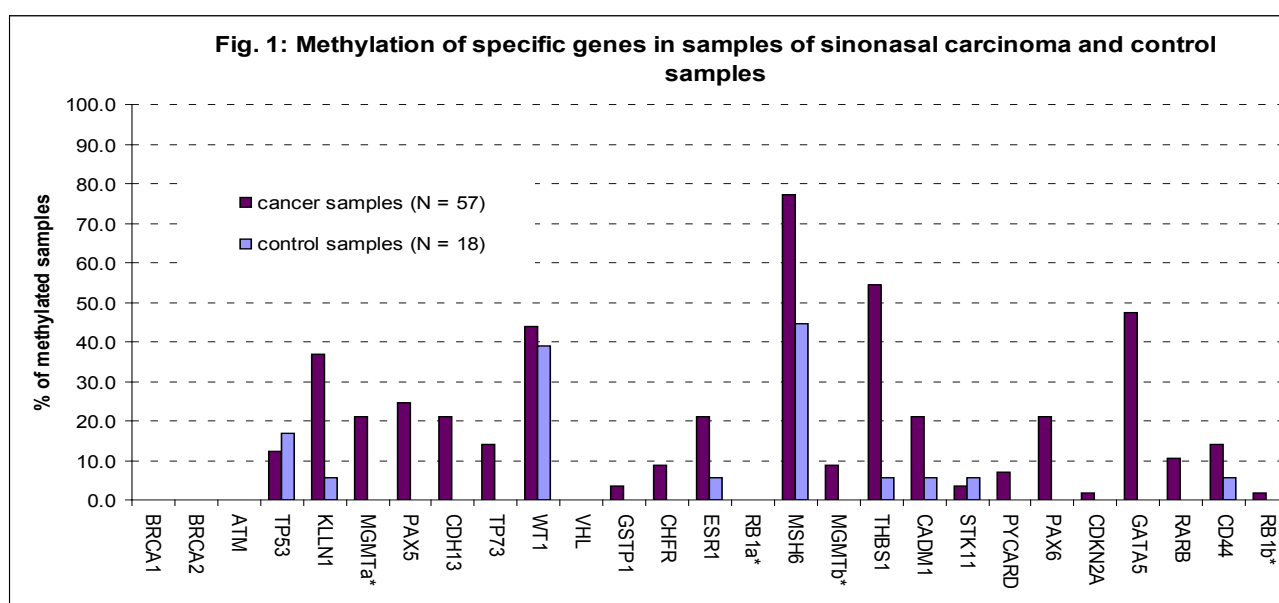


Fig. 1. Methylation of specific genes in samples of sinonasal carcinoma and control samples.

Comparison of methylation frequencies (cut-off value 20%) of the 25 analyzed genes in sinonasal cancer and control samples. * Two CpG loci (a and b) were analyzed

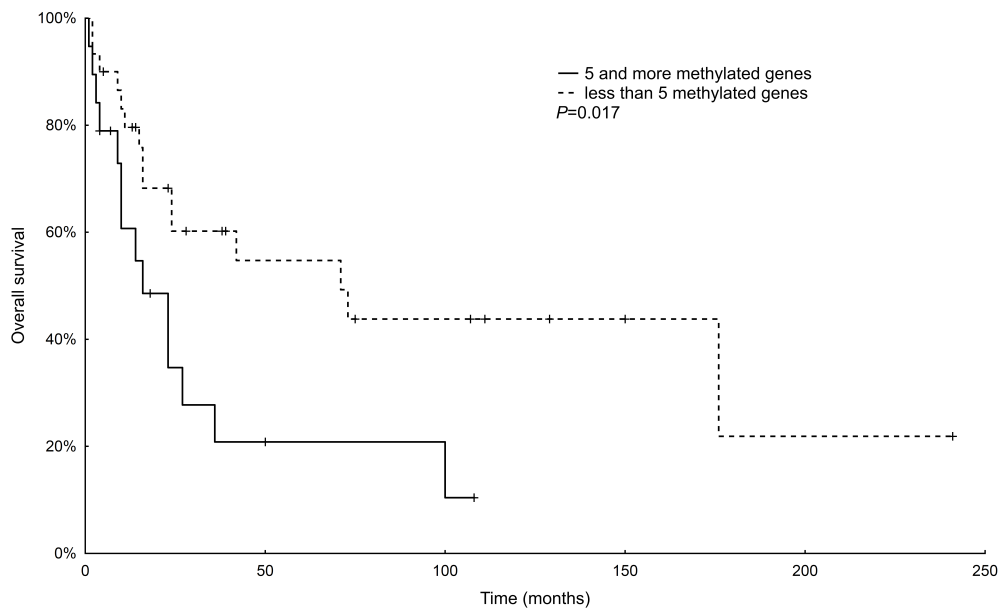


Fig. 2. Kaplan-Meier survival analysis.

Overall survival of patients according to the presence of methylation. Vertical hatch marks show censored data.

missing clinical data sums in the entire study sample or partial sums do not always add up to the total number of patients. The median age of patients at the time of diagnosis was 62 years (range 23–82 years) in the carcinoma group and 56.5 years (range 24–74 years) in the control group. The carcinoma group consisted of 39 males and 20 females and the control group 9 males and 9 females.

From those in the carcinoma group with a known history, 25 patients were non-smokers, 9 former smokers, and 17 were current smokers. In only 5/51 patients, occupational exposure to wood dust or other air pollutants/irritants was recorded.

As regards the whole study sample, most of the tumors arose in the nasal cavity, but SCCs were slightly more common in the maxillary sinus. The majority of the patients were diagnosed with advanced tumors and three patients had lung metastases (cM1) at the time of diagnosis.

Microscopic typing of the tumors resulted in 43 SCCs, 11 adenocarcinomas, 2 neuroendocrine carcinomas, 2 SNUCs, and 1 LEC. Vascular invasion was found in 7/59 tumors and perineural spread in 3/59.

The follow-up period ranged from 1 to 241 months (median 23 months). Local recurrence was found in 23/50 tumors, 5/50 recurred regionally, and 3/59 patients developed distant metastases in the lungs. During the follow-up period, 29/49 patients died, of whom 14/49 due to the tumor.

The methylation results from the carcinoma specimens were compared with clinicopathological characteristics mentioned above (Table 2). Presence of methylation in five or more genes was connected with worse overall survival ($P=0.017$), see Fig. 2. No correlation was found between DNA methylation and tumor type, stage, grade and smoking history.

DISCUSSION

A wide array of techniques is currently available to measure DNA methylation level. In our study we used MS-MLPA a semi-quantitative method for methylation profiling. MS-MLPA allows simultaneous assessment of aberrant promoter methylation of large sets of genes and requires only small quantities of short DNA fragments, making it very suitable for analysis of DNA isolated from FFPE tissue samples¹⁶. Using DNA methylation profiling as a biomarker has a number of advantages including DNA stability, relatively low cost of testing and restriction to limited specific regions of DNA. Moreover DNA methylation analysis can be performed from small biopsy samples obtained during the routine diagnostic work-up of patients. In our study we employed the idea of a candidate-gene approach for searching the potential prognostic biomarkers in sinonasal carcinoma. Recently, a successful example of methylation-based prognostic and predictive cancer biomarker is hypermethylation of *MGMT* promoter region, which is routinely analyzed and predicts response to temozolomide in glioblastoma patients and their clinical outcome¹⁷. Next promising biomarker is methylation of *XRCC2* gene predicting the occurrence of late toxicity in radiotherapy-treated cervical cancer patients¹⁸. In head and neck cancer area methylation in *PITX3*, *SHISA3* and *FOXF2* in squamous cell types of carcinomas also represent promising prognostic biomarkers¹⁹⁻²¹.

In our study we observed significantly higher methylation in three genes: *GATA5*, *THBS1* and *PAX5*. *GATA5* methylation has been already found in hepatocellular carcinoma²², colorectal cancer²³, glioblastomas²⁴ and ovarian cancer²⁵. *THBS1* methylation has been demonstrated in laryngeal squamous cell carcinoma²⁶, glioblastomas²⁴ and ovarian cancer²⁵ and *PAX5* methylation has been shown in

hepatocellular carcinoma²⁷ and non-small cell lung cancer²⁸. These findings supported the theory that methylation changes in these genes could lead to carcinogenesis also in sinonasal carcinoma.

Our experiments never showed methylation in genes *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *VHL*, and *RB1a*, suggesting that methylation of selected CpG loci of these tumor suppressor genes may not play an important role in carcinogenesis of the sinonasal area. On the other hand, other genes (see Fig. 1) did show promoter methylation to a varying extent above the 20% threshold. Methylation of *TP53*, *WT1* and *MSH6* was detected in more than 10% of control samples. Presence of this methylation could be associated with nature of the control samples. All control samples were obtained from patients with inflammation in sinonasal area. At sites of chronic inflammation, epithelial cells are exposed to high levels of reactive oxygen species and undergo cancer-associated DNA methylation changes, suggesting that inflammation may initiate epigenetic alterations²⁹. These findings correlate with research Wang et al. (2014), where methylation of *TIMP3*, *GSTP-1* and 14-3-3 σ was found in patients with chronic inflammation and in cancer patients³⁰.

Methylation changes may be connected with a more aggressive phenotype and thus be associated with unfavorable clinical outcome. We demonstrated correlation between presence of methylation in five or more genes and shorter overall survival time. These findings show that accumulation of changes in methylation during sinonasal cancer development could be associated with patient's prognosis and so has a potential to serve as a biomarker in the future.

CONCLUSION

Our observations provide evidence that changes in methylation of these genes may be one of the major mechanisms in sinonasal carcinogenesis. In addition, changes in methylation could potentially be used as prognostic markers of sinonasal cancer and may have implications for future individualized therapy based on epigenetic changes. Future work with a larger number and in various ethnic groups is warranted to confirm that methylation in selected genes is a reliable prognostic biomarker for SNC patients.

Acknowledgement: The authors are grateful to Veronika Hruzova for excellent technical assistance.

The study was supported by conceptual development of research organization MH CZ-DRO (FNHK) 00179906 (Ministry of Health, Czech Republic), by the project *BBMRI_CZ LM2015089* (Ministry of Education, Youth and Sports; Czech Republic), and by Research Development Program *PROGRES Q40/11* (Charles University).

Author contributions: MC: study design; PD, KN, JM, MV: patient selection; JL: reviewed all pathologic and control samples. IB, HK, MC: experiments performing;

MC, IB, HK: data analysis; MC, HK: manuscript writing; VP, JL: manuscript revision; All authors: final approval.

Conflict of interest statement: None declared.

REFERENCES

- Haerle SK, Gullane PJ, Witterick IJ, Zweifel C, Gentili F. Sinonasal carcinomas: epidemiology, pathology, and management. *Neurosurg Clin N Am* 2013;24(1):39-49.
- Epidemiology of malignant tumors in the Czech Republic. Available from www.svod.cz
- Turner JH, Reh DD. Incidence and survival in patients with sinonasal cancer: a historical analysis of population-based data. *Head Neck* 2012;34(6):877-85.
- Syrjänen K, Syrjänen S. Detection of human papillomavirus in sinonasal carcinoma: systematic review and meta-analysis. *Hum Pathol* 2013;44(6):983-91.
- Llorente JL, López F, Suárez C, Hermsen MA. Sinonasal carcinoma: clinical, pathological, genetic and therapeutic advances. *Nat Rev Clin Oncol* 2014;11(8):460-72.
- López F, Llorente JL, Costales M, García-Inclán C, Pérez-Escuredo J, Alvarez-Marcos C, Hermsen M, Suárez C. Molecular characterisation of sinonasal carcinomas and their clinical implications. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2013;64(4):289-96.
- Laco J, Siegllová K, Vošmiková H, Dundr P, Němejcová K, Michálek J, Čelakovský P, Chrobok V, Mottl R, Mottlová A, Tuček L, Slezák R, Chmelařová M, Sirák I, Vošmik M, Ryška A. The presence of high-risk human papillomavirus (HPV) E6/E7 mRNA transcripts in a subset of sinonasal carcinomas is evidence of involvement of HPV in its etiopathogenesis. *Virchows Arch* 2015;467(4):405-15.
- Chmelařová M, Sirák I, Mzik M, Siegllova K, Vosmikova H, Dundr P, Němejcová K, Michálek J, Vošmik M, Palička V, Laco J. Importance of tumor suppressor genes methylation in sinonasal carcinomas. *Folia Biol (Praha)* 2016;62(3):110-9.
- Laco J, Chmelařová M, Vošmiková H, Siegllová K, Bubancová I, Dundr P, Němejcová K, Michálek J, Čelakovský P, Mottl R, Sirák I, Vošmik M, Ryška A. SMARCB1/INI1-deficient sinonasal carcinoma shows methylation of RASSF1 gene: A clinicopathological, immunohistochemical and molecular genetic study of a recently described entity. *Pathol Res Pract* 2017;213(2):133-42.
- Griffith JS, Mahler HR. DNA ticketing theory of memory. *Nature* 1969;223(5206):580-2.
- Curradi M, Izzo A, Badaracco G, Landsberger N. Molecular mechanisms of gene silencing mediated by DNA methylation. *Mol Cell Biol* 2002;22(9):3157-73.
- Chmelařová M, Krepinska E, Spacek J, Laco J, Mzik M, Palicka V. Promoter methylation of GATA4, WIF1, NTRK1 and other selected tumor suppressor genes in ovarian cancer. *Folia Biol (Praha)* 2013;59(2):87-92.
- Bubancova I, Kovarikova H, Laco J, Ruzova E, Dvorak O, Palicka V, Chmelařová M. Next-generation sequencing approach in methylation analysis of HNF1B and GATA4 genes: searching for biomarkers in ovarian cancer. *Int J Mol Sci* 2017;18(2):pii:E474.
- Rao-Bindal K, Kleinerman ES. Epigenetic regulation of apoptosis and cell cycle in osteosarcoma. *Sarcoma* 2011;679457.
- Barnes L, Eveson JW, Reichart P and Sidransky D, editors. *Tumours of the Nasal Cavity and Paranasal Sinuses*. Lyon: IARC Press; 2005.
- Nygren AO, Ameziane N, Duarte HM, Vijzelaar RN, Waisfisz Q, Hess CJ, Schouten JP, Errami A. Methylation-specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic Acids Res* 2005;33(14):e128.
- Iaccarino C, Orlandi E, Ruggeri F, Nicoli D, Torricelli F, Maggi M, Cerasti D, Pisanello A, Pedrazzi G, Froio E, Crafa P, D'Abbiere N, Michiara M, Ghadirpour R, Servadei F. Prognostic value of MGMT promoter status in non-resectable glioblastoma after adjuvant therapy. *Clin Neurol Neurosurg* 2015;132:1-8.
- Paulíková S, Chmelařová M, Petera J, Palička V, Paulík A. Hypermethylation of RAD51L3 and XRCC2 genes to predict late toxicity in chemoradiotherapy-treated cervical cancer patients. *Folia Biol (Praha)* 2013;59(6):240-5.
- Sailer V, Holmes EE, Gevensleben H, Goltz D, Dröge F, Franzen A, Dietrich J, Kristiansen G, Bootz F, Schröck A, Dietrich D. PITX3 DNA

- methylation is an independent predictor of overall survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Epigenetics* 2017;9:12. doi: 10.1186/s13148-017-0317-7. eCollection
20. Shen Z, Zhou C, Li J, Ye D, Deng H, Cao B, Hao W, Lin L, Zhang Y. SHISA3 Promoter Methylation Is a Potential Diagnostic and Prognostic Biomarker for Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Biomed Res Int* 2017;9058749. doi: 10.1155/2017/9058749
 21. Chen X, Hu H, Liu J, Yang Y, Liu G Ying X1, Chen Y, Li B, Ye C, Wu D, Duan S. FOXF2 promoter methylation is associated with prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Tumour Biol* 2017;39(2):1010428317692230.
 22. Mzik M, Chmelarova M, John S, Laco J, Slaby, O Kiss I, Bohovicová L, Palicka V, Nekvindova J. Aberrant methylation of tumour suppressor genes WT1, GATA5 and PAX5 in hepatocellular carcinoma. *Clin Chem Lab Med* 2016;54(12):1971-80.
 23. Zhang X, Song YF, Lu HN, Wang DP, Zhang XS Huang SL, Sun BL, Huang ZG. Combined detection of plasma GATA5 and SFRP2 methylation is a valid noninvasive biomarker for colorectal cancer and adenomas. *World J Gastroenterol* 2015;21(9):2629-37.
 24. Rankeillor KL, Cairns DA, Loughrey C, Short SC, Chumas P, Ismail A, Chakrabarty A, Lawler SE, Roberts P. Methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification identifies promoter methylation events associated with survival in glioblastoma. *J Neurooncol* 2014;117(2):243-51.
 25. Chmelarova M, Krepinska E, Spacek J, Laco J, Nekvindova J, Palicka V. Methylation analysis of tumor suppressor genes in ovarian cancer using MS-MLPA. *Folia Biol (Praha)* 2012;58(6):246-50.
 26. Huang C, Zhou X, Li Z, Liu H, He Y, Ye G, Huang K. Downregulation of thrombospondin-1 by DNA hypermethylation is associated with tumor progression in laryngeal squamous cell carcinoma. *Mol Med Rep* 2016;14(3):2489-96.
 27. Shitani M, Sasaki S, Akutsu N, Takagi H, Suzuki H, Nojima M, Yamamoto H, Tokino T, Hirata K, Imai K, Toyota M, Shinomura Y. Genome-wide analysis of DNA methylation identifies novel cancer-related genes in hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol* 2012;33(5):1307-17.
 28. Pesek M, Kopeckova M, Benesova L, Meszarosova A, Mukensnabl P, Bruha F, Minarik M. Clinical significance of hypermethylation status in NSCLC: evaluation of a 30-gene panel in patients with advanced disease. *Anticancer Res* 2011;31(12):4647-52.
 29. Ding N, Bonham EM, Hannon BE, Amick TR, Baylin SB, O'Hagan HM. Mismatch repair proteins recruit DNA methyltransferase 1 to sites of oxidative DNA damage. *J Mol Cell Biol* 2016;8(3):244-54.
 30. Wang YJ, He L, Yuan M, Tsang WW, Hao L, Wang M, Chow LW, Cheung MN, Liu Q, Ng EL, Loo WT, Chow CY, Bai LJ, Yang Z. Epigenetic changes of TIMP-3, GSTP-1 and 14-3-3 sigma genes as indication of status of chronic inflammation and cancer. *Int J Biol Markers* 2014;29(3),e208-14.

Importance of Tumour Suppressor Gene Methylation in Sinonasal Carcinomas

(MS-MLPA / DNA methylation / sinonasal carcinoma / epigenetics / HPV)

M. CHMELAŘOVÁ¹, I. SIRÁK², M. MŽIK¹, K. SIEGLOVÁ³, H. VOŠMIKOVÁ³,
P. DUNDR⁴, K. NĚMEJCOVÁ⁴, J. MICHÁLEK⁵, M. VOŠMIK², V. PALIČKA¹, J. LACO³

¹Institute for Clinical Biochemistry and Diagnostics, ²Department of Oncology and Radiotherapy,

³The Fingerland Department of Pathology, Charles University in Prague – Faculty of Medicine in Hradec Králové and University Hospital in Hradec Králové, Czech Republic

⁴Institute of Pathology, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Czech Republic

⁵Department of Clinical and Molecular Pathology, Palacký University Olomouc, Faculty of Medicine and Dentistry and University Hospital Olomouc, Czech Republic

Abstract. Epigenetic changes are considered to be a frequent event during tumour development. Hypermethylation of promoter CpG islands represents an alternative mechanism for inactivation of tumour suppressor genes, DNA repair genes, cell cycle regulators and transcription factors. The aim of this study was to investigate promoter methylation of specific genes in samples of sinonasal carcinoma by comparison with normal sinonasal tissue. To search for epigenetic events we used methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification (MS-MLPA)

to compare the methylation status of 64 tissue samples of sinonasal carcinomas with 19 control samples. We also compared the human papilloma virus (HPV) status with DNA methylation. Using a 20% cut-off for methylation, we observed significantly higher methylation in *RASSF1*, *CDH13*, *ESR1* and *TP73* genes in the sinonasal cancer group compared with the control group. HPV positivity was found in 15/64 (23.4 %) of all samples in the carcinoma group and in no sample in the control group. No correlation was found between DNA methylation and HPV status. In conclusion, our study showed that there are significant differences in promoter methylation in the *RASSF1*, *ESR 1*, *TP73* and *CDH13* genes between sinonasal carcinoma and normal sinonasal tissue, suggesting the importance of epigenetic changes in these genes in carcinogenesis of the sinonasal area. These findings could be used as prognostic factors and may have implications for future individualised therapies based on epigenetic changes.

Received October 22, 2015. Accepted March 30, 2016.

This study was supported by the Ministry of Health of the Czech Republic – conceptual development of research organization MH CZ – DRO (FNHK) 00179906, by the Charles University Research Development Schemes, Czech Republic PRVOUK P37/11 and P27/LF1/1, and by the project of the Ministry of Health of the Czech Republic – conceptual development of research organization Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure BBMRI LM2010004.

Corresponding author: Marcela Chmelařová, Institute for Clinical Biochemistry and Diagnostics, University Hospital Hradec Králové, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic. Phone: (+ 420) 495 833 864; e-mail: chmelaarovamarcela@seznam.cz

Abbreviations: bp – base pairs, DNMT – DNA methyltransferase, EDTA – ethylenediamine tetraacetic acid, ER α – oestrogen receptor α , FFPE – formalin-fixed, paraffin-embedded, HPV – human papilloma virus, ISH – *in situ* hybridization, LEC – lymphoepithelial carcinoma, MS-MLPA – methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification, PCR – polymerase chain reaction, RT-PCR – reverse transcription and polymerase chain reaction, SCC – squamous cell carcinoma, SCNEC – small cell neuroendocrine carcinoma, SNC – sinonasal carcinoma, SNUC – sinonasal undifferentiated carcinoma, TNM – tumour, nodes, metastasis.

Introduction

Malignant tumours of the sinonasal tract are generally uncommon tumours of the head and neck area that account for approximately 3 % to 5 % of all upper respiratory tract malignancies (Haerle et al., 2013). In 2011, 51 new cases in men and 28 in women were diagnosed in the Czech Republic, giving incidence rates of 1.0/100,000 and 0.5/100,000 for males and females, respectively (Zvolský, 2014). These figures probably reflect the general status in Europe and worldwide (Turner and Reh, 2002; Syrjänen and Syrjänen, 2013). Diagnosis and treatment of these tumours pose several problems due to their very low incidence, histological diversity, production of non-specific symptoms in the early stages

that can simulate an inflammatory process and, because they have a variable prognosis depending on their histology, location and staging (López et al., 2013). There are established risk factors based on exposure to wood dust and various chemical substances such as nickel, formaldehyde, diisopropyl sulphate and dichloroethyl sulphide (Barnes et al., 2005). In general, sinonasal carcinomas (SNC) are radiosensitive; therefore, adjuvant or neoadjuvant radiation treatment may be indicated in advanced disease. Multidisciplinary surgical and medical oncologic approaches, which include ablation and reconstruction, have enhanced the survival outcome over the past few decades (Haerle et al., 2013).

Cancer has been considered as a disease driven by progressive genetic alterations, such as mutations involving oncogenes or tumour suppressor genes, as well as chromosomal abnormalities. However, more recently, it has been demonstrated that cancer is also driven by epigenetic alterations (Barton et al., 2008). Many different genes have been identified as being hypermethylated and silenced during tumour development. Because SNC are a group of aggressive tumours, it is very important to know their molecular parameters to establish diagnostic strategies and individualised therapies.

Epigenetics can be described as stable alteration in the gene expression potential that takes place during development and cell proliferation, without any changes in the gene sequence. DNA methylation is one of the most common epigenetic events taking place in the mammalian genome. This change, though heritable, is reversible, making it a possible therapeutic target. DNA methylation is a covalent chemical modification mediated by DNA cytosine methyltransferases, resulting in addition of a methyl group at the carbon-5 position of the cytosine ring in the CpG context (Das and Singal, 2004).

In the present study we used methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification (MS-MLPA), which allows simultaneous assessment of aberrant promoter methylation of a large set of genes. MS-MLPA requires only small quantities of short DNA fragments, making it very suitable for analysis of DNA isolated from formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) tissue samples (Nygren et al., 2005). We also decided to compare the human papilloma virus (HPV) status with DNA methylation, because it seems that HPV-positive tumours have stronger association with promoter methylation compared with HPV-negative tumours. This could be explained by overexpression and increased activation of DNA methyltransferases DNMT1 and DNMT3b, which are both key proteins in the regulation of DNA methylation (van Kempen et al., 2014).

Material and Methods

Formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples of sinonasal carcinomas and normal sinonasal tissue were obtained from 83 patients: 64 patients with sinonasal carcinoma, and 19 patients with a non-malignant diagnosis. Only tumours primarily originating from the na-

sal cavity, maxillary sinuses and ethmoid complex were included. No tumours were found in the frontal or sphenoid sinuses. The samples of normal tissue (10 mucosal specimens from the nasal cavity and 9 from the maxillary sinus) were obtained from patients treated for a non-malignant diagnosis such as chronic rhinitis and sinusitis. The paraffin blocks were retrieved from the archives of the Fingerland Department of Pathology, University Hospital Hradec Králové; the Department of Pathology, General University Hospital, Prague, Czech Republic; and the Department of Pathology, University Hospital Olomouc, Czech Republic. All malignant epithelial tumours of the sinonasal tract were diagnosed between August 1995 and August 2014. All slides were reviewed by an experienced head and neck pathologist (J. L.) and the carcinomas were classified according to the current WHO classification (Barnes et al., 2005). The study was approved by the Ethics Committee of University Hospital Hradec Králové. The need for informed consent was waived by the review board in view of the retrospective nature of the study and long archival period of the FFPE tissue samples involved.

Each patient had recorded the gender, age at the time of diagnosis, smoking history (non-smoker vs. ex-smoker vs. current smoker), occupation (risky vs. non-risky), and tumour localization, including the nasal cavity, maxillary sinus, and ethmoid complex, laterality and pathological TNM. During the follow-up period (until October 2014), local recurrence, regional recurrence, distant recurrence, death, and tumour-related death staging were recorded. When radical surgery was not performed, clinical TNM staging was used instead. Treatment modalities were radical surgery, radiotherapy, and chemotherapy in various combinations.

The tumour types included squamous cell carcinoma (SCC) (conventional, verrucous, papillary, basaloid, spindle cell, acantholytic, adenosquamous), lymphoepithelial carcinoma (LEC), sinonasal undifferentiated carcinoma (SNUC), adenocarcinoma (intestinal-type, non-intestinal-type, salivary gland-type), and neuroendocrine tumours (typical carcinoid, atypical carcinoid, small cell neuroendocrine carcinoma (SCNEC)). Vascular invasion, perineural spread, status of resection margins (in the case of radical surgery), and microscopic findings in the surrounding mucosa were also noted.

DNA for methylation analysis was extracted from the FFPE tissue samples using a Qiagen (Hilden, Germany) DNA extraction kit.

The HPV status was analysed using HPV DNA *in situ* hybridization (ISH), HPV E6/E7 mRNA ISH, HPV DNA polymerase chain reaction (PCR) and typing, and HPV E6/E7 mRNA reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR) as previously described (Laco et al., 2015). For the purposes of statistical analysis, a case was considered HPV-positive if it was positive for HPV DNA ISH/PCR and/or HPV E6/E7 mRNA ISH/PCR. For details of HPV analyses, see Laco et al. (2015).

Methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification (MS-MLPA)

The present study used the MS-MLPA probe set ME001 (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands), which can simultaneously check for aberrant methylation in 24 tumour suppressor genes (Table 1). Probe sequences, gene loci and chromosome locations can be found at <http://www.mlpa.com>. Individual genes were evaluated by two probes which recognized different *HhaI* restriction sites in their regions. The experimental procedure was carried out according to the manufacturer's instructions, with minor modifications.

In short, DNA (100 ng) was dissolved up to 5 µl in TE-buffer (10 mM Tris-Cl; 0.5 mM EDTA; pH 9.0), denatured and subsequently cooled down to 25 °C. After adding the probe mix, the probes were allowed to hybridize (overnight at 60 °C). Subsequently, the samples were divided into two groups: in one half, the samples were directly ligated, while for the other half, ligation was combined with the *HhaI* digestion enzyme. This digestion resulted in ligation of the methylated sequences only. PCR was performed with all the samples using a

standard thermal cycler (GeneAmp 9700, Applied Biosystems, Foster City, CA), with 35 cycles of denaturation at 95 °C for 30 s, annealing at 60 °C for 30 s and extension at 72 °C for 1 min, with a final extension of 20 min at 72 °C. Aliquots of 0.6 µl of the PCR reaction were combined with 0.2 µl LIZ-labelled internal size standard (Applied Biosystems) and 9.0 µl deionized formamide. After denaturation, fragments were separated and quantified by electrophoresis in an ABI 3130 capillary sequencer and analysed using GeneMapper4.0 (both Applied Biosystems). Peak identification and values corresponding to peak size in base pairs (bp), and peak areas were used for further data processing. The methylation dosage ratio was obtained by the following calculation: $Dm = (P_x/P_{ctrl})Dig / (P_x/P_{ctrl})Undig$, where *Dm* is the methylation dosage ratio, P_x is the peak area of a given probe, P_{ctrl} is the sum of the peak areas of all control probes, *Dig* stands for *HhaI*-digested sample and *Undig* for undigested sample. *Dm* can vary between 0 and 1.0 (corresponding to 0–100 % of methylated DNA). Based on previous experiments, a promoter was considered to be methylated if the dosage ratio was

Table 1. Genes included in the MS-MLPA KIT ME001 tumour suppressor

Gene	Name	Probes	Chromosomal location
<i>TIMP3</i>	TIMP metalloproteinase inhibitor 3	02255-L03752	22q12.3
<i>APC</i>	Adenomatous polyposis coli	01905-L01968	5q22.2
<i>CDKN2A</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	01524-L01744	9p21.3
<i>MLH1a</i>	MutL homologue 1a	01686-L01266	3p22.2
<i>ATM</i>	Ataxia telangiectasia mutated	04044-L03849	11q22.3
<i>RARB</i>	Retinoic acid receptor, β	04040-L01698	3p24.2
<i>CDKN2B</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B	00607-L00591	9p21.3
<i>HIC1</i>	Hypermethylated in cancer 1	03804-L00949	17p13.3
<i>CHFR</i>	Checkpoint with forkhead and ring finger domains, E3 ubiquitin protein ligase	03813-L03753	12q24.33
<i>BRCA1</i>	Breast cancer 1	05162-L04543	17q21.31
<i>CASP8</i>	Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase	02761-L02210	2q33.1
<i>CDKN1B</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B	07949-L07730	12p13.1
<i>KLLN</i>	Killin, p53-regulated DNA replication inhibitor	02203-L08261	10q23.3
<i>BRCA2</i>	Breast cancer 2	04042-L03755	13q12.3
<i>CD44</i>	CD44 molecule (Indian blood group)	03817-L01731	11p13
<i>RASSF1a</i>	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1	02248-L01734	3p21.31
<i>DAPK1</i>	Death-associated protein kinase 1	01677-L01257	9q21.33
<i>VHL</i>	Von Hippel-Lindau tumour suppressor	03810-L01211	3p25.3
<i>ESR1</i>	Oestrogen receptor 1	02202-L01700	6q25.1
<i>RASSF1b</i>	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1	03807-L02159	3p21.31
<i>TP73</i>	Tumour protein p73	04050-L01263	1p36.32
<i>FHIT</i>	Fragile histidine triad	02201-L01699	3p14.2
<i>IGSF4</i>	Cell adhesion molecule 1	03819-L03848	11q23.3
<i>CDH13</i>	Cadherin 13, H-cadherin	07946-L07727	16q23.3
<i>GSTP1</i>	Glutathione S-transferase pi 1	01638-L01176	11q13.2
<i>MLH1b</i>	MutL homologue 1b	02260-L01747	3p22.2

≥ 0.20 , which corresponds to 20 % of methylated DNA (Pavicic et al., 2011; Chmelařová et al., 2013).

CpG universal methylated and unmethylated DNA (ZymoResearch, Irvine, CA) were used in every run as controls.

Statistical analysis

Basic descriptive statistics were adopted for the analysis: median, mean, and 95% confidence interval for continuous data, and absolute and relative frequencies for categorical data. The relationship between gene methylation and other independent factors was analysed using the χ^2 test, Fisher's exact test, or logistic regression analysis. Kaplan-Meier and log-rank tests were used for survival analysis; Cox regression analysis was used to determine the influence of gene methylation upon survival. We considered $P < 0.05$ to be statistically significant. All statistical analyses were performed using the NCSS 8 statistical software program (NCSS, Keyville, UT).

Results

Promoter methylation using a 20% cut-off

In the present study we used the MS-MLPA probe set ME001 (MRC-Holland) to analyse samples from 64 patients with sinonasal carcinoma and 19 control samples. Using a 20% cut-off for methylation we observed statistically significantly higher methylation in the *RASSF1* ($P = 0.01$), *ESR1* ($P = 0.03$), *TP73* ($P = 0.01$) and *CDH13* ($P < 0.001$) genes of patients with sinonasal carcinoma compared with the control group. For the *ATM*, *CDKN1B* and *GSTP1* genes, the methylation rate did not exceed the 20% threshold; the other genes also showed relevant differences in methylation between

samples with sinonasal carcinoma and control samples (Fig. 1).

Correlation with clinicopathological features

Clinicopathological data are listed below and summarized in Table 2. Due to a few missing clinical data, sums in the entire study sample or partial sums do not always add up to the total number of patients.

The median age of patients at the time of diagnosis was 62.5 years (range 23–83 years) in the carcinoma group and 56.5 years (range 24–74 years) in the control group. The carcinoma group consisted of 43 males and 21 females and the control group of 10 males and 9 females.

Of those in the carcinoma group with a known history, 26 patients were non-smokers, 11 ex-smokers, and 17 were current smokers. In only 7/54 (13 %) patients, occupational exposure to wood dust or other air pollutants/irritants was recorded (2× joiner, 1× wood industry worker, 1× miller, 1× locksmith, 2× rubber industry worker).

Concerning the entire study sample, most of the tumours arose in the nasal cavity, but SCCs were slightly more common in the maxillary sinus. The majority of the patients were diagnosed with advanced tumours and four patients had lung metastases (cM1) at the time of diagnosis.

The treatment modalities included radical surgery with radiotherapy (22×), radical surgery with chemo-radiotherapy (16×), radical surgery only (12×), radiotherapy only (5×), and chemo-radiotherapy (5×).

Microscopic typing of the tumours resulted in 44 SCCs, 13 adenocarcinomas, three neuroendocrine tumours, three SNUCs, and one case of LEC. Vascular invasion was found in 9/64 (14.1 %) tumours and perineural spread in 5/64 (7.8 %).

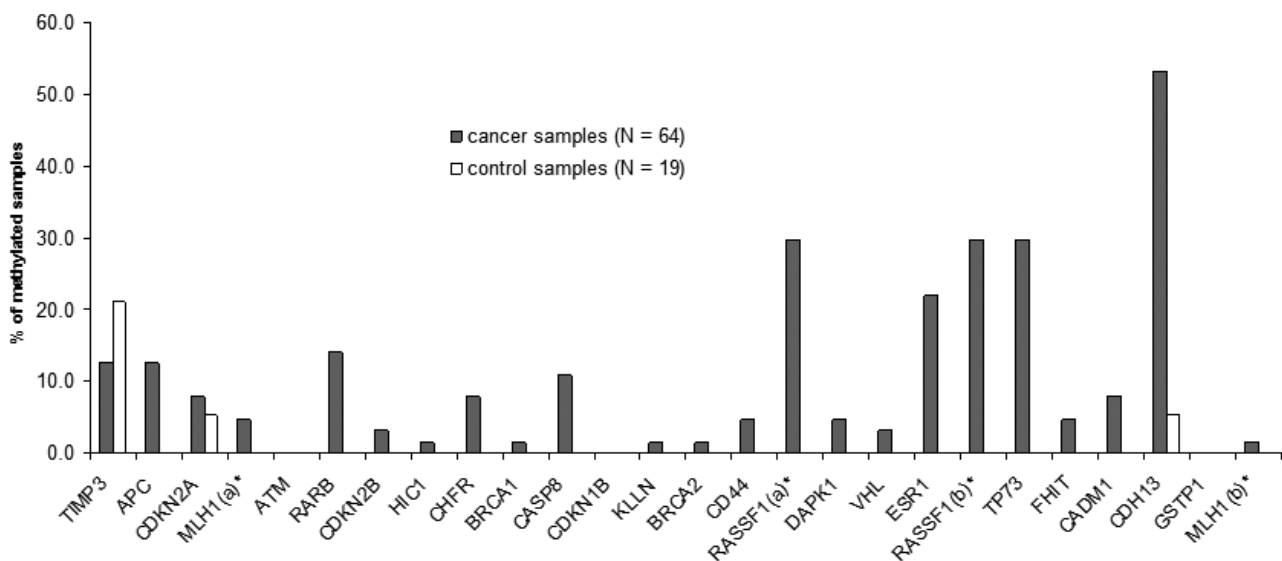


Fig. 1. Methylation of specific genes in cancer samples and control samples. Comparison of methylation frequencies (cut-off value 20 %) of the 24 analysed genes in cancer and control samples. *Two CpG loci (a and b) were analysed.

Table 2. Clinicopathological data of patients and presence of methylation

Clinical and Pathological Characteristics													
Sample No.	Gender	Age	Smoking	Occupation	cT	cN	cM	Typing	Grading	Invasion	Treatment	Recurrence	HPV status
1	M	23	NS	NR	cT1	cN0	cM0	ACC	n/a	PN	S	L,D	neg.
2	F	70	NS	NR	cTX	cN0	cM0	SCC	G2	no	S,R,C	L	neg.
3	M	68	NS	risk	cT1	cN0	cM0	ITAC	G3	no	S,R	L	neg.
4	M	57	S	risk	cTX	cN0	cM0	SCNEC	G1	no	S,R	L,Re	neg.
5	F	74	NS	NR	cT4a	cN0	cM0	SCC	G2	no	R	n/a	neg.
6	M	78	NS	NR	cT1	cN0	cM0	SCC	G2	no	S	L	neg.
7	M	57	S	NR	cT1	cN0	cM0	NITAC	LG	no	S,R	no	neg.
8	M	83	(S)	risk	cT2	cN0	cM0	ITAC	G1	no	S,R	no	neg.
9	M	49	S	NR	cT4a	cN0	cM0	SCC	G1	no	S,R,C	L	neg.
10	F	36	NS	NR	cT4a	cN0	cM0	ACC	n/a	no	S,R,C	L	neg.
11	F	32	NS	NR	cT2	cN0	cM0	NITAC	LG	no	S,R	L	neg.
12	F	81	NS	NR	cT1	cN0	cM0	SCC	G2	no	S,R	L	neg.
13	M	64	NS	NR	cT3	cN0	cM0	SCC	G2	no	R,C	L	neg.
14	M	65	NS	NR	cT3	cN0	cM0	ITAC	G2	no	S,R,C	D	neg.
15	M	30	NS	NR	cT4a	cN0	cM0	SCC	G2	V	S,R	L	neg.
16	M	51	S	NR	cT4b	cN0	cM0	SCC	G2	no	S,R	no	neg.
17	M	53	NS	NR	cT3	cN2c	cM0	SCC	G2	no	S,R	no	neg.
18	M	74	S	n/a	cT4a	cN2b	cM0	SCC	G2	no	R,C	L,Re,D	neg.
19	M	76	NS	NR	cT4a	cN0	cM0	SCC	G2	no	S,R	L	neg.
20	F	76	NS	NR	cT4a	cN0	cM0	SCC	G2	no	S,R	L	neg.
21	F	54	NS	NR	cT4a	cN0	cM0	SCC	G2	no	S,R	L	pos.
22	M	76	(S)	NR	cT2	cN0	cM0	SCC	G2	no	S,R	no	pos.
23	M	27	NS	NR	cT4a	cN0	cM0	SCC	G3	no	S,R,C	L	pos.
24	M	60	S	risk	cT4b	cN2b	cM0	SCC	G2	no	S,R	no	neg.
25	F	58	NS	NR	cT2	cN0	cM0	SCC	G2	no	S,R,C	Re	neg.
26	F	56	NS	NR	cT4a	cN0	cM0	SCC	G2	no	R	no	neg.
27	M	65	(S)	NR	cT2	cN0	cM0	SCC	G3	V	S,R,C	D	pos.
28	F	63	NS	NR	cT4a	cN0	cM0	SCC	G2	no	S	L,Re	neg.
29	F	82	(S)	NR	cT4a	cN2b	cM0	SCC	G1	no	S,R	no	neg.
30	M	82	(S)	NR	cT4b	cN2c	cM0	SCC	G3	no	R	no	neg.
31	M	55	NS	NR	cT4a	cN2b	cM0	SCNEC	n/a	V	S,R,C	L,Re,D	pos.
32	F	72	S	NR	cT4b	cN0	cM0	SCC	G1	no	S,R	no	neg.
33	M	71	(S)	NR	cT4b	cN0	cM0	SCC	G2	no	R,C	no	pos.
34	M	56	NS	NR	cT1	cN0	cM0	SCC	G1	no	S	no	pos.
35	F	71	NS	risk	cT1	cN0	cM0	SCC	G1	no	S	no	neg.
36	F	60	(S)	NR	cT3	cN0	cM0	ACC	n/a	V,PN	S	no	neg.
37	F	38	(S)	NR	cT4b	cN2c	cM0	SCNEC	G3	no	R,C	L	neg.
38	F	56	S	NR	cT4b	cN0	cM0	SCC	G3	no	R	no	pos.
39	M	68	NS	risk	cT1	cN0	cM0	ITAC	G2	no	S,R,C	L	neg.
40	F	70	S	NR	cTX	cN0	cM0	SCC	G2	no	S,R	no	neg.
41	M	31	n/a	n/a	cTX	cN0	cM0	ACC	n/a	no	S	n/a	neg.
42	M	57	S	NR	cTX	cN0	cM0	SCC	G3	no	S	no	pos.
43	M	55	S	NR	cTX	cN0	cM0	ACC	n/a	V,PN	S,R	no	neg.
44	M	51	(S)	NR	cTX	cN0	cM0	SNUC	n/a	no	R	no	neg.
45	F	46	n/a	n/a	cTX	cN0	cM0	NITAC	LG	no	n/a	n/a	neg.
46	M	65	NS	NR	cTX	cN0	cM0	SCC	G2	no	S	no	neg.
47	M	64	n/a	n/a	cTX	cN0	cM0	SCC	G2	no	S	n/a	pos.
48	M	65	(S)	NR	cT2	cN1	cM0	SCC	G3	V	S,R	no	pos.
49	M	62	n/a	n/a	cT4a	cN0	cM0	SCC	G2	no	S	n/a	neg.
50	F	66	n/a	n/a	cTX	cN0	cM0	SNUC	n/a	V	n/a	n/a	neg.
51	M	75	n/a	n/a	cTX	cN0	cM0	SCC	G2	no	R,C	n/a	pos.
52	M	67	n/a	n/a	cTX	cN0	cM0	SCC	G2	no	n/a	L	neg.
53	F	61	NS	NR	cTX	cN0	cM0	ACC	n/a	PN	S,R,C	L	neg.
54	M	65	n/a	n/a	cTX	cNX	cMX	SCC	G2	no	n/a	n/a	neg.
55	M	46	S	NR	cT4a	cN0	cM1	SCC	G2	no	S,R,C	no	neg.
56	M	55	n/a	NR	cT2	cN0	cM0	SCC	G3	no	S,R	no	neg.
57	M	71	S	NR	cT3	cN2b	cM0	SCC	G3	no	S,R,C	no	neg.
58	F	81	NS	NR	cT3	cN0	cM0	SCC	G2	no	S,R	no	neg.
59	M	46	S	risk	cT3	cN0	cM0	SCC	n/a	V,PN	S,R,C	no	neg.
60	M	60	n/a	n/a	cTX	cN0	cM1	SCC	n/a	no	S,R,C	D	pos.
61	M	68	(S)	NR	cT4a	cN3	cM1	SNUC	n/a	V	S	no	neg.
62	M	68	S	NR	cT4a	cN0	cM0	SCC	G3	no	S,R	no	pos.
63	M	49	S	NR	cT4a	cN1	cM0	SCC	G3	no	S,R,C	no	pos.
64	M	62	S	NR	cT3	cN1	cM1	LEC	n/a	no	S,R,C	D	neg.

From left to right: M – male, F – female; S – smoker, NS – non-smoker, (S) – former smoker; NR – non-risk; ACC – adenoid cystic carcinoma, therapy, C – chemotherapy; L – local, Re – regional, D – distant; neg. – negative, pos. – positive; M – methylation; n/a – data not available

Table 3. Clinicopathological characteristics vs. methylation of selected genes

Clinicopathological characteristic		Quantity	%	% of methylated samples							
				RASSF1a	ESR1	RASSF1b	TP73	CDH13	TIMP3	CASP8	
Gender (N = 64)	female	21	32.8	38.1	14.3	33.3	14.3	38.1	4.8	14.3	
	male	43	67.2	25.6	23.3	27.9	34.9	58.1	16.3	9.3	
Age (N = 64)	≤ 45	7	10.9	42.9	14.3	57.1	42.9	28.6	14.3	14.3	
	> 45	57	89.1	28.1	21.1	26.3	26.3	54.4	12.3	10.5	
Smoking status (N = 54)*	non-smoker	26	48.1	30.8	23.1	26.9	23.1	42.3	7.7	7.7	
	smoker	17	31.5	23.5	5.9	23.5	11.8	41.2	17.6	5.9	
	former smoker	11	20.4	45.5	27.3	45.5	27.3	54.5	18.2	18.2	
Occupation (N = 54)*	no risk	47	87.0	31.9	14.9	29.8	19.1	42.6	14.9	8.5	
	risk	7	13.0	28.6	42.9	28.6	28.6	57.1	0.0	14.3	
TNM classification	cT (N = 48)*	cT1	8	16.7	12.5	37.5	12.5	25.0	50.0	0.0	12.5
		cT2	7	14.6	42.9	14.3	28.6	28.6	71.4	0.0	0.0
		cT3	8	16.7	25.0	12.5	37.5	12.5	25.0	12.5	0.0
		cT4	25	52.1	24.0	16.0	24.0	20.0	40.0	16.0	12.0
	cN (N = 63)*	cN0	51	81.0	33.3	23.5	29.4	31.4	52.9	11.8	9.8
		cN1	3	4.8	33.3	0.0	66.7	0.0	33.3	33.3	0.0
		cN2	8	12.7	12.5	0.0	25.0	0.0	37.5	0.0	25.0
		cN3	1	1.6	0.0	100.0	0.0	100.0	100.0	100.0	0.0
	cM (N = 63)*	cM0	59	93.7	32.2	20.3	30.5	25.4	50.8	11.9	11.9
		cM1	4	6.3	0.0	25.0	25.0	50.0	50.0	25.0	0.0
Typing (N = 64)	SCC	44	68.8	29.5	15.9	25.0	27.3	47.7	6.8	4.5	
	AC	13	20.3	15.4	23.1	23.1	30.8	61.5	15.4	0.0	
	SNUC	3	4.7	66.7	100.0	66.7	66.7	100.0	100.0	66.7	
	SCNEC	3	4.7	66.7	0.0	66.7	0.0	33.3	0.0	100.0	
	LEC	1	1.6	0.0	0.0	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
Grading (N = 51)*	G1	10	19.6	10.0	10.0	10.0	10.0	30.0	0.0	10.0	
	G2	29	56.9	31.0	24.1	24.1	31.0	58.6	10.3	6.9	
	G3	12	23.5	33.3	16.7	33.3	25.0	50.0	8.3	8.3	
Invasion (N = 64)	vascular	9	14.1	55.6	33.3	44.4	44.4	55.6	44.4**	22.2	
	perineural	5	7.8	40.0	0.0	40.0	0.0	0.0**	20.0	0.0	
	no	53	82.8	26.4	18.9	28.3	26.4	52.8	7.5	9.4	
HPV status (N = 64)	positive	15	23.4	40.0	13.3	33.3	26.7	60.0	6.7	6.7	
	negative	49	76.6	26.5	22.4	28.6	28.6	49.0	14.3	12.2	
Recurrence (N = 56)*	local	22	39.3	31.8	18.2	27.3	22.7	45.5	4.5	18.2**	
	regional	5	8.9	20.0	0.0	20.0	0.0	40.0	0.0	40.0**	
	distant	7	12.5	14.3	0.0	14.3	28.6	71.4	14.3	14.3	
	no	29	51.8	27.6	20.7	27.6	20.7	44.8	17.2	3.4	

AC – adenocarcinoma

*Due to a few missing clinical data, partial sums do not always add up to the total number of patients. **P < 0.05

The follow-up period ranged from one to 241 months (median 18 months). Local recurrence was found in 22/56 (39.3 %) tumours, 5/56 (8.9 %) recurred regionally, and 7/56 (12.5 %) patients developed distant metastases in the lungs. During the follow-up period, 31/59 (52.5 %) patients died, of whom 15/56 (26.8 %) due to the tumour.

HPV positivity was found in 15/64 (23.4 %) of all samples in the carcinoma group and in no sample in the control group.

The methylation results from the carcinoma specimens were compared with clinicopathological characteristics mentioned above (see Tables 2, 3). The *TIMP3*

gene showed significantly higher methylation in patients with angioinvasion ($P = 0.01$). In SCC, methylation of *TIMP3* was associated with the age of the patients, being present mainly in younger patients ($P = 0.01$). The *CASP8* gene showed significantly higher methylation in patients with local recurrence ($P = 0.05$) and also in patients with regional recurrence ($P = 0.01$). The *CDH13* gene showed significantly lower methylation in patients with perineural invasion ($P = 0.02$). The presence of methylation of the *CDH13* gene was also associated with lower survival (Fig. 2). No correlation was found between DNA methylation and tumour type, stage, histological grade, smoking history or HPV status.

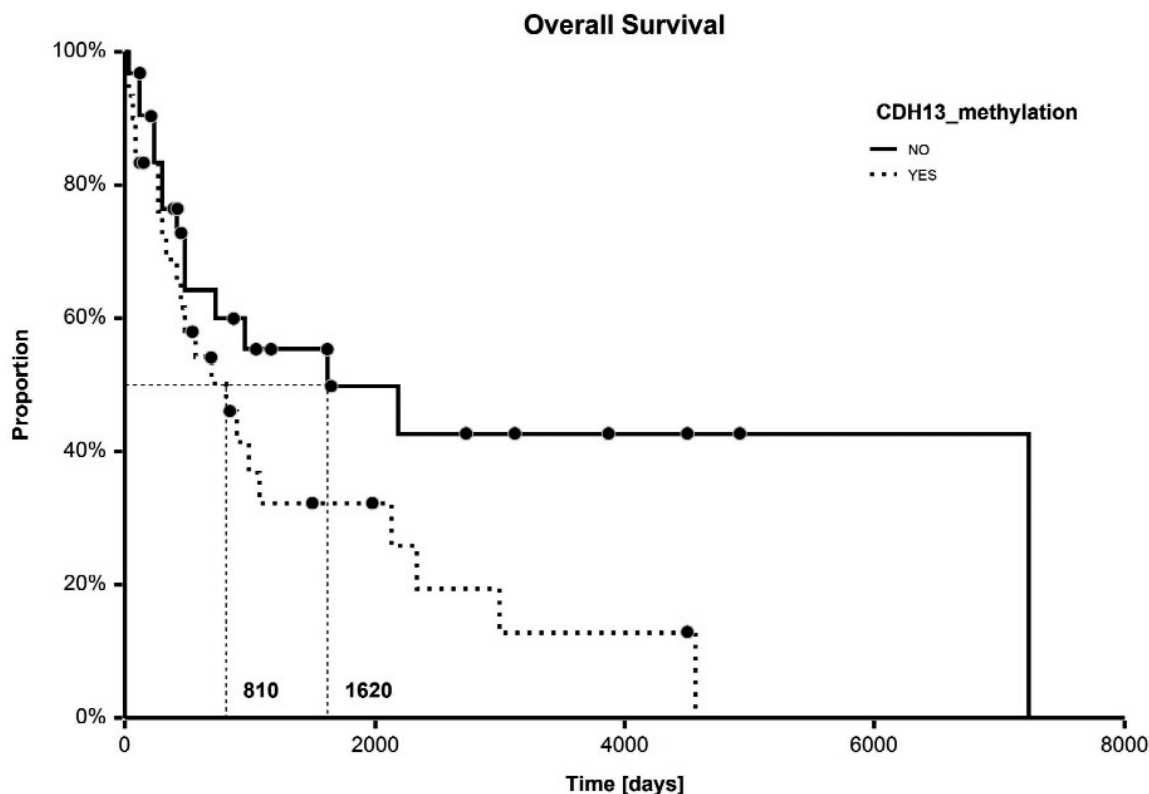


Fig. 2. Methylation of the *CDH13* gene as clinical outcome for patients with sinonasal carcinoma. Kaplan-Meier curve survival analysis indicates that tumours with the methylated *CDH13* gene showed poorer survival than those with the unmethylated *CDH13* gene ($P = 0.057$).

Discussion

Similarly to other cancers, malignant tumours of the sinonasal area have been shown to be a complex disease driven by different factors. Genetic aberrances such as variations in gene expression and mutation in cancer-related genes have been identified, but these do not fully explain carcinogenesis in the sinonasal area. Epigenetic changes are now being examined. In particular, aberrant DNA methylation is thought to play an important role in head and neck cancer. To date, numerous genes have been found to undergo hypermethylation. These methylation patterns persist and usually increase during the disease progression, which makes them a suitable tool to obtain early detection (Yang et al., 2015) predictive or prognostic information (Demokan and Dalay, 2011). The genes that are susceptible are the genes involved in cell cycle regulation, genes associated with DNA repair, apoptosis, drug resistance, detoxification, angiogenesis and metastasis (Das and Singal, 2004). The purpose of this study was to investigate promoter methylation of a set of common tumour suppressor genes in 64 tissue samples of sinonasal carcinoma and 19 control samples using MS-MLPA.

The *ATM*, *CDKN1B* and *GSTP1* genes never showed methylation above the 20% threshold, suggesting that promoter methylation of selected CpG loci of these tumour suppressors may not play an important role in car-

cinogenesis of the sinonasal area. On the other hand, *TIMP3*, *APC*, *CDKN2A*, *MLH1a*, *RARB*, *CDKN2B*, *HIC1*, *CHFR*, *BRCA1*, *CASP8*, *KLLN*, *BRCA2*, *CD44*, *RASSF1a*, *DAPK1*, *VHL*, *ESR1*, *RASSF1b*, *TP73*, *FHIT*, *CADM1*, *CDH13* and *MLH1b* did show promoter methylation to a varying extent above the 20% threshold. Methylation of some of these genes (particularly *TIMP3*, *CASP8* and *CDH13*) correlated with clinicopathological features such as age, perineural invasion, angiogenesis, regional and local recurrence, and survival, indicating that they could be used as prognostic markers in the future.

Methylation of *TIMP3* and *CDKN2A* was detected in both control and cancer samples. *TIMP3* methylation was present in more than 20% of control samples. The presence of methylation can be associated with the nature of control samples. All control samples were obtained from patients with inflammation in sinonasal area. These findings correlate with the findings of Wang et al. (2014), who reported methylation of *TIMP3*, *GSTP1* and *14-3-3 σ* in patients with chronic inflammation and in cancer patients.

The *RASSF1* gene encodes a protein similar to the RAS effector proteins. Loss or altered expression of this gene has been associated with the pathogenesis of a variety of cancers, which suggests the tumour suppressor function of this gene (Donninger et al., 2007). The inactivation of this gene was found to be correlated with the

hypermethylation of its CpG-island promoter region (Hesson et al., 2007). The protein was also shown to inhibit accumulation of cyclin D1, and thus induce cell cycle arrest (Donninger et al., 2007). As in other malignancies, we found significantly higher methylation of this gene ($P = 0.01$) in SNC, indicating that its methylation plays an important role in carcinogenesis of the sinonasal area as well. In oropharyngeal SCC, methylation of the *RASSF1* gene correlated with the HPV status (Dong et al., 2003). In our study we did not find any correlation between the HPV status and methylation of this gene, nor with any another genes. Our study does not confirm the hypothesis that HPV-positive tumours have stronger association with promoter methylation compared with HPV-negative tumours, at least in the case of sinonasal carcinoma.

The *ESR1* gene encodes the oestrogen receptor α , a ligand-activated transcription factor composed of several domains important for hormone binding, DNA binding, and activation of transcription. Oestrogen and its receptors are essential for sexual development and reproductive function, but are also involved in pathological processes including breast (Segal and Dowsett, 2014) and endometrial (Rahman et al., 2013) cancer. *ESR1* was previously shown to be widely methylated in breast cancer and hepatocellular carcinoma, and there was a statistically significant association with lower expression of oestrogen receptor α ($ER\alpha$) (Geudet et al., 2009; Dai et al., 2014). In our study we also found statistically significantly higher methylation of the *ESR1* gene ($P = 0.03$) in patients with sinonasal carcinoma compared with the control group, indicating its importance in carcinogenesis of the sinonasal area.

The *TP73* gene encodes a member of the p53 family of transcription factors involved in cellular responses to stress and development (Levrero et al., 2000). This gene is hypermethylated in several types of head cancer, including oral SCC (Khor et al., 2014), oropharyngeal SCC (Noorlag et al., 2014) and nasopharyngeal carcinoma (Wong et al., 2003). Our study showed hypermethylation of the *TP73* gene also in sinonasal carcinoma. This finding confirms the important role of *TP73* methylation in carcinogenesis of head tumours.

The *CDH13* gene (*H-cadherin*) encodes a member of the cadherin superfamily. The protein acts as a negative regulator of axon growth during neural differentiation and also protects vascular endothelial cells from apoptosis due to oxidative stress, and is associated with resistance to atherosclerosis. The gene is hypermethylated in several types of head and neck cancers, including nasopharyngeal carcinoma (Sun et al., 2007) and oesophageal adenocarcinoma (Jin et al., 2008). In our study we found significantly higher methylation in the *CDH13* gene in sinonasal carcinoma compared to healthy controls ($P < 0.001$). This finding indicates that *CDH13* methylation is an important event in carcinogenesis of the sinonasal area as well. Methylation of this gene was correlated with poor patient survival, and hence it could potentially be used as a prognostic marker in the future.

In conclusion, our study showed that there are significant differences in promoter methylation in *RASSF1*, *ESR1*, *TP73* and *CDH13* genes between sinonasal carcinoma and normal sinonasal tissue, suggesting the importance of epigenetic changes in these genes in carcinogenesis of the sinonasal area. These findings could be used as prognostic factors and may have implications for future individualised therapies based on epigenetic changes.

Acknowledgments

The authors are grateful to Ian McColl MD, PhD for assistance with the manuscript.

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Barnes, L., Eveson, J. W., Reichart, P., Sidransky, S. (eds) (2005) *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics. Head and Neck Tumours*. pp. 9-80, IARC Press, Lyon.
- Barton, C. A., Hacker, N. F., Clark, S. J., O'Brien, P. M. (2008) DNA methylation changes in ovarian cancer: implications for early diagnosis, prognosis and treatment. *Gynecol. Oncol.* **109**, 129-139.
- Chmelařová, M., Dvořáková, E., Špaček, J., Laco, J., Mžik, M., Palička, V. (2013) Promoter methylation of *GATA4*, *WIFI1*, *NTRK1* and other selected tumour suppressor genes in ovarian cancer. *Folia Biol. (Praha)* **59**, 87-92.
- Dai, B., Geng, L., Yu, Y., Sui, C., Xie, F., Shen, W., Zheng, T., Yang, J. (2014) Methylation patterns of estrogen receptor α promoter correlate with estrogen receptor α expression and clinicopathological factors in hepatocellular carcinoma. *Exp. Biol. Med. (Maywood, N. J.)*. **239**, 883-890.
- Das, P. M., Singal, R. (2004) DNA methylation and cancer. *J. Clin. Oncol.* **22**, 4632-4642.
- Demokan, S., Dalay, N. (2011) Role of DNA methylation in head and neck cancer. *Clin. Epigenetics* **2**, 123-150.
- Dong, S. M., Sun, D. I., Benoit, N. E., Kuzmin, I., Lerman, M. I., Sidransky, D. (2003) Epigenetic inactivation of *RASSF1A* in head and neck cancer. *Clin. Cancer Res.* **9**, 3635-3640.
- Donninger, H., Vos, M. D., Clark, G. J. (2007) The *RASSF1A* tumor suppressor. *J. Cell Sci.* **120**, 3163-3172.
- Gaudet, M. M., Campan, M., Figueroa, J. D., Yang, X. R., Lisowska, J., Peplonska, B., Brinton, L. A., Rimm, D. L., Laird, P. W., Garcia-Closas, M., Sherman, M. E. (2009) DNA hypermethylation of *ESR1* and *PGR* in breast cancer: pathologic and epidemiologic associations. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **18**, 3036-3043.
- Haerle, S. K., Gullane, P. J., Witterick, I. J., Zweifel, C., Gentili, F. (2013) Sinonasal carcinomas: epidemiology, pathology, and management. *Neurosurg. Clin. N. Am.* **24**, 39-49.
- Hesson, L. B., Cooper, W. N., Latif, F. (2007) The role of *RASSF1A* methylation in cancer. *Dis. Markers* **23**, 73-87.
- Jin, Z., Cheng, Y., Oлару, A., Kan, T., Yang, J., Paun, B., Ito, T., Hamilton, J. P., David, S., Agarwal, R., Selaru, F. M., Sato, F., Abraham, J. M., Beer, D. G., Mori, Y., Shimada, Y., Meltzer, S. J. (2008) Promoter hypermethylation of *CDH13*

- is a common, early event in human esophageal adenocarcinogenesis and correlates with clinical risk factors. *Int. J. Cancer* **123**, 2331-2336.
- van Kempen, P. M., Noorlag, R., Braunius, W. W., Stegeman, I., Willems, S. M., Grolman, W. (2014) Differences in methylation profiles between HPV-positive and HPV-negative oropharynx squamous cell carcinoma: a systematic review. *Epigenetics* **9**, 194-203.
- Khor, G. H., Froemming, G. R., Zain, R. B., Abraham, M. T., Thong, K. L. (2014) Screening of differential promoter hypermethylated genes in primary oral squamous cell carcinoma. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **15**, 8957-8961.
- Laco, J., Siegllová, K., Vošmiková, H., Dunder, P., Němejcová, K., Michálek, J., Čelakovský, P., Chrobok, V. Mottl, R., Mottlová, A., Tuček, L., Slezák, R., Chmelařová, M., Sirák, I., Vošmik, M., Ryška, A. (2015) The presence of high-risk human papillomavirus (HPV) E6/E7 mRNA transcripts in a subset of sinonasal carcinomas is evidence of involvement of HPV in its etiopathogenesis. *Virchows Arch.* **467**, 405-415
- Levrero, M., De Laurenzi, V., Costanzo, A., Gong, J., Wang, J. Y., Melino, G. (2000) The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. *J. Cell Sci.* **113**, 1661-1670.
- López, F., Llorente, J. L., Costales, M., García-Inclán, C., Pérez-Escuredo, J., Alvarez-Marcos, C., Hermsen, M., Suárez, C. (2013) Molecular characterisation of sinonasal carcinomas and their clinical implications. *Acta Otorrinolaringol. Esp.* **64**, 289-296.
- Noorlag, R., van Kempen, P. M., Moelans, C. B., de Jong, R., Blok, L. E., Koole, R., Grolman, W., van Diest, P. J., van Es, R. J., Willems, S. M. (2014) Promoter hypermethylation using 24-gene array in early head and neck cancer: better outcome in oral than in oropharyngeal cancer. *Epigenetics* **9**, 1220-1227.
- Nygren, A. O., Ameziane, N., Duarte, H. M., Vijzelaar, R. N., Waisfisz, Q., Hess, C. J., Schouten, J. P., Errami, A. (2005) Methylation-specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic Acids Res.* **33**, e128.
- Pavicic, W., Perkiö, E., Kaur, S., Peltomäki, P. (2011) Altered methylation at microRNA-associated CpG islands in hereditary and sporadic carcinomas: a methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification (MS-MLPA)-based approach. *Mol. Med.* **17**, 726-735.
- Rahman, M. T., Nakayama, K., Rahman, M., Ishikawa, M., Katagiri, H., Katagiri, A., Ishibashi, T., Sato, E., Iida, K., Ishikawa, N., Nakayama, N., Miyazaki, K. (2013) ESR1 gene amplification in endometrial carcinomas: a clinicopathological analysis. *Anticancer Res.* **33**, 3775-3781.
- Segal, C. V., Dowsett, M. (2014) Estrogen receptor mutations in breast cancer – new focus on an old target. *Clin. Cancer Res.* **20**, 1724-1726.
- Sun, D., Zhang, Z., Van do, N., Huang, G., Ernberg, I., Hu, L. (2007) Aberrant methylation of CDH13 gene in nasopharyngeal carcinoma could serve as a potential diagnostic biomarker. *Oral Oncol.* **43**, 82-87.
- Syrjänen, K., Syrjänen, S. (2013) Detection of human papillomavirus in sinonasal carcinoma: systematic review and meta-analysis. *Hum. Pathol.* **44**, 983-991.
- Turner, J. H., Reh, D. D. (2002) Incidence and survival in patients with sinonasal cancer: a historical analysis of population-based data. *Head Neck* **34**, 877-885.
- Wang, Y. J., He, L., Yuan, M., Tsang, W. W., Hao, L., Wang, M., Chow, L. W., Cheung, M. N., Liu, Q., Ng, E. L., Loo, W. T., Chow, C. Y., Bai, L. J., Yang, Z. (2014) Epigenetic changes of TIMP-3, GSTP-1 and 14-3-3 σ genes as indication of status of chronic inflammation and cancer. *Int. J. Biol. Markers* **29**, e208-214.
- Wong, T. S., Tang, K. C., Kwong, D. L., Sham, J. S., Wei, W. I., Kwong, Y. L., Yuen, A. P. (2003) Differential gene methylation in undifferentiated nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Oncol.* **22**, 869-874.
- Yang, X., Dai, W., Kwong, D. L., Szeto, C. Y., Wong, E. H., Ng, W. T., Lee, A. W., Ngan, R. K., Yau, C. C., Tung, S. Y., Lung, M. L. (2015) Epigenetic markers for noninvasive early detection of nasopharyngeal carcinoma by methylation-sensitive high resolution melting. *Int. J. Cancer* **136**, E127-135
- Zvolský, M. (2014) *Incidence of Malignant Neoplasms in the Czech Republic in 2011*. IHIS, Volume **25**, Prague, Czech Republic. (in Czech)

Segmentová bolest zad jako následek vzácného schwannomu páteřního kanálu

prof. MUDr. Vladimír Mihál, CSc.^{1,2}, MUDr. Daniela Potyszová¹, doc. MUDr. David Krahulík, Ph.D.³,
MUDr. Jaroslav Michálek⁴, MUDr. Kamila Michálková⁵

¹Ústav translační a molekulární medicíny LF UP v Olomouci

²Dětská klinika LF UP a FN v Olomouci

³Neurochirurgická klinika LF UP a FN v Olomouci

⁴Ústav patologie LF UP a FN v Olomouci

⁵Radiologická klinika LF UP a FN v Olomouci

Prezentujeme vzácnou kazuistiku schwannomu v lumbo-sakrální oblasti páteřního kanálu u adolescenta. Nemoc se u šestnáctiletého chlapce projevila noční segmentovou bolestí zad a snížením citlivosti v dermatomu L4 s převahou na pravé straně. Postupná svalová slabost dolních končetin byla pozorována dva měsíce před operací. Vyšetření pomocí magnetické rezonance páteře prokázalo dobře ohraničenou masu uvnitř páteřního kanálu. Peroperačně byla nádorová tkáň křehká, vaskularizovaná, v kontaktu s filum terminale a byla kompletně odstraněna. Spinální schwannom byl histologicky potvrzen.

Klíčová slova: schwannoma páteřního kanálu, dítě.

Segmental back pain as a consequence of a rare spinal schwannoma

We present a rare case of a spinal schwannoma of a lumbo-sacral tract in an adolescent. A 16-year-old boy presented with segmental back pain and decreased sensation in the L4 dermatome predominately at the right side. Progressive weakness of lower extremities. It was noted for two months before surgery. Spine magnetic resonance imaging revealed a well – demarcated isointense intraspinal mass. Intraoperatively, the tumorous tissue was brittle, vascularized, attached to filum terminale and completely removed. Spinal schwannoma was histologically confirmed.

Key words: spinal schwannoma, child.

Pediatr. praxi 2015; 16(6): 420–422

Úvod

Verocay již v roce 1910 jako první popsal nádor vycházející z periferních nervů. Masson v roce 1932 zavedl termín schwannom pro nádor vycházející z nervové pochvy, v roce 1935 Stout zavádí termín neurilemom, odkazující na stejný typ nádoru. Oba termíny se používají dodnes (1). Schwannomy jsou většinou benigní tumory vycházející ze Schwannových buněk pochvy periferních nervů (2). 70% z nich vychází ze senzorických kořenů, 20% z motorických kořenů a zbytek z obou motorických i senzorických. Spinální schwannomy jsou obvykle klasifikovány jako intradurální (75%), extradurální (15%), intraextradurální ve tvaru činky (10%) a velmi vzácně i jako intramedulární s lokalizací ve kterékoli části míchy (4, 5, 7, 8, 10). Schwannomy jsou nejčastěji diagnostikovány v dospělosti mezi 3. až 4. dekádu života s incidencí 0,3–0,5 případů na 100 000 lidí/rok, v adolescenci jsou velmi vzácné (3).

Popis klinického případu

Popisujeme případ šestnáctiletého chlapce s přibližně dvouměsíční anamnézou atypických bolestí zad a dolních končetin, který byl přijat na Dětskou kliniku z indikace neurochirurga. V do-

bě, kdy se objevily první příznaky, dominovaly bolesti zad v oblasti lumbosakrální páteře a levé podkolenní jamky s vystřelováním do lýtka, dále postupně bolesti pravé podkolenní jamky a pravého stehna. Bolesti se postupně objevovaly s vyšší frekvencí a intenzitou, přidala se slabost dolních končetin. Výrazná bolest, křečovitá a píchavá, se atypicky projevovala zejména v noci, v klidu, při dlouhém stání a sezení. Během dne se pacient zúčastňoval běžných aktivit a sportoval bez větších potíží. V noci se pacient budil, musel se často i projít, končetiny propnout, rozpohybovat. Analgetika měla pouze částečný efekt.

Praktickým lékařem byl pacient odeslán k vyšetření dětským neurologem.

Neurologické vyšetření poukazuje na atypický nálezu vertebrogenních potíží, blokádu LS přechodu a noční bolesti, v dermatomu L4. Bylo doporučeno rtg vyšetření LS páteře a zvážení MR dané oblasti.

Na rtg LS páteře byla popsána pouze hypoplazie XII. žebra vlevo, jinak normální nálezu.

Vyšetření MRI, oblast LS páteře: V úrovni těl obratlů L3 a L4 se v páteřním kanálu zobrazuje tumorózní útvar intramurálně uložený, který je na T1 i na T2 sekvenci izosignální s míchou, na T2 sekvenci se v něm zobrazují drobné hyper-

Obrázek 1. MR LS páteře, T2 sekvence, sagitální projekce. V úrovni těl obratlů L3 a L4 je v páteřním kanálu přítomný tumorózní útvar, který je uložený intradurálně a je izosignální s míchou, míšní konus je v úrovni L1. Nad útvarem jsou patrné míšní kořeny, v místě útvaru jsou komprimované. Páteřní kanál kaudálně od tumoru je rozšířený. Skelet je bez patologických změn



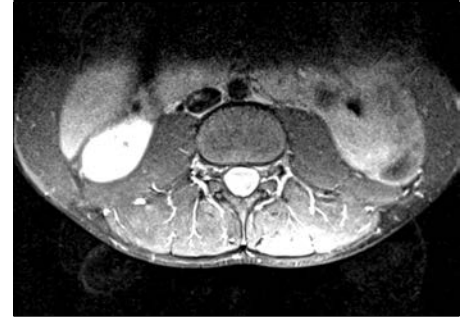
Obrázek 2. MR LS páteře, T1 sekvence, sagitální průmět, nativ. Tumorózní útvar má zvýšenou intenzitu signálů, je izosignální s míchou



Obrázek 3. MR LS páteře, T1 fs sekvence, sagitální průmět, postkontrastní vyšetření. Tumor je po aplikaci k.l. výrazně, téměř homogenně nasycený kontrastní látkou



Obrázek 4. MR LS páteře, T1 fs sekvence po aplikaci k.l. iv, axiální projekce. Tumor v páteřním kanálu je hypersignální, výrazně nasycený k.l.



signalitě, po aplikaci k. l. se mírně nehomogenně nasýtil. Je velikosti asi 38 × 16 × 15 mm, je mírně dorzálně vyklenutý. Mícha je bez ložiskových změn, míšní kořeny nad útvarem jsou bez zřetelných změn, kaudálně od útvaru mají atypický průběh. Páteřní kanál je kaudálně od útvaru prostornější. Skelet je bez patologických změn (obrázky 1, 2, 3, 4). Závěr byl: intradurální extramedulární tumor v úrovni L3/4, patrně schwannom nebo neurofibrom.

Při přijetí na Dětskou kliniku měl pacient výrazné bolesti v lumbální krajině, zejména při uléhání, Lassegueův test vpravo normální, vlevo pociťoval bolest ve 45°, opět v lumbální krajině. Předklon prakticky nezládal, chůze byla antalgická asymetrická. Z osobních anamnestických údajů: chlapec z II. gravidity, porod v termínu, nemocnost byla běžná, operován nebyl, úrazy pouze drobné, dispenzarizován nikde nebyl. Matka pacienta je zdravá, otec měl výhřez intervertebrálního disku, starší sestra hypotyreózu. Laboratorní hodnoty bez pozoruhodností.

Chlapec byl neurochirurgem indikován k operaci. Při výkonu byly výrazně krvavivé poměry epidurálně. Po hemilaminectomii byl viditelný rozsáhlý křehký vysoce vaskulární tumor v intimním kontaktu s filum terminale (obrázek 9). Provedena postupná radikální exstirpace tumoru ostře od filum terminale – dle operátora budil dojem spíše jako ependyom než schwannom.

Histologický obraz a imunohistochemický profil však odpovídá schwannomu. Tumor je bez zjevné mitotické aktivity. Imunohistochemicky

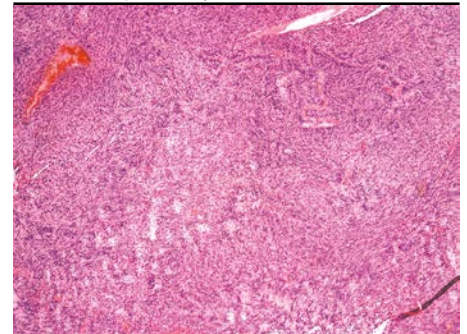
vykazují nádorové buňky pozitivitu S-100. Proliferační aktivita Ki-67 dosahuje cca 5–7% nádorových buněk (obrázky 5, 6, 7, 8). Výsledek druhého čtení potvrzuje diagnózu schwannomu, bez známek malignity (doc. MUDr. Leoš Křen, Ph.D., FN Brno).

Po operaci se pacient postupně mobilizoval, nadále probíhala rehabilitace a léčba analgetiky. Přetrvávala pooperačně slabost dolních končetin, chůze s obtížemi, závratě a bolest hlavy. Pro zachycený systolický šelest doplněno kardiologické vyšetření s nálezem drobného defektu síňového septa, hemodynamicky nevýznamného. Před propuštěním byl klinický nález příznivý, bolesti v regresi, bez vertiga. Následovat bude kontrolní neurologické vyšetření s odstupem a MR páteře za 3 měsíce.

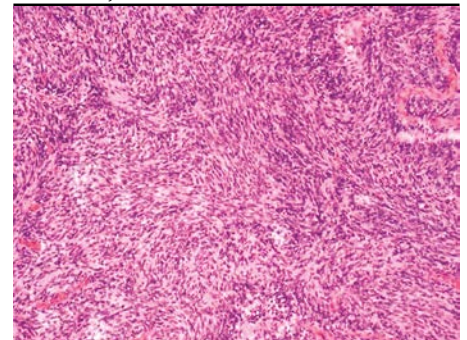
Diskuze

Obvykle je růst schwannomů velmi pomalý a i klinické příznaky se zhoršují velmi plíživě. Symptomatologie schwannomů zahrnuje zejména segmentová neuralgie, při dráždění míšních kořenů dochází k projevům iritace nebo parézy dolních končetin. Dále je často přítomen sensorický deficit. Motorická slabost je přítomná až u ¼ pacientů a doprovází častěji hrudní a krční léze než tumory v bederní oblasti (4). Diferenční diagnóza spinálních schwannomů je obtížná: pacienti jsou někdy léčeni pro herniaci disku při nepřesně definovaném lumbo-ischiadickém syndromu. Byly publikovány i případy mylně diagnostikované apendicitidy, nefrolitiázy, nebo u dospělých pacientů i anginy pectoris (2). Vyšetření pomocí magnetické rezonance (MRI)

Obrázek 5. Hematoxylin-eozin, zvětšení 40x. Schwannom, převaha vysoce buněčné Antoni A oblasti



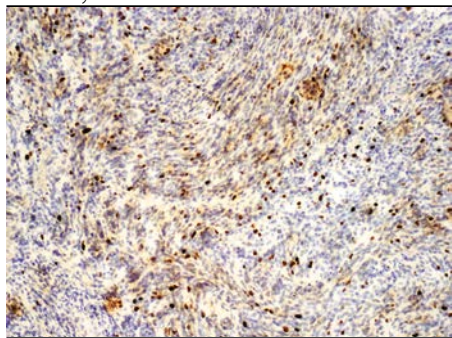
Obrázek 6. Hematoxylin-eozin, zvětšení 100x. Vřetenité buňky, sestavené do svazků, s naznačením sešikování jader



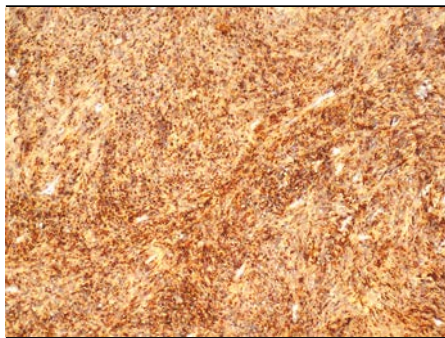
je dnes zobrazovací metodou volby nejenom před operací, ale je z prognostického hlediska odůvodněno i po exstirpaci tumoru (9). Cílem neurochirurgické léčby je kompletní exstirpace nádoru (6). Recidivy schwannomů jsou velmi vzácné. Schwannomy (neurofibromy) von Recklinghausenovy choroby (NF2) mají horší prognózu (11).

U našeho šestnáctiletého pacienta byl spinální schwannom diagnostikován poměrně rychle od objevení se prvních segmentových bolestí zad (průměrná délka klinických příznaků do diagnózy bývá 2–3 roky). Byl potvrzen pomocí vyšetření MRI a radikální operační léčbou z hemilaminectomie byl kompletně resekován. Histologickým vyšetřením bylo potvrzeno, že buňky nádoru jsou bez mitotické aktivity a s velmi nízkou proliferační aktivitou.

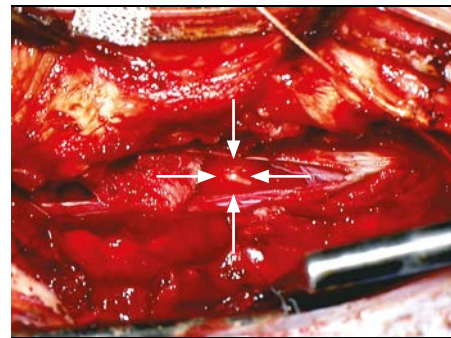
Obrázek 7. Imunohistochemické vyšetření proliferční aktivity pomocí markeru Ki-67, zvětšení 100x. Proliferační aktivita je nízká, dosahuje cca 5–7% nádorových buněk



Obrázek 8. Imunohistochemické vyšetření S100 proteinu, zvětšení 100x. Difuzní pozitivita většiny nádorových buněk, svědčící pro jejich původ z nervové tkáně



Obrázek 9. Intraoperační fotografie s hemilaminektomií provedenou ve střední čáře. Šípkami vymezená prosvítající tumorózní léze spinálního schwannomu v úrovni obratlů L3 a L4



Stojí za zapamatování:

- Schwannom páteřního kanálu je v dětském věku velmi vzácný nezhoubný nádor.
- Klinické neurologické příznaky se objevují obvykle velmi pomalu a mohou být velmi vážné.
- Nejčastějším příznakem je segmentová bolest v oblasti kterékoliv části páteře, následovaná senzoryckým deficitem a motorickou slabostí.
- Léčebným cílem je kompletní neurochirurgická resekce nádoru.

*Tato práce byla podpořena
Ministerstvem školství, mládeže
a tělovýchovy České republiky (LO1304).*

Literatura

1. Rodriguez De Diego E, Edreira Roca A, García Martin B. Schwannoma benigno retroperitoneal: aportación de un nuevo caso. *Actas Urol Esp* 2000; 24(8): 685–688.

2. Conti P, Pansini G, Mouchaty H, et al. Spinal neurinomas: retrospective analysis and long-term outcome of 179 consecutively operated cases and review of the literature. *Surg Neurol* 2004; 61(1): 34–43.

3. Safavi-Abbasí A, Senoglu M, Theodore N. Microsurgical management of spinal schwannomas: evaluation of 128 cases. *J Neurosurg Spine* 2008; 9: 40–47.

4. Mukerji G, Sherekar S, Yadav YR, et al. Pediatric intramedullary schwannoma without neurofibromatosis. *Neurol India* 2007; 55(1): 54–56.

5. Chowdhury FH, Haque MR, Sarker MH. High cervical spinal schwannoma; Microneurosurgical management: An experience of 15 cases. *Acta Neurol Taiwan* 2013; 22: 59–66.

6. Yeh KT, Lee RP, Yu TC, et al. Surgical outcome of spinal neurilemmoma: two case reports. *Medicine (Baltimore)* 2015; 94(5): e490.

7. Kim NR, Suh Y-L, Shin H-J. Thoracic pediatric intramedullary schwannoma: Report of a case. *Pediatric Neurosurgery* 2009; 45(5): 396–401.

8. Binatli O, Erşahin Y, Korkmaz O, Bayol U. Intramedullary schwannoma of the spinal cord. A case report and review of the literature. *J Neurosurg Sci* 1999; 43(2): 163–167.

9. Colosimo C, Cerase A, Denaro L, Maira G, Greco R. Magnetic resonance imaging of intramedullary spinal cord schwanno-

mas. Report of two cases and review of the literature. *J Neurosurg* 2003; 99(1 Suppl): 114–117.

10. Kyoshima K, Horiuchi T, Zenisaka H, et al. Thoracic dumbbell intra- and extramedullary schwannoma. *J Clin Neurosci* 2005; 12(4): 481–484.

11. Mihál V, Michálková K, Neklanová M, et al. Neurofibrom páteřního kanálu jako méně obvyklá příčina coxalgie. *Pediatr pro Praxi* 2001; 5: 243–244.

prof. MUDr. Vladimír Mihál, CSc.
Dětská klinika LF UP a FN v Olomouci
Puškinova 5, 775 20 Olomouc
vladimir.mihal@fnol.cz



Choledochální cysta III. typu s malrotací jako příčina novorozenecké duodenální obstrukce

prof. MUDr. Vladimír Mihál, CSc.^{1,2}, MUDr. Tomáš Malý, Ph.D.³, MUDr. Jaroslav Michálek⁴,
MUDr. Tereza Kratochvilová⁵, MUDr. Kateřina Sobková⁵, MUDr. Kamila Michálková⁶

¹Ústav translační a molekulární medicíny LF UP Olomouc

²Dětská klinika LF UP a FN Olomouc

³Chirurgická klinika LF UP a FN Olomouc

⁴Ústav klinické a molekulární patologie LF UP a FN Olomouc

⁵Centrum fetální medicíny FN Olomouc

⁶Radiologická klinika LF UP a FN Olomouc

Děti s choledochální cystou se klinicky obvykle prezentují s triádou bolestí břicha, cystickým útvarem v pravém horním kvadrantu a obstrukční žloutenkou. Pokud je cysta velká, může se projevit také proměnlivými stupni duodenální obstrukce. Souvislost mezi duodenální obstrukcí a choledochální cystou je velmi vzácná i když je známo, že duodenální obstrukce je spojená s mnoha dalšími anomáliemi. Autoři popisují kazuistiku 10denního novorozence, u kterého byla choledochální cysta příčinou postupného rozvoje duodenální obstrukce. Peroperačně byla nalezena choledochokéla (typu III) s doprovodnou malrotací. Byla provedena korekce malrotace, kompletní resekce duodena D2-3 s excízi choledochální cysty a finálně back-to-back duodeno-jejunoanastomóza.

Klíčová slova: choledochální cysta, choledochokéla, III. typ choledochální cysty, malrotace, duodenální obstrukce, novorozenec.

Type III choledochal cyst with malrotation as a cause of newborn duodenal obstruction

Infants with choledochal cyst classically present with a triad of abdominal pain, right upper quadrant mass, and obstructive jaundice. If the cyst is large, it may also manifest with variable degrees of duodenal obstruction. The connection between congenital duodenal obstruction and concomitant choledochal cyst has not been reported frequently, although duodenal obstruction is known to be associated with many other anomalies. The authors describe the case study of a 10-day-old neonate whose choledochal cyst was the cause of the progressive development of duodenal obstruction. Choledochocoele (type III) with accompanying malrotation was found peroperatively. Correction of malrotation, resection of D2-3 duodenum with complete choledochal cyst excision and finally back-to-back duodenal-jejunoanastomosis was performed.

Key words: choledochal cyst, choledochocoele, type III choledochal cyst, malrotation, duodenal obstruction, newborn.

Úvod

První popis choledochální cysty je připisován německému anatomovi Abrahamu Vaterovi, který choledochální cysty zaznamenal během disekce v roce 1723, krátce poté, co poznal povahu spojení žlučových a pankreatických vývodů do ampuly, která nyní nese jeho jméno (1). Sir W. C. Wheeler původně popsal choledochokélu

v roce 1915 jako cystickou strukturu zasahující do duodena a vedoucí k biliární obstrukci (2). Choledochální cysty (CDC) jsou vzácné vrozené anomálie s výskytem 1 z 200 000 narozených dětí v západní populaci. Čtyřikrát častější výskyt je pozorován u žen a asijské populace. Ačkoli jsou přítomny od dětství, jsou často diagnostikovány až v dospělosti. Choledochální cysta byla poprvé

diagnostikována antenatálně pomocí ultrazvuku Dewburym a kol. v roce 1980 (5). Dnes je až 15 % CDC diagnostikováno antenatálně, což jsou téměř vždy typy Ic nebo V. Důležité je vždy vyloučit možnost cystické biliární atrezie, která vyžaduje urgentní portoenteroanastomózu podle Kasaie.

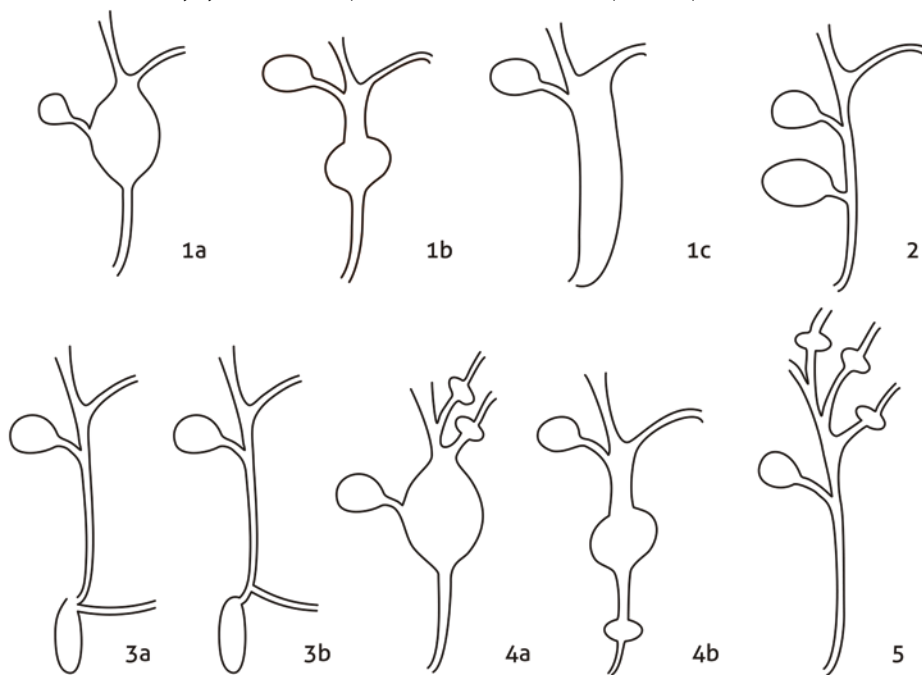
Klinicky se prezentuje bolestmi břicha, obstrukční žloutenkou a přítomností cystického



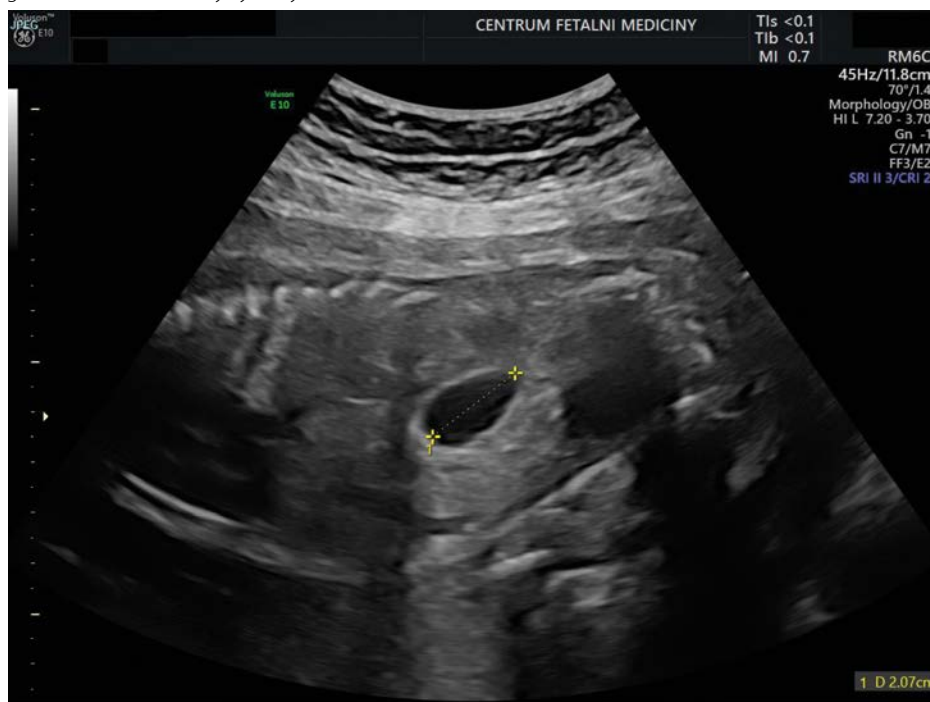
KORESPONDENČNÍ ADRESA AUTORA: prof. MUDr. Vladimír Mihál, CSc., vladimir.mihal@fnol.cz
Dětská klinika LF UP a FN Olomouc
Puškinova 5, 775 20 Olomouc

Cit. zkr: Pediatr. praxi. 2018; 19(5): 290–295
Článek přijat redakcí: 21. 9. 2018
Článek přijat k publikaci: 25. 9. 2018

Obr. 1. Různé druhy cyst choledochu podle klasifikace Todaniho. Upraveno podle (12)



Obr. 2. UZ vyšetření plodu, grav. hebd.25+6. V dutině břišní se v subhepatické oblasti zobrazuje anechogenní, dobře ohraničený cystický útvar



útvary v pravém horním kvadrantu břicha. Cholangitida, pankreatitida, portální hypertenze a abnormality jaterních funkčních testů jsou časté a jsou považovány za důsledek ABPDU (anomální pankreatobiliární duktální junkce) nebo obstrukce z konkrementů (2).

Popis klinického případu

10denní novorozenec byl odeslán PLDD k přijetí na kliniku pro váhový úbytek

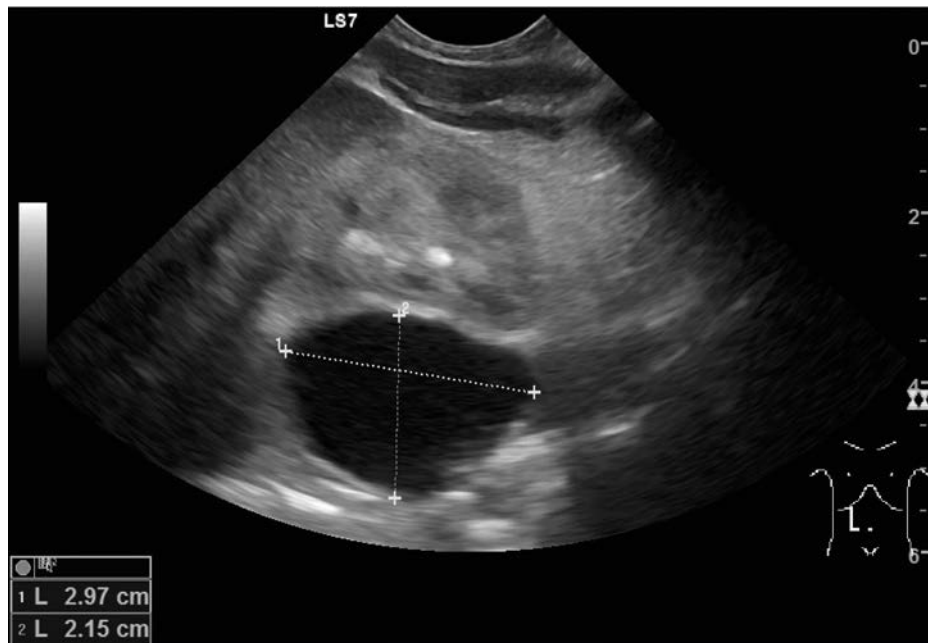
(-110 g/6 dní). Dítě **opakovaně zvrací** po každém kojení, **zvracení je explozivní – obloukem**. Stav dítěte se zhoršil 7. dne života, od kdy byly **zvrátky žlutozelené** a objevil se i **výraznější ikterus**. Dle matky se ale dítě o jídlo hlásilo, stoličky byly charakteru míchaných vajíček denně. Pomočené pleny zvykle, moč byla ale sytě žlutavá.

Od prenatalního života byla dispenzarizována pro nález **ohraničeného anechogenního cystického útvaru v subhepatické oblasti**

(obr. 2). Dítě bylo z III. gravidity/III. para, kombinovaný screening v I. trimestru byl negativní, podrobná morfologie plodu ve II. trimestru s nálezem cystické formace v dutině břišní, těhotenská cukrovka byla léčena dietou. Porod byl ve 35 + 4 t. gravidity, PH 2980 g, spontánně záhlavím, plodová voda čirá, dítě po vybavení bez potíží s adaptací. Na novorozeneckém oddělení bylo 3. den života provedeno kontrolní UZ vyšetření (obr. 3) na kterém bylo potvrzeno, že cystický útvar se od prenatalní kontroly mírně zvětšil do velikosti 29 x 21 mm s patrnou stěnou šíře 1 mm, bez prokrvení v dopplerovském mapování průtoku. V diferenciální diagnostice jsme zvažovali možnosti střevní duplikatury, mezenteriální cysty nebo lymfangiomu. Hodnoty transkutánní bilirubinometrie (Minolta) byly od 75 μmol/l, do 208 μmol/l ve fyziologickém rozmezí. Játra byla nezvětšena, přiměřené echogenity, bez ložisek. Žlučník nezvětšen, stěna byla nerozšířená, bez detekce lithiázy. Vývodné žlučové cesty byly nerozšířeny, v přehledném rozsahu bez detekce lithiázy. Pankreas nebyl patrný. Slezina nezvětšena, přiměřené echogenity, bez ložisek. V peritoneální dutině bez volné tekutiny. Novorozenecký screening byl odebrán kompletně. Před propuštěním z novorozeneckého oddělení bylo dítě plně kojeno, začínalo prospívat na váze, hmotnost při propuštění byla 2790 g, klinický nález byl fyziologický, pupeční pahýl ponechán. Maminka o ošetřování dítěte poučena. Dítě bylo za 6 týdnů pozváno na kontrolní ambulantní ultrazvukové vyšetření břicha.

Při náhlém zhoršení bylo dítě při přijetí afebrilní, ameningeální, hydratace byla mírně snižena–turgor povadlý, moč byla tmavá. Skléry nažloutlé, zornice izokorické s reakcí na osvit. AS pravidelná, ozvy ohraničené, bez šelestu. Dýchání v celém rozsahu plic puerilní, bez vedlejších fenoménů. Bříško bylo meteoristické a vzdušné, hůře prohmatné, patologická rezistence ani organomegalie nebyla hmatná, peristaltika živější. Genitál čistý, anus bpn, per rectum nevyšetřena. Kůže lehce ikterická. Otoky 0. Hmotnost 2904 g (-110 g/6dní). **Pro akutně vzniklou obstrukci GIT** (duodena – zelený obsah zvratků), zvýšenou intenzitu ikteru a blíže nespecifikovaný **cystický útvar v dutině břišní** velikosti 29x21 mm) byla pro projevy duodenální obstrukce přijata na JIRP.

Obr. 3. UZ vyšetření břicha 3. den života, cystický útvar uložený subhepaticky se od prenatalní kontroly zvětšil



Obr. 4. UZ vyšetření břicha 10. den života. Cystický útvar uložený v horní polovině břicha vpravo se opět od posledního vyšetření zvětšil

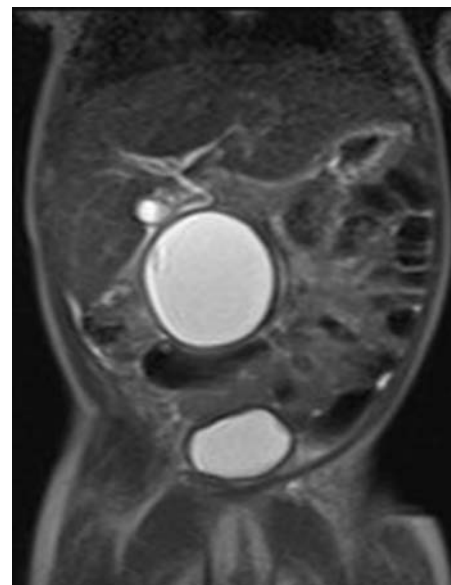


Laboratorní vyšetření v den přijetí: Krevní obraz: leukocyty: $15,95 \times 10^9/l$, hemoglobin 194 g/l, HCT: 0,56, destičky: $518 \times 10^9/l$, dif. rozpočet: Ly: 32,0 %, Mo: 12,5 %, Ne: 51,9 %, Eo: 3,2 %, Ba: 0,4 %. Koagulační screening byl v mezích normy. Biochemie-sérum: Na: 139 mmol/l, K: 4,49 mmol/l, Mg: 0,85 mmol/l, P: 1,29 mmol/l, urea: 4,6; kreatinin 27, konjugovaný bilirubin: 26,5 $\mu\text{mol/l}$; nekonjugovaný bilirubin: 355 $\mu\text{mol/l}$; **ALT: 0,81 $\mu\text{kat/l}$; AST: 1,21 $\mu\text{kat/l}$; ALP: 3,99 mmol/l, GGT: 17,50 $\mu\text{kat/l}$; amyláza: 0,07 $\mu\text{kat/l}$; / lipáza: 4,71 $\mu\text{kat/l}$; CB: 54,0 g/l; ALB: 46,0 g/l; CRP:**

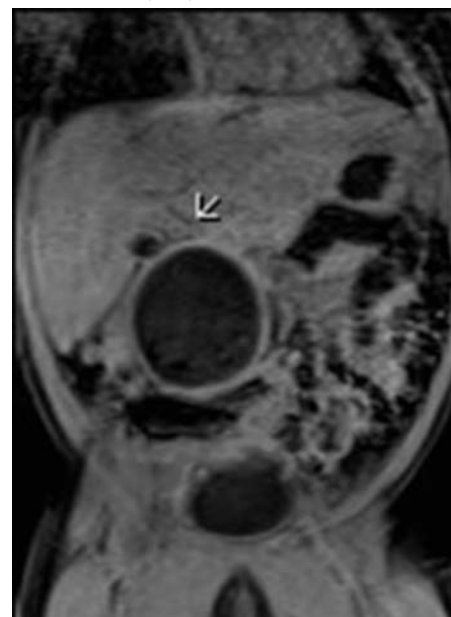
0,7 mg/l; PCT: 0,16 $\mu\text{g/l}$; cholesterol: 2,20 mmol/l, triglyceridy: 0,73 mmol/l.

Zobrazovací vyšetření: vyšetření pomocí ultrazvuku (obr. 4): v mesogastriu více vpravo se zobrazoval útvar velikosti asi 40 x 30 mm, od poslední kontroly zvětšený, měl zřetelnou jemnou stěnu a obsah převážně anechogenní, při pravém okraji byl patrný hyperechogenní okrsek a v zadní části byl jeho obsah mírně zahuštěný. Prokrvení nebylo přítomné. Útvar byl v blízkosti duodena, dif. dg. stejná jako dřív, viz minulé vyšetření. Pylorus se nedařil zobrazit, byl patrně

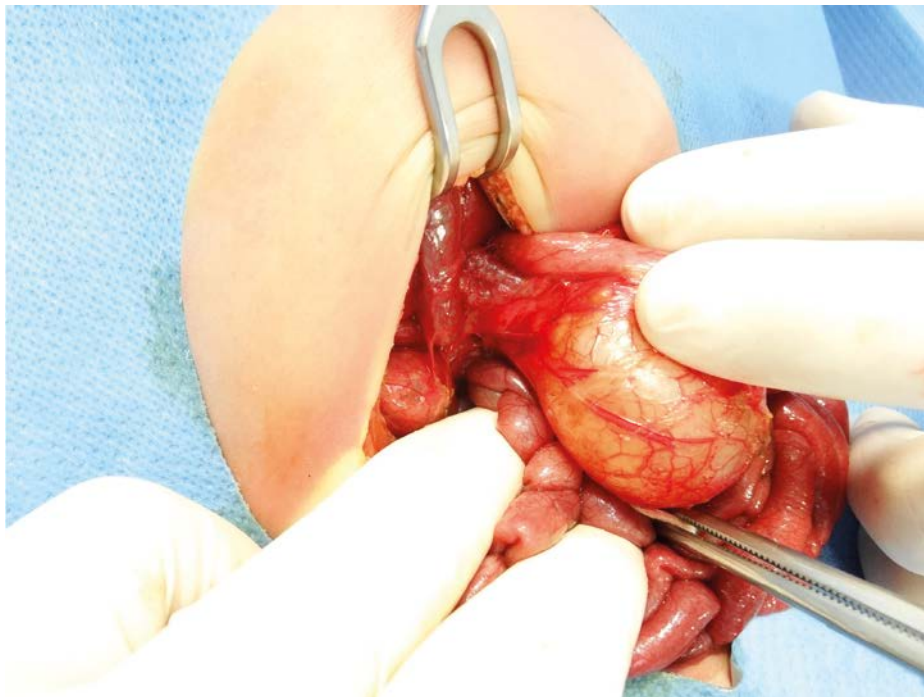
Obr. 5. MR vyšetření břicha, T2 sekvence, koronální zobrazení. Cystický útvar je hypersignální, dobře ohraničený, uložený v těsné blízkosti d. choledochus, duodenum není dobře přehledné



Obr. 6. Stejně MR vyšetření, T1 sekvence koronálně. Cystický útvar je homogenní, hyposignální, částečně je zachycený d. hepatocholedochus (šipka)



v těsné blízkosti útvaru. Intrahepatické žlučovody byly jemné, hepatocholedochus byl širší - asi 4 mm široký, ale cystický útvar na něj přímo nenavazoval. Žlučník byl normální, pankreas se nedal diferencovat. **MR vyšetření břicha** (obr. 5, 6): V subhepatické oblasti více mediálně se zobrazoval oválný útvar velikosti asi 40 x 30 x 28 mm, byl hladce konturovaný, stěnu měl jemnou, na T2 sekvenci byl hypersignální, na T1 sekvenci hyposignální mírně nehomogenní, se zřetelnou stěnou, která měla vyšší signál a po aplikaci k.l. iv se nasýtila. **Cystický útvar kompri-**

Obr. 7. Cystická dilatace D2–3 duodena**Obr. 8.** Cystická dilatace D2–3 duodena – viditelná distální odstupující klička střevní (současně šlo o non-rotaci s mesenterium commune a bez vytvořeného lig. Treitzzi)

moval duodenum, roztlačoval kličky tenkého střeva, byl v těsné blízkosti ductus choledochus, který byl jemný, těsně naléhal na hlavu pankreatu, která byla špatně přehledná, zbytek pankreatu byl nevětšený. Žlučník byl bez změny, játra byla bez ložiskových změn, slezina nevětšená, ledviny byly orientačně beze změn.

Závěr: cystický útvar v mezogastriu více vpravo – etiologie nejasná – střevní duplikatura? mezenterální cysta? Po vyšetření dětským chirurgem bylo dítě doporučeno k chirurgickému řešení.

Operační nález (obr. 7, 8, 9): břišní dutina byla bez výpotku, v podjatelní krajině jsme našli cystoid popisovaný na MR, přes něj bylo uloženo cékum (jde o malrotaci). Provedli jsme discise Laddových pruhů, uvolili jsme cékum, colon ascendens a colon transversum, a tím obnažili cystoid - jde o cystickou dilataci D 2–3 duodena v průměru 5 × 5 × 5 cm. Duodenum jsme v rozsahu D1–D3 protáli, intramurálně jsme našli cystoid. Žlučník i žlučovody byly bez patologického nálezu – hepatocholedochus byl

jemný). Provedli jsme resekci D2–D3 společně s cystoidem (histologické vyšetření) (obr. 10, 11) a nakonec duodeno-jejuno-anastomózu. DJA je asi 4–5 cm dlouhá, je vitální. Vzhledem k malrotaci, byly kličky tenkého a tlustého střeva zvykle uloženy do pozice non-rotace.

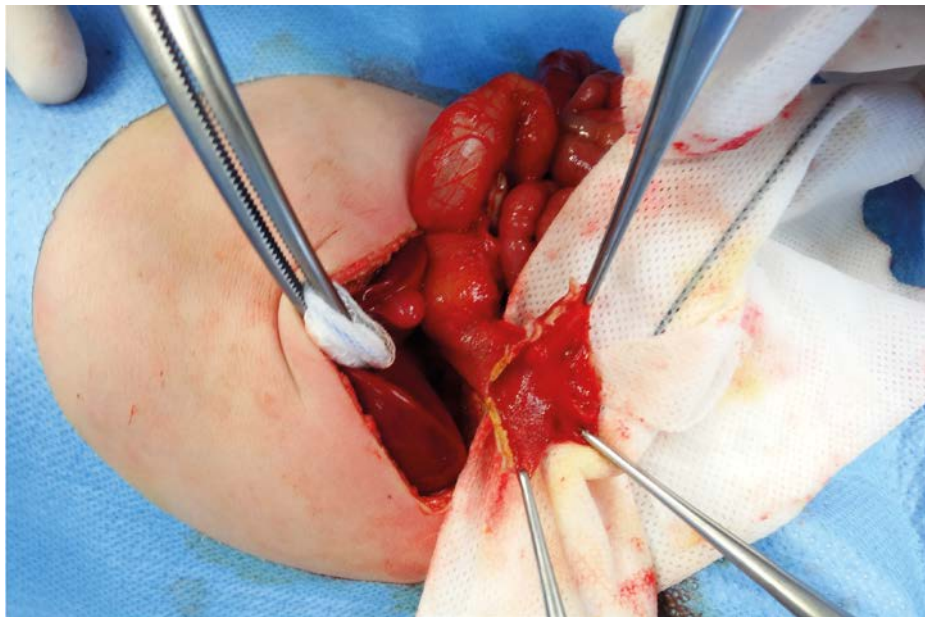
Peroperačně byla zahájena léčba antibiotiky, další péče na JIRP. Kardiopulmonálně bylo dítě kompenzováno, postupně byl zahájen enterální příjem, navyšovány byly dávky, které tolerovala. Rána byla klidná, zhojila se per primam. Kompletně převedena na mateřské mléko, plně kojena, pila i přes 70 ml/dávku, prospívala, při propuštění z nemocnice byla její hmotnost 3160 g. Den před propuštěním byla vyšetřena funkčnost anastomózy. NG sondou byl podán vodný roztok kontrastní látky: k.l. ihned postoupila do bulbu a duodenální kličky, v místě anastomózy na duodenu je patrný oválný defekt, velikosti asi 8 × 4 mm, patrně pooperační změny, po 3 hod od podání k.l. byl minimální zbytek v žaludku a k.l. byla až v oblasti rektální ampuly.

Diskuze

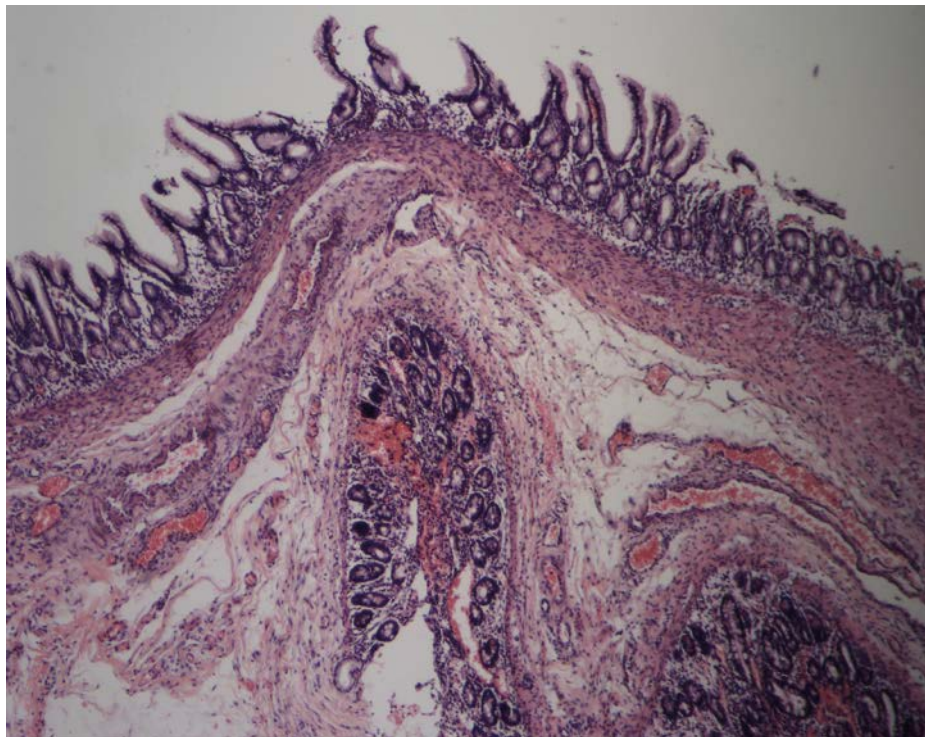
CDC byly v roce 1977 klasifikovány podle Todaniho do pěti variant (obr. 1) (3). Todani vyšel ze starší (1959) klasifikace podle Alonso-Leje a kol. (15). Z pěti variant CDC je typ III, také známý jako choledochokéla, nejméně běžnou variantou, zahrnující pouze 1,4–4,5 % ze všech typů CDC. Choledochokéla se projevuje jako cystická dilatace distálního společného žlučovodu (CBD), který může vyčnívat do dvanácterníku. V roce 1995 Todani doplnil svou klasifikaci o koncept pankreatobiliární maljunkce, která je převážně asociovaná s typy Ia, Ic a IVa (7, 8).

Choledochokéla (nebo **choledochální cysta typu III**) je vzácná vrozená malformace, při které dochází k cystické dilataci intraduodenální části distálního společného žlučovodu. Často je příčinou recidivující bolesti pravého horního kvadrantu, žloutenka nebo hyperamylasémie. Průměrný věk při diagnóze u publikovaných pediatrických případů byl 7,8 ± 5,5 roku (rozsah 6 týdnů – 15 let). Nejběžnějšími příznaky při diagnóze byly bolesti břicha, nauzea/zvracení a žloutenka. Méně časté příznaky jsou horečka a acholická stolice. Nejčastějšími laboratorními nálezy jsou hyperamylasémie a hyperbilirubinémie. Mezi další nálezy patřily zvýšené jaterní testy, hyperlipasémie, zvýšená alkalická

Obr. 9. *Distálně protátá klička pod cystoidem duodena a ventrálně discidována – intraluminální cysta = choledochokéla, pinzeta v místě výronu žluči*



Obr. 10. *Barvení hematoxylin-eozin (HE), zvětšení 40x. V dolní části obrázku část stěny duodena, v horní části výstelka choledochokély*



fosfatáza, leukocytóza a zvýšená hladina CRP (9). V rozsáhlé retrospektivní studii bylo zjištěno, že pouze 254 pacientů (0,7 %) mělo CDC typu **Todani III** (choledochokélu). Nejčastějším otevřeným postupem byla transduodenální celková resekce cysty. Endoskopická sfinkterotomie byla provedena u pěti pediatrických pacientů. Všichni dětské pacienti s hlášenou patologií měli v choledochokéle **duodenální sliznici** a všichni měli stejně dobré pooperační výsledky, nezávisle

na léčbě. Nejčastější diagnostickou modalitou choledochálních cyst byla ultrasonografie. Tyto cysty lze dále zobrazit pomocí MR cholangiografie nebo MR vyšetřením břicha, ERCP nebo endoskopickou ultrasonografií (8, 11, 14).

Etiologie vývoje choledochokély zůstává stále nejasná. Existují ale dvě hlavní hypotézy: hypotéza **pankreatického refluxu** a hypotéza **obstrukčního segmentu**. První z nich, kterou navrhl americký radiolog Donald Babbitt v roce

1969 – předpokládá, že aktivovaná proteolytická pankreatická šťáva poškozuje biliární epitel, přilehlou hladkou svalovinu, čímž oslabuje stěnu žlučových cest a způsobuje jejich dilataci. Druhá hypotéza pouze naznačuje, že existuje distální vrozený stenotický segment, a proto vzniká proximální biliární dilatace v důsledku zvýšeného intraluminálního tlaku (2, 4, 12, 13).

Diferenciální diagnostika (převážně u dospělých pacientů) zahrnuje pseudocysty pankreatu, biliární papilomatózu nebo žlučový hamartom. U dětí při sonografickém nálezu cystického útvaru v této lokalitě myslíme více na mezenterální cysty, lymfangiomy nebo střevní duplikaturu aj.

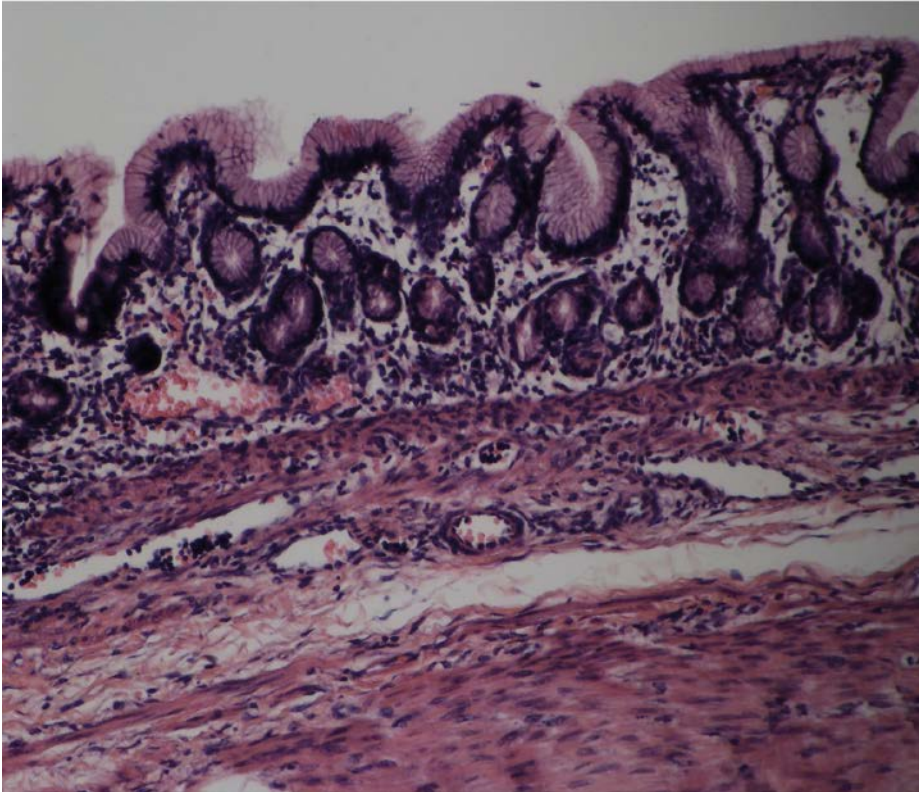
Postnatálně je sonografie počáteční diagnostickou modalitou volby, která umožňuje přesné měření dilatace intra/extrahepatálních žlučových cest, ale i identifikaci kamenů/kalů. Magnetická rezonanční cholangiopancreatografie (MRCP) nahradila použití CT a z velké části i endoskopickou retrográdní cholangiopancreatografii (ERCP) pro předoperační anatomické vymezení pankreatického a biliárního traktu. 3D obrazy s rekonstrukcí (maximální intenzita projekce) se dají snadno získat i když u kojenců a malých dětí je nutná sedace.

Zlatým standardem léčby v mnoha pediatrických chirurgických centrech je otevřená chirurgie s bilioenterickou rekonstrukcí provedenou hepatobiliárními specialisty. Kromě odstranění dilatované části extrahepatického biliárního stromu, se provádí následně i vyčištění dilatovaných intrahepatálních žlučových cest. Nejčastěji používaným chirurgickým postupem je resekce. Nejčastějšími komplikacemi u pacientů s CDC jsou choledocholitiáza, cholelitiáza, hepatolitiáza, cholangitida, pankreatitida a vzácně spontánní perforace cyst. Riziko rozvoje vzniku cholangiokarcinomu se pohybuje od 2,5 % do 28 % a zvyšuje se s věkem (16).

Pooperační morbidita a mortalita je u dětí typicky velmi nízká. Chirurgická resekce choledochálních cyst má celkově vynikající prognózu, s 89 % mírou bez pooperačních komplikací a celkovou mírou přežití 5 let, která je přes 90 % (2, 8). Bez ohledu na podtřídou choledochální cysty, vede vhodná terapie k přijatelným výsledkům.

Souvislost mezi vrozenou CDC a náhle vzniklou duodenální obstrukcí nebývá pozorována často i když je známo, že duodenální obstrukce je spojena s mnoha dalšími anomáliemi. U některých publikovaných přípa-

Obr. 11. Barvení hematoxylin-eozin (HE), zvětšení 100x. Detail stěny choledochokély



dů byly CDC doprovázeny mnohými dalšími vrozenými anomáliemi, které vedly ke střevní obstrukci: anulární pankreas a malrotace (9), duodenojejunální atřezie a malrotace (10). III. typ CDC – choledochokéla je vzhledem ke svému charakteru rovněž při výrazném naplnění (zvětšení) předurčená k duodenální obstrukci, jak jsme to pozorovali u našeho 10denního novorozence. Obstrukce byla značná a vyvinula se v průběhu několika hodin.

Naše pacientka s III. typem CDC byla po porodu dispenzarizována, ultrazvukem jsme kontrolovali vývoj subhepatální cysty. Cystická rezistence se až na mírné zvětšení po narození dítěte nechovala „invazivně“, vývoj dítěte neovlivňovala. K náhlému zhoršení došlo asi 48 hodin před přijetím na JIRP. Klinické příznaky – explozivní zvracení s obsahem žluči, meteoristické, vzdušné břicho ukazovaly na duodenální obstrukci. Po doplňujícím a vyšetřením pomocí ultrazvuku

a magnetické rezonance a vyšetření chirurgem jsme náhle zhoršení stavu dítěte mohli vysvětlit nálezem „známého“ subhepaticky uloženého cystického útvaru, který tentokrát způsobil obstrukci **duodena** a nacházel se v těsné blízkosti **hlavního žlučovodu** (ductus choledochus). Dítě urgentně podstoupilo operační zákrok, který potvrdil nález **choledochokély**, která byla doprovázena malrotací střev. Po uložení střev do polohy non-rotace, resekce choledochokély a duodena a duodenojejunoanastomóze se dítě na JIRP rychle zotavilo. Propuštěna byla domů osmý den po operaci. Měsíc po operaci je stále zdravá, plně kojena a s úplným odezněním žloutenky a dalších klinických příznaků.

Stojí za zapamatování:

- Děti s cystou choledochu se klinicky obvykle prezentují s triádou bolest břicha, cystického útvaru v pravém horním kvadrantu a obstrukční žloutenkou.
- Palpační nález cystického útvaru v oblasti pravého horního břišního kvadrantu zvyšuje podezření na choledochokélu.
- Dnes je až 15 % choledochálních cyst diagnostikováno antenatálně.
- Vyšetření pomocí ultrazvuku je vhodnou počáteční diagnostickou modalitou.
- Zlatým léčebným standardem CDC je otevřená chirurgie.

Tato práce byla podpořena Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (LO1304).

LITERATURA

1. Vater A, Ezler CS. Dissertatio de scirrhis viscerum occasione sectionis virii tympanite defunte. Wittenberge: 4 Pamphlets 1723: 881; 22.
2. Soares KC, Arnaoutakis DJ, Kamel I, et al. Choledochal cysts: presentation, clinical differentiation, and management. *J Am Coll Surg* 2014; 219(6): 1167–1180.
3. Todani T, Watanabe Y, Narusue M, et al. Congenital bile duct cyst: classification, operative procedures, and review of thirty-seven cases including cancer arising from choledochal cyst. *Am J Surg* 1977; 134: 263–269.
4. Makin E, Davenport M. Understanding choledochal malformation. *Arch Dis Child* 2012; 97: 69–72.
5. Dewbury KC, Aluwihare AP, Birch SJ, et al. Prenatal ultrasound demonstration of a choledochal cyst. *Br J Radiol* 1980; 53: 906–907.
6. Le Roy B, Gagnière J, Filaire L, et al. Pancreaticobiliary maljunction and choledochal cysts: from embryogenesis to therapeutic aspects. *Surg Radiol Anat* 2016; 38(9): 1053–1060.
7. Kazunori Tahara K, Ishimaru Y, Fujino J, et al. Association of extrahepatic bile duct duplication with pancreaticobiliary maljunction and congenital biliary dilatation in children: a case report and literature review. *Surg Today* 2013; 43: 800–805.
8. Lobeck IN, Dupree P, Falcone Jr, RA. The presentation and management of choledochoceles (type III choledochal cyst): a 40-year systematic review of the literature. *J Pediatr Surg* 2017; 52: 644–649.
9. Raman VS, Arora M, SK Khanna. Annular pancreas, type I choledochal cyst and malrotation in a low-birth weight newborn: a case report. *J Indian Assoc Pediatr Surg* 2015; 20(3): 155–156.
10. Arbell D, Orkin B, Naveh Y, et al. Duodenojejunal atresia with absent dorsal mesentery, choledochal cyst, and malrotation in a premature newborn—a case report. *J* 2006; 41(6): e11–13.
11. Lao OB, Stein S, Ely KA, Lovvorn III, HN. Synchronous Todani types I and III choledochal cysts in a 10-month-old infant: type IVb. *Pediatr Surg Int* 2008; 24: 859–862.
12. Tracy LE, Imagawa DK. Massive congenital choledochal cyst. *Liver Int* 2014; 34: e161.
13. Hamada Y, Ando H, Kamisawa T, et al. Diagnostic criteria for congenital biliary dilatation 2015. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2016; 23: 342–346.
14. Mangiavillano A, Conio M. Endoscopic ultrasound-guided ERCP in the treatment of a Todani type-III cyst causing acute necrotizing pancreatitis. *Endoscopy* 2016; 48(S01): e44.
15. Alonso-Lej F, Rever WB Jr, Pessagno DJ. Congenital choledochal cyst, with a report of 2, and an analysis of 94 cases. *Int Abstr Surg* 1959; 108: 1–30.
16. Korčáková E, Mírka H, Třeška V, et al. Cholangiogeni karcinom jako pozdní komplikace po resekci vrozené cysty žlučových cest. *Cees Radiol* 2015; 69(3): 174–180.

High-grade urothelial bladder cancer in children: A case report and critical analysis of the literature

Milan Kral^a, Jaroslav Michalek^b, Jozef Skarda^b, Tomas Tichy^b, Oldrich Smakal^a, Roman Kodet^c, Vladimir Student^a

Background. Bladder cancer is relatively common in adults. In children, it is extremely rare and in the majority of cases, low grade, low stage urothelial cancers are found.

Case report. We describe the diagnostic, therapeutic, and follow-up management of bladder cancer in a 3-year-old boy examined for painless hematuria. Transurethral resection of the tumor was performed and T1 high grade urothelial cancer with osseous metaplasia was found in definitive specimens. During the 2-year follow-up, there has been no recurrence. Typical characteristics of the most prevalent bladder tumors are presented.

Conclusion. Despite its low incidence and low prevalence bladder cancer in children is a very serious condition which must not be missed in the differential diagnosis of hematuria or urinary tract infection. It is vital to differentiate urothelial cancer from hamartoma and nephrogenic adenoma and, particularly in osseous metaplasia, from sarcomatoid carcinoma. Especially in high-grade cancers, precise TUR of the tumor with a careful follow-up is essential to detect cancer recurrence and reduce progression.

Key words: bladder cancer, treatment, children, pathology

Received: June 25, 2016; Accepted: August 10, 2016; Available online: October 3, 2016
<http://dx.doi.org/10.5507/bp.2016.045>

^aDepartment of Urology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc and University Hospital Olomouc, Czech Republic

^bDepartment of Clinical and Molecular Pathology, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc and University Hospital Olomouc, Czech Republic

^cDepartment of Pathology and Molecular Medicine, Faculty Hospital Motol and 2nd Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Czech Republic

Corresponding author: Vladimir Student, e-mail: studentv@seznam.cz

INTRODUCTION

Tumors of the urinary bladder are among the most serious malignant diseases of the urinary tract. These tumors represent about 5–10% of all cancers worldwide. According to Global Cancer Statistics for the year 2012, bladder cancer incidence and mortality rates are estimated to be 430,000 and 165,000 cases, respectively. Among men, the incidence is three times higher than in women¹. Due to the incidence to mortality ratio in adults, bladder cancer is considered one of the most serious diagnoses in oncological urology. The most important risk factor is tobacco smoking where the risk is 2–6 times higher in smokers than in non-smokers². From the histological point of view, transitional cell cancer (TCC) has the highest prevalence. Carcinogens causing TCC include aromatic amines (e.g., 2-naphthylamine, 4-aminobiphenyl, benzidine). The second most common type of bladder cancer is spinocellular cancer (10%) due to chronic urinary infection caused by schistosoma haematobium. At the time of diagnosis, 70–80% of tumors are non-muscle invasive (staging Ta, T1 or carcinoma in situ). The situation in children is completely different. Urothelial malignancies are a rare presentation in pediatric patients. Like adults, transitional cell cancers are histologically the most prevalent. Of these, neoplasias of low malignant potential and low-grade tumors are present, with the tumors being non-invasive (staging pTa) (ref.³). Infiltrating (pT1) or

high-grade cancers are extremely rare. Painless hematuria is usually the dominant symptom indicated for further examination. Exclusion or precise assessment of the location and extent of bladder cancer requires careful cystoscopy followed by curative transurethral tumor resection (TUR). The differential diagnosis must include urinary infection, stone formation, or possibly a foreign body in the urethra or bladder.

CASE REPORT

We present the case of a 3-year-old boy examined by his pediatrician due to an isolated episode of painless gross hematuria in December 2013. During further urine testing, only mild microscopic hematuria was detected. Sonography revealed an exophytic tumor 13 x 6 mm on the dorsal wall of the urinary bladder with well-marked blood supply on color-flow mapping (Fig. 1 and 2). Upper urinary tract sonography showed no pathology. The patient was indicated for cystoscopy under general anesthesia, which confirmed a 12-mm papillomatous tumor with a thin stalk on the back wall of the bladder. Transurethral resection with cold cup biopsy of the tumor bed was performed. The patient was discharged after permanent catheter removal on the second postoperative day. Specimens were sent for histopathological assessment. In accord with a second-look opinion from the pathology department at a

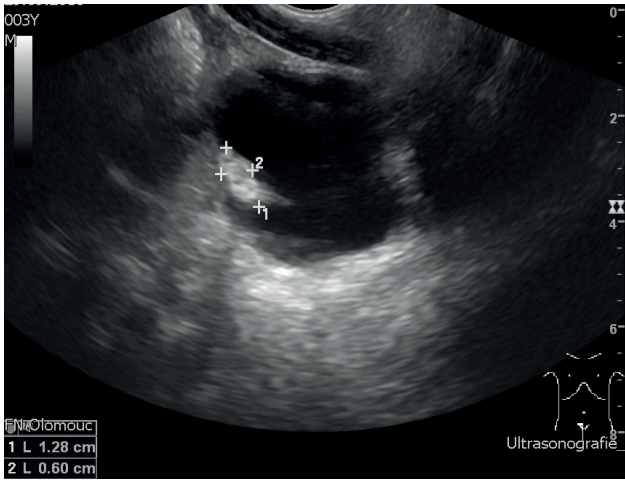


Fig. 1. Transabdominal sonography - sagittal view, urinary bladder with tumour.

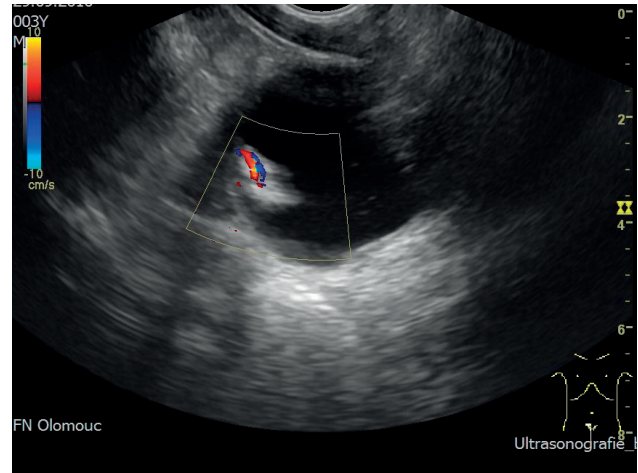


Fig. 2. Transabdominal sonography - sagittal view, urinary bladder with tumour with color-flow mapping.

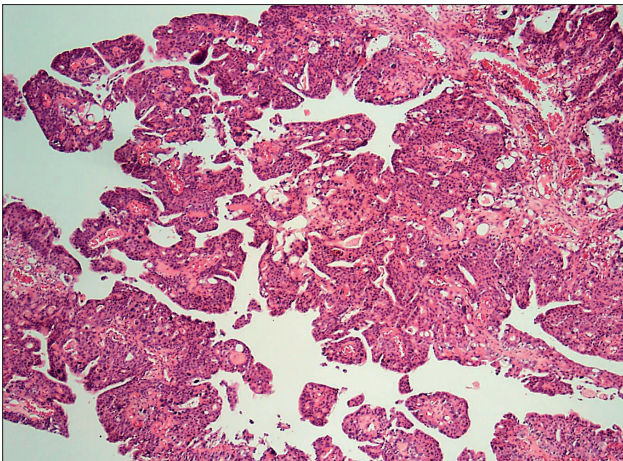


Fig. 3. Microscopy - HG papilocarcinoma (H&E, 100x).

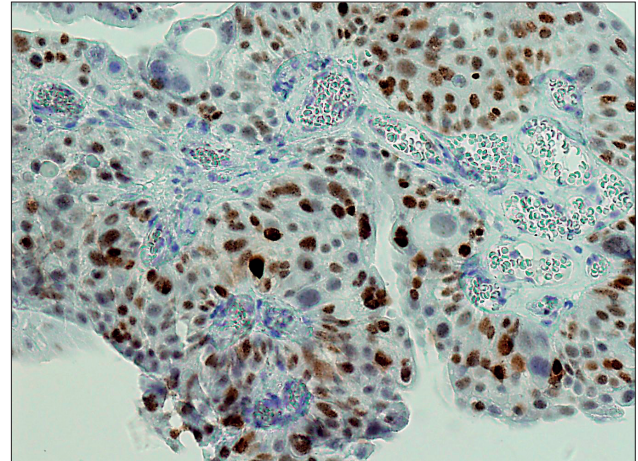


Fig. 4. Microscopy - p53 positivity in tumor cells (400x).

different university, the primary evaluation at our hospital revealed high-grade stage T1 transitional cell cancer with a papillary configuration according to the 2004 WHO classification of bladder tumors (Fig. 3). The papillae were lined by urothelium of various widths, with evident focal nuclear atypia. Surprisingly, glandular, squamous, and osseous metaplasias were present. Immunohistochemistry revealed positivity of p53 and aberrant expression of CK 20 in the tumor (Fig. 4). The Ki-67 index as a marker of proliferation activity was as high as 20%. In the stromal papillae, metaplastic bone parts were focally present (Fig. 5).

The follow-up schedule involves regular check-ups in 3–6-month intervals: urinalysis, urine cytology, and kidney and bladder sonography. One year after the initial TUR, cystoscopy under general anesthesia was indicated, with no pathological finding in the bladder. Upper urinary tract tumor was ruled out by magnetic resonance urography (MR-urography). The recurrence-free interval has already lasted two years since the initial diagnosis.

DISCUSSION

Urinary bladder carcinomas are tumors typical for an environmental background. The most important risk factor is smoking where smokers are more often affected at a younger age and they are often higher grade or stage. It is estimated that up to 50% of bladder cancers in men and 35% in women are directly caused by smoking. The male to female ratio is 3:1 and racial difference is also typical with a 39-fold higher prevalence among Caucasian men compared to African Americans. Transitional cancer of the bladder is a very rare malignancy in patients under 40 years (1–2.4% of all cancers) and among patients under 20 years it is extremely rare (0.1–0.4% of all bladder cancers) (ref.³⁻⁷). According to a recent meta-analysis, only 103 bladder cancer patients under 20 years have been described. Moreover, while two thirds of the patients were older than 15 years, only 14 patients were under 10 years of age³. A typical sign is usually painless gross hematuria, often as an isolated symptom. Sonography can reveal an exophytic bladder tumor, but cystoscopy is of crucial

Table 1. Differences between papilloma, LG and HG papilloccarcinoma and nephrogenic adenoma^{12,14,15}.

	Papilloma	Low grade papilloccarcinoma	High grade papilloccarcinoma	Nephrogenic adenoma
Age	Mean age:46 years; range 22-89 years, may occur in children	Mean age :70 years; rare in children	Usually ages 50+; extremely rare in children	Almost exclusively in children
Gross description	Soft, pink, small isolated growth with delicate papillary structures, usually pedunculated, mean 3 mm.	More solid cores with firmer consistency than papillomas, usually solitary. Wide variation in size.	Sessile or cauliflower-like with necrosis and ulceration. Exophytic papillary growth.	Polyloid, sessile or papillary, 20% are multiple.
Histology	Discrete papillary growth with a central fibrovascular core lined by urothelium of normal thickness and cytology.	Papillary urothelial neoplasm with some degree of cytoarchitectural disorder and distinct but low grade cytologic abnormality. No high-grade cytologic features (no pleomorphism, no mitoses toward surface, no nucleoli throughout).	A neoplasm with urothelium lining papillary fronds, a predominant disorderly pattern and moderate to marked architectural and cytologic atypia.	Metaplastic change with papillary or cystic structures composed of small hollow tubules similar to mesonephric tubules, usually lined by a single layer of bland cuboidal or hobnail cells, surrounding eosinophilic or basophilic secretions. Absence of mitosis, necrosis and significant cytological atypia.
Positive stains	<i>CK20</i> limited to superficial/umbrella cells as in normal urothelium <i>CK7</i>	<i>CK20</i> is stronger and diffusely extending into the deep layers <i>Ki67</i> mostly about 20 % <i>p53</i> index mostly less than 5 % <i>CK7</i> <i>Blood group antigens</i>	<i>CK20</i> is stronger and diffusely extending into the deep layers <i>Ki67</i> higher (mostly more than 40 %) <i>p53</i> index mostly more than 10 % <i>CK7</i> <i>Survivin</i> Overexpression of <i>p16</i> <i>Beta hCG</i> in 1/3 <i>ER</i> in 14 %	<i>CK7</i> <i>AMACR</i> <i>PAX2</i> <i>PAX8</i> <i>EMA</i>
Negative stains	<i>p53</i> low <i>Ki67</i>	Usually <i>survivin</i> <i>AMACR</i> <i>PAX8</i>	<i>Blood group antigens</i> No/weak expression of <i>E-cadherin</i>	<i>CK20</i> <i>CK903</i> <i>p63</i> <i>CD10</i> (may be positive)

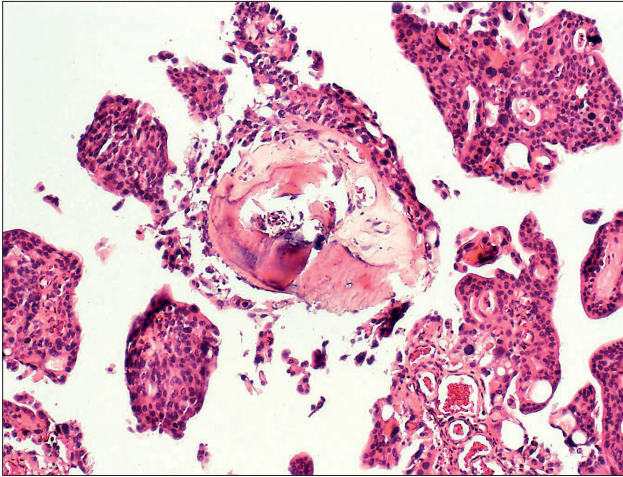


Fig. 5. Microscopy - bone metaplasia in stromal papillae (H&E 200x).

importance with subsequent histological confirmation of the tumor by biopsy or TUR.

The configuration of the urothelial tumor is usually papillary, but it can also be solid or mixed. The lesion is often seen as a thickening of the epithelium with an increased number of cell layers evenly distributed but densely packed. In adults, urothelial cancers are non-muscle invasive (i.e., Ta and T1) in more than 75% of cases and in children the number is even higher.

While the diagnosis and treatment of bladder cancer in children/young patients is quite straightforward and routine, there is a lack of uniformity in the postoperative follow-up in terms of the extent and frequency of examinations. In adults, the schedule of postoperative cystoscopies, cytologies, and upper urinary tract examinations is an essential part of all urological guidelines (American Urological Association, European Urological Association, National Comprehensive Cancer Network etc.) (ref.⁸); however, there are no precise follow-up recommendations for children. Most follow-up protocols use sonography to exclude recurrence. Combined cytology and cystoscopy are only seldom used on a regular basis although they have a higher recurrence detection rate compared to sonography alone. The frequency and type of examination vary according to tumor risk stratification (low – intermediate – high risk). In general, the recurrence rate after initial tumor excision/resection can be as high as 40–50%, with an additional 10–15% of progression to muscular involvement in adult patients. In children, recurrence and progression occur rarely. According to meta-analyses^{9,10}, the recurrence rate in patients younger than 20 years is only 7%, with tumor progression being exceptional. While single (or maintenance) intravesical instillation of chemotherapy is a standard and essential part of treatment after TUR, its use in children has only been described in a few cases. In contrast to the prevalent transitional cell tumors and the less frequently diagnosed spinocellular cancers or adenocarcinomas in adults, it is urothelial tumors that are exclusively detected in pediatric patients. Transitional cell carcinoma with osseous metaplasia of the stroma is

a rare variant of urothelial carcinoma. In the literature, there are only a few case reports describing this condition which must be distinguished especially from sarcomatoid carcinoma¹¹.

In children, it is particularly important to include two benign conditions in the differential diagnosis of bladder tumors: hamartoma and nephrogenic adenoma. Nephrogenic adenoma as a benign proliferation of the small glands of the urinary tract can almost exclusively be seen in the urinary bladder in children. The endoscopic appearance can mimic a malignant tumor due to the papillary appearance. Furthermore, the papillae may be mistaken for TCC on microscopy¹². Bladder hamartomas are extremely rare and in children, with a few cases having been published so far. Microscopically, the glands are dilated and may be filled with eosinophilic or proteinaceous secretions. Other pathological findings include a higher vessel density and a lack of cellular atypia or mitotic activity¹³. These are crucial differences in comparison with a typical urothelial bladder malignancy. Basic differences between papilloma, low grade (LG), high grade (HG) papillocarcinoma and nephrogenic adenoma are listed in Table 1.

CONCLUSION

After excluding urinary tract infection, stones or a foreign body in the urinary tract, urothelial bladder cancer has to be ruled out in children with gross hematuria. In pediatric cases, low-grade TCCs are typically found. It is important to differentiate urothelial cancer from hamartoma and nephrogenic adenoma and, particularly in osseous metaplasia, from sarcomatoid carcinoma. Especially in high-grade cancers, precise TUR of the tumor with a careful follow-up is essential to detect cancer recurrence and to reduce progression.

Author contributions: MK, VS: treatment, data analysis, manuscript preparation, final approval; OS: treatment; JM, JS: specimen revision, data analysis, manuscript preparation, final approval; TT, RK: specimen revision, data analysis.

Conflict of interest statement: None declared.

REFERENCES

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015;65(2):87-108.
2. Parkin DM. The global burden of urinary bladder cancer. *Scand J Urol Nephrol Suppl* 2008;(218):12-20.
3. Paner GP, Zehnder P, Amin AM, Husain AN, Desai MM. Urothelial neoplasms of the urinary bladder occurring in young adult and pediatric patients: a comprehensive review of literature with implications for patient management. *Adv Anat Pathol* 2011;18(1):79-89.
4. Colombel M, Soloway M, Akaza H, et al. Epidemiology, Staging, Grading and Risk Stratification of Bladder Cancer. *European Urology Supplements* 2008;7:618-26.
5. Wan J, Grossman HB. Bladder carcinoma in patients aged 40 years or younger. *Cancer* 1989;64:178-81.

6. Alanee S, Shukla AR. Bladder malignancies in children aged <18 years: results from the surveillance, epidemiology and end results database. *BJU Int* 2009;106:557-60.
7. Lerena J, Krauel L, García-Aparicio L, Vallasciani S, Sunol M, Rodó J. Transitional cell carcinoma of the bladder in children and adolescents: Six-case series and review of the literature. *J Pediatr Urol* 2010;6:481-5.
8. <http://uroweb.org/wp-content/uploads/EAU-Guidelines-Non-muscle-invasive-Bladder-Cancer-2015-v1.pdf>
9. Berrettini A, Castagnetti M, Salerno A, Nappo SG, Manzoni G, Rigamonti W, Caione P. Bladder urothelial neoplasms in pediatric age: experience at three tertiary centers. *J Pediatr Urol* 2015;11(1):26.e1-5.
10. Javadpour N, Mostofi FK. Primary epithelial tumors of the bladder in the first two decades of life. *J Urol* 1969;101:706-10.
11. Mege-Lechevallier F, Cherasse A, Ronze S, Colombel M, Scoazec JY. Transitional carcinoma of the ureter with osseous metaplasia of the stroma: a case report. *2007;27(1):43-6.*
12. Sathe PA, Ghodke RK, Kandalkar BM. Multifocal nephrogenic adenoma – a mimicker of malignancy. *Indian J Pediatr* 2012;79(12):1661-3
13. Ota T, Kawai K, Hattori K, Uchida K, Akaza H, Harada M. Hamartoma of the urinary bladder. *Int J Urology* 1999;6:211-4.
14. Safaei A, Farzaneh MR, Amin Sharifi AR. Immunohistochemistry Study in a Case of Nephrogenic Adenoma of Bladder. *Iran J Med Sci* 2012;37(2):137-40.
15. www.pathologyotlines.com/bladder

DISTÁLNÍ TYP EPITELOIDNÍHO SARKOMU U 31LETÉ ŽENY

Michálek J., Flodr P., Janková J., Tichý M.

Ústav klinické a molekulární patologie LF UP a FN Olomouc



Lékařská fakulta

Úvod

V kazuistickém sdělení je prezentován případ 31leté ženy, která před 2 lety prodělala operaci tumoru levého hypothenaru, vzhledem k recidivě tumoru s nutností následné amputace do poloviny předloktí levé horní končetiny. Před rokem bylo zjištěno ložisko metastázy v pravé plicí s následnou metastazektomií. Nyní dle PET CT vyšetření nalezeno mnohočetné postižení plic, bránice a perikardu, kdy kurativní resekce je nemožná.

Makroskopický a mikroskopický nález

Původní tumor hypothenaru velikosti 45×40×15 mm. Toho času byl proveden odběr 1 ložiska z bránice velikosti 6×5×3 mm. Histologicky jde o infiltrativně rostoucí tumor složený z epitelooidních a větvených buněk s mírnými jadernými atypii (obr. 1, 2). V buněčných partiích je charakteristická přítomnost nekrotizace (granuloma-like) – obr. 3, dále se vyskytují partie pseudoangiosarkomatózního vzhledu vznikající desintegrací buněk (obr. 4). Imunohistochemicky nádorové buňky vykazují pozitivitu AE1/AE3, EMA, vimentin, CK18, D2-40, Ki67 dosahuje cca 5 - 10 % (obr. 5).

Diagnóza

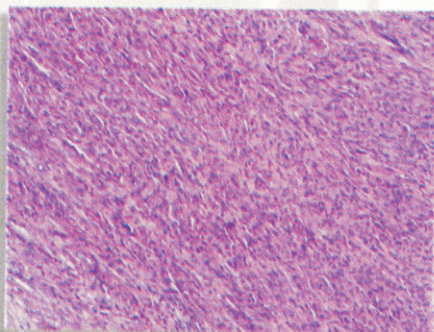
Epitelooidní sarkom, klasický „distální“ typ.

Diskuze a závěr

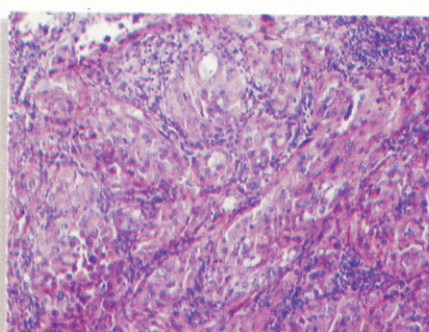
Epitelooidní sarkom je vzácný sarkom měkkých tkání u mladých dospělých (20 - 39 let), postihující v 60 % případů horní končetiny. Incidence dosahuje 0,4/1 milion obyvatel, je 2. nejčastější sarkom měkkých tkání na ruce a 6. nejčastější na horní končetině, mírně častěji jsou postiženi muži než ženy (1,8:1). Klinicky se projevuje jako solidní palpovatelná masa v hloubce měkkých tkání nebo v dermis, může způsobovat kontraktury nebo komprese nervů. Povrchové léze často ulcerují a mohou napodobovat špatně se hojící traumatickou ránu nebo bradavice, hluboké tumory zase mohou imitovat ganglion nebo tumor šlachové pochvy. Jde o pomalu rostoucí tumor s vysokým stupněm rekurencí a častým metastazováním – nejčastěji plic (51 %), lymfatické uzliny (34 %), hlava (22 %). U více než 80 % pacientů je přítomna ztráta tumor supresorového genu INI1, imunohistochemické stanovení INI1 je dostupné a může být použité k diagnóze epitelooidního sarkomu. V roce 1997 byl popsán proximální typ epitelooidního sarkomu postihující hluboké části pánve, perinea a proximální části končetin, vykazující agresivnější klinický průběh ve srovnání s distálními tumory. Histologicky je tvořený většími buňkami se zřetelnými cytonukleárními atypii, vezikulárními jádry s prominujícími jadérky, často rhabdoidního vzhledu. „Granuloma-like“ struktury charakteristické pro „distální“ typ epitelooidního sarkomu jsou přítomny pouze zřídka. Imunohistochemicky je shodný s „distálním“ typem, v 1/2 případů je navíc pozitivita desminu. Diferenciálně diagnosticky je potřeba odlišit epitelooidní sarkom zejména od MPNST, melanomu, epitelooidního angiosarkomu, spinocelulárního karcinomu. Obtížnější diferenciální diagnostika zahrnuje odlišení od adnexitálních tumorů (stejná EMA, D2-40 pozitivita, ale p63 negativita a ztráta INI1 u epitelooidního sarkomu), synoviálního sarkomu (může být TLE1, EMA, CD99, cytokeratin pozitivita, včetně snížené exprese INI1). V těchto případech pomůže vyšetření FISH s t(X;18), maligních rhabdoidních tumorů (stejná pozitivita CA-125, ale negativita glypican-3 u epitelooidního sarkomu). Terapeuticky se doporučuje radikálnější lokální léčba než u ostatních sarkomů, tedy především primární amputace postižené končetiny nebo alespoň předoperační intraarteriální perfúze končetiny cytostatiky. Vzhledem k metastázám do lymfatických uzlin je i možnost biopsie sentinelové uzliny. Prognóza závisí především od pohlaví (ženy příznivější prognóza), lokalizace (proximální horší než distální), věku v době diagnózy (časnější věk – lepší prognóza), velikosti (> 2 cm s horší prognózou) a některých mikroskopických znacích (nekrózy, vaskulární invaze, mitotický index).

Literatura

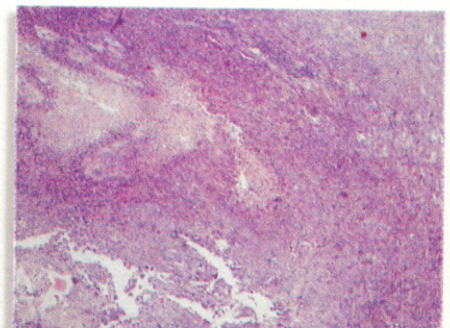
1. G. Karagounis, T. Argyrakos, G. Charkiolakis, O. Castana, D. Rontogianni: A Case of Distal Epithelioid Sarcoma of the Thumb Expressing Podoplanin, TLE1 and Ca 125. *Case Reports in Pathology* Volume 2013 (2013), Article ID 312786, 4 pages.
2. McPhee, M., McGrath, B.E., Zhang, P., Driscoll D., Gibbs, J. and Peimer, C: Soft Tissue Sarcomas of the Hand. *J of Hand Surgery*, 24A: 1001-1007, 1999.
3. Herr, M.J., Harmsen, S.H., Harmsen, W.S., Amadio, P.C. and Scully S.P: Epithelioid Sarcoma of the Hand. *Clinical Orthopedics and Related Research*, 431: 193-200, 2005.
4. Hornick et al.: Loss of INI1 expression is characteristic of both conventional and proximal type epithelioid sarcoma. *Am J of Surg Pathol*, 33(4):542-550, 2009.
5. Miettinen et al.: Epithelioid sarcoma: An immunohistochemical analysis of 112 classical and variant cases and a discussion of the differential diagnosis. *Human Pathology* Volume 30, Issue 8, Pages 934-942, Aug 1999.
6. Guillou L, Wadden C and Coindre J.M.: "Proximal-type" epithelioid sarcoma, a distinctive aggressive neoplasm showing rhabdoid features: clinicopathologic, immunohistochemical, and ultrastructural study of a series. *American Journal Surgical Pathology*, 21:130-146, 1997.



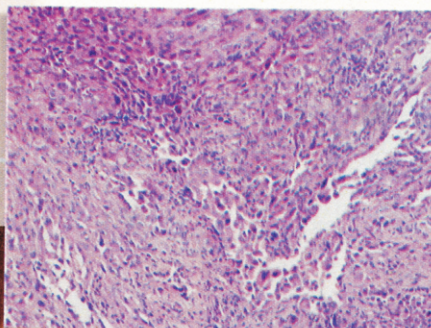
Obr. 1: Převážně větvenobuněčná komponenta epitelooidního sarkomu.



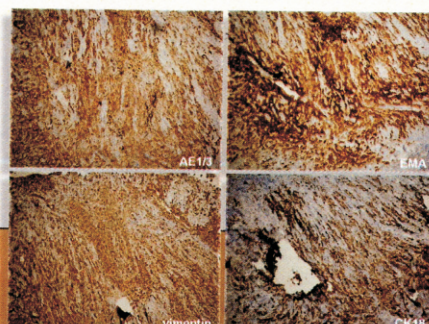
Obr. 2: Převážně epitelooidní komponenta epitelooidního sarkomu.



Obr. 3: Typická „pseudogranulomatózní“ proliferace nádorových buněk kolem centrální nekrotické zóny.



Obr. 4: „Pseudoangiosarkomatózní“ část tumoru vznikající desintegrací nádorových buněk.



Obr. 5: Některé pozitivní imunohistochemické markery u epitelooidního sarkomu (AE1/AE3, EMA, vimentin, CK18).

Význam hodnocení typu kostní invaze spinocelulárních karcinomů dutiny ústní, retrospektivní studie

J. Michálek¹, S. Brychtová¹, R. Pink², M. Liszoková³, M. Večerková³



¹ Ústav klinické a molekulární patologie FN Olomouc, LF UP v Olomouci

² Klinika ústní a čelistní chirurgie FN Olomouc, LF UP v Olomouci

³ Studentka 4. ročníku Zubního lékařství LF UP v Olomouci



Lékařská fakulta

Úvod

Spinocelulární karcinom je maligní nádor vycházející z krychlo dlaždicového epitelu, roste rychle a záhy metastazuje. Spinocelulární karcinomy dutiny ústní (obr. 1) vzhledem k intimnímu vztahu k čelistním kostem a poměrně rychlému růstu poměrně často invadují do kostní tkáně. Podle charakteru růstu se kostní invaze dělí na typ erozivní, infiltrativní a smíšený. Infiltrativní forma (obr. 2) je charakterizována tvorbou nepravidelných hnízd a výběžků nádorových buněk směrem do kosti, jejich penetrací do Haversova systému a přítomností reziduálních kostních ostrůvků uvnitř tumoru. Naopak pro erozivní formu (obr. 3) je typický ostrý přechod mezi tumorem a kostí, osteoklastická kostní resorpce, fibróza podél tumoru a absence kostních ostrůvků uvnitř nádoru. Smíšená forma kombinuje oba typy prorůstání.

Cíl

Cílem práce bylo porovnání typu kostní invaze s 5letým přežitím nemocných, se stupněm diferenciací nádoru a postižením regionálních lymfatických uzlin.

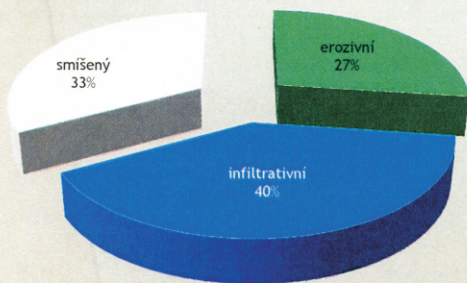
Materiál a metody

V souboru bylo zahrnuto 46 pacientů se spinocelulárními karcinomy dutiny ústní stádií pT1 až pT4, u kterých byla provedena resekce horní nebo dolní čelisti.



Obr. 1: Spinocelulární karcinom dutiny ústní - makroskopický pohled

Graf 1: Typ invaze spinocelulárního karcinomu do kosti

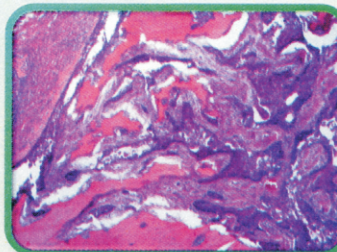


Výsledky

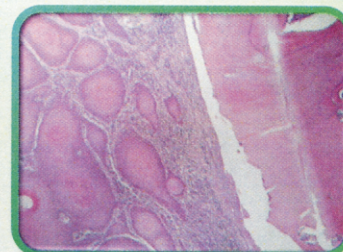
U 30 nemocných (65 %) byla prokázána kostní invaze, u 16 (35 %) nádor do kosti neprorůstal. Erozivní typ kostní invaze tvořil 27 % (8/30), infiltrativní 40 % (12/30) a smíšený 33 % (10/30) - graf 1. Prokázali jsme korelaci mezi typem invaze a nádorovým gradem. U erozivního typu kostní invaze tvořily karcinomy G1 50 %, G2+G3 50 %, u infiltrativního G1 17 %, G2+G3 83 % a u smíšeného G1 20 %, G2+G3 80 % - graf 2. Rozdíly v postižení regionálních lymfatických uzlin (pN1-pN2b) nebyly významné - erozivní typ: 50 % (4/8), infiltrativní typ 33 % (4/12), smíšený typ 40 % (4/10) - graf 3. Nebyla prokázána významná korelace mezi typem invaze a metastatickým postižením uzlin. Z hlediska pětiletého přežití pacientů se infiltrativní typ růstu nádoru do kosti ukázal jako rizikovější (5leté přežití 0 %), než erozivní (12 %) či smíšený typ (25 %) - graf 4.

Závěr

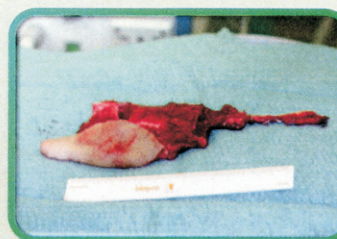
Ukázalo se, že typ invaze do kosti je nezávislý parameter spinocelulárního karcinomu dutiny ústní. Určitá korelace je mezi nádorovým gradem a typem kostní invaze, naopak postižení regionálních lymfatických uzlin je relativně nezávislé na typu kostní invaze a souvisí spíše se stupněm diferenciací nádoru (u G1 14 % metastáz, u G2 53 % metastáz, u G3 63 % metastáz). Z hlediska 5letého přežití má nejhorší prognózu infiltrativní typ, nicméně samotná invaze do kosti má špatnou prognózu u všech typů invaze (u všech více než 50 % úmrtnost do 5 let). Ukazuje se, že typ kostní invaze může být nezávislým prognostickým parametrem onemocnění a jeho hodnocení by mohlo pomoci ve volbě radikality chirurgického výkonu (obr. 4) a onkologické léčby.



Obr. 2: Infiltrativní typ invaze spinocelulárního karcinomu do kosti

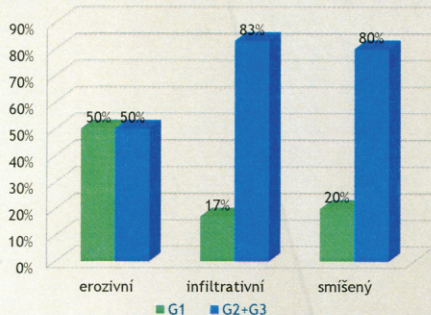


Obr. 3: Erozivní typ invaze spinocelulárního karcinomu do kosti

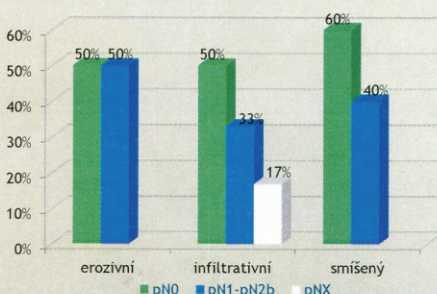


Obr. 4: Rekonstrukce resekované mandibuly volnou fibulou

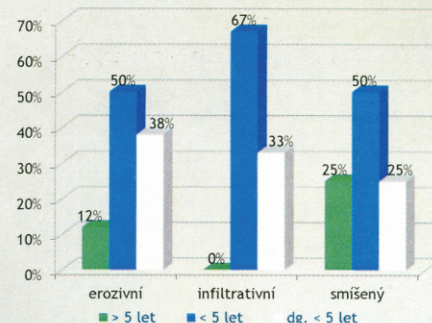
Graf 2: Typ invaze do kosti a nádorový grade



Graf 3: Typ invaze do kosti a postižení regionálních lymfatických uzlin



Graf 4: Typ invaze do kosti a 5leté přežití



9. Reference

1. El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ (Eds.). WHO Classification of Head and Neck Tumours (4th edition). IARC: Lyon 2017.
2. Institute of Health Information and Statistics of the Czech Republic: Cancer incidence in the Czech republic, 2016. Dostupné z: <http://www.uzis.cz/katalog/zdravotnicka-statistika/novotvary>
3. La Vecchia C, Bosetti C, Lucchini F, et al. Cancer mortality in Europe. 2000-2004 and an overview of trends since 1975. *Ann Oncology* 2010; 21(6): 1323-60.
4. Castellsagué X, Alemany L, Quer M, Halc G, Quirós B, et al. HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients. *J Natl Cancer Inst.* 2016; 108(6):djv403.
5. Laco J, Siegllová K, Vošmiková H, Dundr P, Němejcová K, et al. The presence of high-risk human papillomavirus (HPV) E6/E7 mRNA transcripts in a subset of sinonasal carcinomas is evidence of involvement of HPV in its etiopathogenesis. *Virchows Arch.* 2015; 467(4):405-15.
6. Sadetzki S, Chetrit A, Jarus-Hakak A, et al. Cellular phone use and risk of benign and malignant parotis gland tumors. *Am J Epidemiol.* 2008; 167(4):457-67.
7. Wong RJ, Keel SB, Glynn RJ et al. Histological pattern of mandibular invasion by oral squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* 2000; 110: 65-72.
8. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncology* 2009; 45: 309-316.
9. Jimi E, Furuta H, Matsuo K et al. The cellular and molecular mechanisms of bone invasion by oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis* 2011; 17(5): 462-468.
10. Ord RA, Sarmadi M, Papadimitrou J. A comparison of segmental and marginal bony resection for oral squamous cell carcinoma involving the mandible. *J Oral Maxillofac Surg* 1997; 55(5): 470-477.
11. Sehnal B, Podlešák T, Kmoníčková E et al. Anogenital HPV Infection as the Potential Risk Factor for Oropharyngeal Carcinoma. *Klin Onkol* 2018; 31(2): 103-109.
12. Slávik M, Kazda T, Selingerová I et al. Effect of Tumor Size and p16 Status on Treatment Outcomes – Achievement of Complete Remission in Prospectively Followed Patients with Oropharyngeal Tumors. *Klin Onkol* 2019; 32(1): 58-65.

13. Mello FW, Miguel AFP, Dutra KL, Porporatti AL, Warnakulasuriya S, et al. Prevalence of oral potentially malignant disorders: A systematic review and meta-analysis. *J Oral Pathol Med.* 2018; 47(7):633-640.
14. Villa A, Celentano A, Glurich I, Borgnakke WS, Jensen SB, et al. World Workshop on Oral Medicine VII: Prognostic biomarkers in oral leukoplakia: A systematic review of longitudinal studies. *Oral Dis.* 2019; 25 Suppl 1:64-78.
15. Wu W, Wang Z, Zhou Z. Role of the human papillomavirus in malignant transformation of oral leukoplakia distinct from oropharyngeal squamous cell carcinoma: A study of 76 patients with internal-control specimens. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2019 Jan 19. pii: S2212-4403(19)30008-2.
16. Warnakulasuriya S. White, red, and mixed lesions of oral mucosa: A clinicopathologic approach to diagnosis. *Periodontol 2000.* 2019 Jun; 80(1):89-104.
17. Mishra M, Mohanty J, Sengupta S, Tripathy S. Epidemiological and clinicopathological study of oral leukoplakia. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2005 May-Jun;71(3): 161-5.
18. Porter S, Gueiros LA, Leão JC, Fedele S. Risk factors and etiopathogenesis of potentially premalignant oral epithelial lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2018 Jun; 125(6):603-611.
19. Willam B. Reed, M.D. Erythroplasia of Queyrat. Report of a Case with Recurrence After Cessation of Topical Hydrocortisone. *AMA Arch Derm.* 1959;79(5):587-589.
20. McNamara KK, Kalmar JR. Erythematous and Vascular Oral Mucosal Lesions: A Clinicopathologic Review of Red Entities. *Head Neck Pathol.* 2019 Mar;13(1):4-15.
21. Woolgar JA. Histopathological prognosticators in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2006; 42(3): 229-239.
22. Sundermann BV, Uhlmann L, Hoffmann J, Freier K, Thiele OC. The localization and risk factors of squamous cell carcinoma in the oral cavity: A retrospective study of 1501 cases. *J Craniomaxillofac Surg.* 2018; 46(2):177-182.
23. Ildstad ST, Bigelow ME, Remensnyder JP. Squamous cell carcinoma of the tongue: a comparison of the anterior two-thirds with its base. *Am J Surg* 1983; 146:456–61.
24. Shaw RJ, McGlashan G, Woolgar JA, Lowe D, Brown JS, Vaughan ED, Rogers SN. Prognostic importance of site in squamous cell carcinoma of the buccal mucosa. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2009; 47(5):356-9.

25. de Araújo RF Jr, Barboza CA, Clebis NK, de Moura SA, Lopes Costa Ade L. Prognostic significance of the anatomical location and TNM clinical classification in oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2008 Jun 1; 13(6): E344-7.
26. Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C. *TNM Classification of Malignant Tumours*. 8th Edition. Wiley Blackwell; 2017.
27. Mohit-Tabatabai MA, Sobel HJ, Rush BF, Mashberg A. Relation of thickness of floor of mouth stage I and II cancers to regional metastasis. *Am J Surg* 1986; 152:351–3.
28. Urist MM, O'Brien CJ, Soong SJ, Visscher DW, Maddox WA. Squamous cell carcinoma of the buccal mucosa: analysis of prognostic factors. *Am J Surg* 1987; 154:411–4.
29. Broders AC. Squamous cell epithelioma of the lip; a study of five hundred and thirty seven cases. *JAMA* 1920; 74:656–64.
30. Pindborg JJ, Reichart PA, Smith CJ, van der Waal I. World Health Organisation histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa. 2nd ed. New York: Springer;1997.
31. Po Wing Yuen A, Lam KY, Lam LK, Ho CM, Wong A, Chow TL, et al. Prognostic factors of clinically stage I and II oral tongue carcinoma—a comparative study of stage, thickness, shape, growth pattern, invasive front malignancy grading, Martinez-Gimenco score, and pathologic features. *Head Neck* 2002; 24:513–20.
32. Thomas B, Stedman M, Davies L. Grade as a prognostic factor in oral squamous cell carcinoma: a population-based analysis of the data. *Laryngoscope*. 2014 Mar; 124(3):688-94.
33. Akhter M, Hossain S, Rahman QB, Molla MR. A study on histological grading of oral squamous cell carcinoma and its co-relationship with regional metastasis. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2011; 15(2):168–176.
34. Anneroth G, Batsakis J, Luna M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. *Scand J Dent Res*. 1987; 95(3): 229-49.
35. Liebig C, Ayala G, Wilks JA, Berger DH, Albo D. Perineural invasion in cancer: a review of the literature. *Cancer* 2009;115(15): 3379-91.

36. Vural E, Hutcheson J, Korourian S, Kechelava S, Hanna E. Correlation of neural cell adhesion molecule with perineural spread of squamous cell carcinoma of head and neck. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2000; 122:717–20.
37. Fagan J, Collins B, Barnes L. Perineural invasion in squamous cell carcinoma of head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1998; 124:637–40.
38. O'Brien CJ, Lahr CJ, Soong SJ, Gandour MJ, Jones JM, Urist MM, Maddox WA. Surgical treatment of early-stage carcinoma of the oral tongue--wound adjuvant treatment be beneficial? *Head Neck Surg* 1986; 8(6): 401-8.
39. Soo KC, Carter RL, O'Brien CJ, Barr L, Bliss JM, Shaw HJ. Prognostic implications of perineural spread in squamous carcinomas of the head and neck. *Laryngoscope* 1986; 96(10): 1145-8.
40. Kurtz KA, Hoffman HT, Zimmerman MB, Robinson RA. Perineural and vascular invasion in oral cavity squamous carcinoma: increased incidence on re-review of slides and by using immunohistochemical enhancement. *Arch Pathol Lab Med* 2005; 129(3): 354-359.
41. Binmadi NO, Basile JR. Perineural invasion in oral squamous cell carcinoma: a discussion of significance and review of the literature. *Oral Oncol* 2011; 47(11): 1005-10.
42. Jardim JF, Francisco AL, Gondak R, Damascena A, Kowalski LP. Prognostic impact of perineural invasion and lymphovascular invasion in advanced stage oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2015; 44(1): 23-8.
43. Chatzistefanou I, Lubek J, Markou K, Ord RA. The role of perineural invasion in treatment decisions for oral cancer patients: A review of the literature. *J Craniomaxillofac Surg* 2017; 45(6): 821-5.
44. Rahima B, Shingaki S, Nagata M, Saito C. Prognostic significance of perineural invasion in oral and oropharyngeal carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 97(4): 423-31.
45. Gil Z, Carlson DL, Gupta A, Lee N, Hoppe B, Shah JP, Kraus DH. Patterns and incidence of neural invasion in patients with cancers of the paranasal sinuses. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2009; 135(2): 173-9.
46. Chen W, Zhang HL, Shao XJ, Jiang YG, Zhao XG, Gao X, Li JH, Yang J, Zhang YF, Liu BL, Sun MY. Gene expression profile of salivary adenoid cystic carcinoma associated with perineural invasion. *Tohoku J Exp Med* 2007; 212(3): 319-34.

47. Caldemeyer KS, Mathews VP, Righi PD, Smith RR. Imaging features and clinical significance of perineural spread or extension of head and neck tumors. *Radiographics* 1998; 18(1): 97-110; quiz 147.
48. Sullivan LM, Smee R. Leptomeningeal carcinomatosis from perineural invasion of a lip squamous cell carcinoma. *Australas Radiol* 2006;50(3):262-6.
49. Larsen SR, Johansen J, Sorensen JA, Krogdahl A. The prognostic significance of histological features in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2009;38: 657-62.
50. Aller MA, Arias JI, Arias J. Pathological axes of wound repair: gastrulation revisited. *Theor Biol Med Model* 2010;7:37.
51. Wang L, Sun M, Jiang Y, Yang L, Lei D, Lu C, Zhao Y, Zhang P, Yang Y, Li J. Nerve growth factor and tyrosine kinase A in human salivary adenoid cystic carcinoma: expression patterns and effects on in vitro invasive behavior. *J Oral Maxillofac Surg* 2006;64(4):636-41.
52. Ayala GE, Dai H, Powell M, Li R, Ding Y, Wheeler TM, Shine D, Kadmon D, Thompson T, Miles BJ, Ittmann MM, Rowley D. Cancer-related axonogenesis and neurogenesis in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14(23):7593-603.
53. Wong CY, Helm MA, Kalb RE, Helm TN, Zeitouni NC. The presentation, pathology, and current management strategies of cutaneous metastasis. *North Am J Med Sci.* 2013; 5:499–504.
54. Cole RD, McGuirt WF. Prognostic significance of skin involvement for mucosal tumors of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1995; 121:1246–8.
55. Kao GF, Graham JH, Helwig EB. Carcinoma cuniculatum (verrucous carcinoma of the skin): a clinicopathologic study of 46 cases with ultrastructural observations. *Cancer* 1982; 49:2395–403.
56. Napier SS, Gormley JS, Newlands C. Adenosquamous carcinoma. A rare neoplasm with an aggressive course. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1995; 79:607–11.
57. Wieneke JA, Heffner DK. Basaloid squamous cell carcinoma: an aggressive variant of squamous cell carcinoma of the head and neck region. *Pathol Case Rev* 2000; 5: 200–5.
58. Iqbal MS, Paleri V, Brown J, et al. Spindle cell carcinoma of the head and neck region: treatment and outcomes of 15 patients. *Ecancermedicalsecience.* 2015; 9:594.
59. Pathak J, Swain N, Patel S, Poonja L. Histopathological variants of oral squamous cell carcinoma-institutional case reports. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2014;18(1):143–145.

60. Thompson LD. Squamous cell carcinoma variants of the head and neck. *Curr Diagn Pathol*. 2003; 9:384–96.
61. Koch BB, Trask DK, Hoffman HT, Karnell LH, Robinson RA, Zhen W, et al. National survey of head and neck verrucous carcinoma: Patterns of presentation, care, and outcome. *Cancer*. 2001; 92:110–20.
62. Viswanathan S, Rahman K, Pallavi S, Sachin J, Patil A, Chaturvedi P, et al. Sarcomatoid (spindle cell) carcinoma of the head and neck mucosal region: A clinicopathologic review of 103 cases from a tertiary referral cancer centre. *Head Neck Pathol*. 2010; 4:265–75.
63. Thompson LD, Wenig BM, Heffner DK, Gnepp DR. Exophytic and papillary squamous cell carcinomas of the larynx: A clinicopathologic series of 104 cases. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1999; 120:718–24.
64. Gupta B, Bhattacharyya A, Singh A, Sah K, Gupta V. Basaloid squamous cell carcinoma - A rare and aggressive variant of squamous cell carcinoma: A case report and review of literature. *Natl J Maxillofac Surg*. 2018;9(1):64–68.
65. Bavle RM, Govinda G, Venkataramanaiah PG, Muniswamappa S, Venugopal R. Fallacious Carcinoma- Spindle Cell Variant of Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Diagn Res*. 2016; 10(7):ZD05–ZD8.
66. Schick U, Pusztaszeri M, Betz M, Ghadjar P, Demiroz C, Kaanders JH, et al. Adenosquamous carcinoma of the head and neck: Report of 20 cases and review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2013; 116:313–20.
67. Franklyn J, Janakiraman R, Tirkey AJ, Thankachan C, Muthusami J. Oral Verrucous Carcinoma: Ten Year Experience from a Tertiary Care Hospital in India. *Indian J Med Paediatr Oncol*. 2017;38(4):452–455.
68. Mardi K, Singh N. Acantholytic squamous cell carcinoma of the oral cavity: A rare entity. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2014;18(Suppl 1):S128–S130.
69. Shah AA, Jeffus SK, Stelow EB. Squamous Cell Carcinoma Variants of the Upper Aerodigestive Tract. *Arch Pathol Lab Med*. 2014; 138:731–744.
70. Johnson RE, Sigman JD, Funk GF. Quantification of surgical margin shrinkage in the oral cavity. *Head Neck* 1997; 19:281–6.
71. Helliwell T, Woolgar JA. Standards and minimum datasets for reporting common cancers. Minimum dataset for head and neck carcinoma histopathology reports. The Royal College of Pathologists, London, 1988.

72. Sutton DN, Brown JS, Rogers SN, Vaughan ED, Woolgar JA. The prognostic implications of the surgical margin in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2003; 32:30–4.
73. Loree TR, Strong EW. Significance of positive margins in oral cavity squamous carcinoma. *Am J Surg* 1990; 160:410–4.
74. Scholl P, Byers RM, Batsakis JG, Wolf P, Santini H. Microscopic cut-through of cancer in the surgical treatment of carcinoma of the tongue. Prognostic and therapeutic implications. *Am J Surg* 1986; 152:354–60.
75. Brennan JA, Mao L, Hruban RH, Boyle JO, Eby YJ, Koch WM, et al. Molecular assessment of histopathological staging in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*. 1995; 332:429–35.
76. Ball VA, Righi PD, Tejada E, Radpour S, Pavelic ZP, Gluckman JL, et al. P53 immunostaining of surgical margins as a predictor of local recurrence in squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *Ear Nose Throat J*. 1997; 76:818–23.
77. Shaw RJ, Hobkirk AJ, Nikolaidis G, Woolgar JA, Triantafyllou A, Brown JS, et al. Molecular staging of surgical margins in oral squamous cell carcinoma using promoter methylation of p16(INK4A), cytoglobin, E-cadherin, and TMEFF2. *Ann Surg Oncol*. 2013; 20:2796–802.
78. Franklin S, Pho T, Abreo FW, Nassar R, De Benedetti A, Stucker FJ, et al. Detection of the proto-oncogene eIF4E in larynx and hypopharynx cancers. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1999; 125:177–82.
79. Mamelle G, Pampurik J, Luboinski B, Lancar R, Lusinchi A, Bosq J. Lymph node prognostic factors in head and neck squamous cell carcinomas. *Am J Surg*. 1994; 168:494–8.
80. Woolgar JA, Rogers S, West CR, Errington RD, Brown JS, Vaughan ED. Survival and patterns of recurrence in 200 oral cancer patients treated by radical surgery and neck dissection. *Oral Oncol* 1999;35: 257–65.
81. Pinsolle J, Pinsolle V, Majoufre C, Duroux S, Demeaux H. Prognostic value of histologic findings in neck dissections for squamous cell carcinoma. *Arch Otolargol Head Neck Surg* 1997; 123:145–8.
82. Greenberg JS, Fowler R, Gomez J, Mo V, Roberts D, El Naggar AK, et al. Extent of extracapsular spread. A critical prognosticator in oral tongue cancer. *Cancer* 2003; 97:1464–70.

83. Shah J, Lydiatt WM: Buccal mucosa, alveolus, retromolar trigone, floor of mouth, hard palate and tongue tumors. In: Thawley SE, ed. *Comprehensive Management of Head and Neck Tumors*. 2nd. edn. WB Saunders: Philadelphia, 1999, pp. 686-693.
84. Totsuka Y et al. Mandibular Involvement by Squamous Cell Carcinoma of the Lower Alveolus: Analysis and Comparative Study of Histologic and Radiologic Features. *Head Neck* 13 (1), 40-50. Jan-Feb 1991.
85. Slootweg PJ, Müller H: Mandibular invasion by oral squamous cell carcinoma. *J Craniomaxillofac Surg*. 1989 Feb;17(2):69-74.
86. Carter RL, Tsao SW, Burman JF, Pittam MR, Clifford P, Shaw HJ: Patterns and mechanisms of bone invasion by squamous carcinomas of the head and neck. *Am J Surg*. 1983 Oct;146(4):451-5.
87. Charles JF, Aliprantis AO. Osteoclasts: more than 'bone eaters'. *Trends Mol Med* 2014; 20(8): 449-59.
88. Crockett JC, Rogers MJ, Coxon FP, Hocking LJ, Helfrich MH. Bone remodelling at a glance. *J Cell Sci* 2011;124(Pt 7):991-8.
89. Dougall WC. RANKL signaling in bone physiology and cancer. *Curr Opin Support Palliat Care* 2007; 1:317-22.
90. Martin CK, Dirksen WP, Shu ST, Werbeck JL, Thudi NK, Yamaguchi M, et al. Characterization of bone resorption in novel in vitro and in vivo models of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2012;48(6):491-9.
91. Takayama Y, Mori T, Nomura T, Shibahara T, Sakamoto M. Parathyroid-related protein plays a critical role in bone invasion by oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 2010;36(6):1387-94.
92. Teixeira LN, de Castro Raucci LMS, Alonso GC, Coletta RD, Rosa AL, de Oliveira PT. Osteopontin expression in co-cultures of human squamous cell carcinoma-derived cells and osteoblastic cells and its effects on the neoplastic cell phenotype and osteoclastic activation. *Tumour Biol* 2016;37(9):12371-85.
93. Weidle UH, Birzele F, Kollmorgen G, Rürger R. Molecular mechanisms of bone metastasis. *Cancer Genomics Proteomics* 2016;13(1):1-12.
94. Subarnbhesaj A, Miyauchi M, Chanbora C, Mikuriya A, Nguyen PT, Furusho H, Ayuningtyas NF, Fujita M, Toratani S, Takechi M, Niida S, Takata T. Roles of VEGF-Flt-1 signaling in malignant behaviors of oral squamous cell carcinoma. *PLoS One* 2017;12(11).

95. Morisawa A, Okui T, Shimo T, Ibaragi S, Okusha Y, Ono M, Nguyen TTH, Hassan NMM, Sasaki A. Ammonium tetrathiomolybdate enhances the antitumor effects of cetuximab via the suppression of osteoclastogenesis in head and neck squamous carcinoma. *Int J Oncol* 2018;52(3):989-999.
96. Tada T, Jimi E, Okamoto M, Ozeki S, Okabe K. Oral squamous cell carcinoma cells induce osteoclast differentiation by suppression of osteoprotegerin expression in osteoblasts. *Int J Cancer* 2005;116(2):253-62.
97. Cui N, Nomura T, Takano N, Wang E, Zhang W, Onda T, et al. Osteoclast-related cytokines from biopsy specimens predict mandibular invasion by oral squamous cell carcinoma. *Exp Ther Med* 2010; 1:755-60.
98. Elmusrati AA, Pilborough AE, Khurram SA, Lambert DW. Cancer-associated fibroblasts promote bone invasion in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2017;117(6):867-875.
99. Kayamori K, Sakamoto K, Nakashima T, Takayanagi H, Morita K, Omura K, Nguyen ST, Miki Y, Iimura T, Himeno A, Akashi T, Yamada-Okabe H, Ogata E, Yamaguchi A. Roles of interleukin-6 and parathyroid hormone-related peptide in osteoclast formation associated with oral cancers: significance of interleukin-6 synthesized by stromal cells in response to cancer cells. *Am J Pathol* 2010;176(2):968-80.
100. Shibahara T, Nomura T, Cui N-H, Noma H. A study of osteoclast-related cytokines in mandibular invasion by squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2005; 34:789-93.
101. Caja F, Vannucci L. TGF β : a player on multiple fronts in the tumor microenvironment. *J Immunotoxicol* 2015;12(3):300-7.
102. Thiery JP, Lim CT. Tumor dissemination: an EMT affair. *Cancer Cell* 2013;23(3): 272-3.
103. Ozaki-Honda Y, Seki S, Fujiwara M, Matsuura M, Fujita S, Ikeda H, Umeda M, Ayuse T, Ikeda T. Prognostic Prediction of Oral Squamous Cell Carcinoma by E-Cadherin and N-Cadherin Expression in Overall Cells in Tumor Nests or Tumor Cells at the Invasive Front. *Cancer Microenviron* 2017;10(1-3):87-94.
104. Qiao B, Johnson NW, Gao J. Epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma triggered by transforming growth factor beta-1 is Snail family-dependent and correlates with matrix metalloproteinase-2 and -9 expressions. *Int J Oncol* 2010; 37:663-8.

107. Quan J, Du Q, Hou Y, Wang Z, Zhang J. Utilization of E-cadherin by monocytes from tumour cells plays key roles in the progression of bone invasion by oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2017;38(2):850-858.
108. Vousden KH, Prives C. Blinded by the light: The growing complexity of p53. *Cell* 2009; 137: 413–431.
109. Ang HC, Joerger AC, Mayer S, Fersht AR. Effects of common cancer mutations on stability and DNA binding of full-length p53 compared with isolated core domains. *J Biol Chem* 2006; 281: 21934–21941.
110. Belyi VA, Levine AJ. One billion years of p53/p63/p73 evolution. *Proc Natl Acad Sci* 2009; 106: 17609–17610.
111. Chan WM, Siu WY, Lau A, Poon RY. How many mutant p53 molecules are needed to inactivate a tetramer? *Mol Cell Biol* 2004; 24: 3536–3551.
112. Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 1989; 57(7): 1083-1093.
113. Vazquez A, Bond EE, Levine AJ, Bond GL. The genetics of the p53 pathway, apoptosis and cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7(12): 979-987.
114. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997; 88(3): 323-331.
115. Li Y, Zhang J. Expression of mutant p53 in oral squamous cell carcinoma is correlated with the effectiveness of intra-arterial chemotherapy. *Oncol Lett.* 2015; 10(5): 2883–2887.
116. Bykov VJ, Wiman KG. Mutant p53 reactivation by small molecules makes its way to the clinic. *FEBS Lett.* 2014; 588: 2622–2627.
117. Ghanghoria S , Ghanghoria A , Shukla A. p53 Expression in Oral cancer: A study of 50 cases. *Journal of Pathology of Nepal* 2015; 5: 747-751.
118. Patel KR , Vajaria BN , Singh RD , Begum R , Patel PS. Clinical implications of p53 alterations in oral cancer progression: a review from India. *Exp Oncol.* 2018; 40(1): 10-18.
119. Singh RD, Patel KR, Patel PS. p53 mutation spectrum and its role in prognosis of oral cancer patients: A study from Gujarat, West India. *Mut Res* 2016; 783: 15-26.
120. Carlos de Vicente J, Junquera Gutiérrez LM, Zapatero AH, Fresno Forcelledo MF, Hernández-Vallejo G, López Arranz JS. Prognostic significance of p53 expression

- in oral squamous cell carcinoma without neck node metastases. *Head Neck*. 2004; 26(1): 22-30.
121. Sittel C, Ruiz S, Volling P, Kvasnicka HM, Jungehülsing M, Eckel HE. Prognostic significance of Ki-67 (MIB1), PCNA and p53 in cancer of the oropharynx and oral cavity. *Oral Oncol*. 1999; 35(6): 583-9.
 122. Zhang YY, Sun CF, Peng J. Expression of CD31, CD34 and CD105 in squamous cell carcinoma of tongue and their relationships with lymph node metastasis. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2008; 26(2): 201-5.
 123. Kathuriya PT, Bartake AR, Palaskar SJ, Narang BR, Patil SS, Pawar RB. CD34 and Mast Cell Analysis in Normal Oral Mucosa and Different Grades of Oral Squamous Cell Carcinoma: A Comparative Study. *J Clin Diagn Res*. 2015; 9(7): ZC61–ZC64.
 124. Kademani D, Lewis JT, Lamb DH, Rallis DJ, Harrington JR. Angiogenesis and CD34 expression as a predictor of recurrence in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009; 67(9): 1800-5.
 125. Khalili M, Mahdavi N, Beheshti R, Baghai Naini F. Immunohistochemical Evaluation of Angiogenesis and Cell Proliferation in Tongue Squamous Cell Carcinoma. *J Dent (Tehran)*. 2015; 12(11): 846–852.
 126. Hasina R, Lingen MW. Angiogenesis in oral cancer. *J Dent Educ*. 2001; 65(11): 1282-90.
 127. Ascani G, Balercia P, Messi M, et al. Angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Acta Otorhinolaryngol Ital*. 2005; 25(1): 13–17.
 128. Codecà C, Ferrari D, Bertuzzi C, Broggio F, Crepaldi F, Foa P. Angiogenesis in Head and Neck Cancer: A Review of the Literature. *Journal of Oncology* 2012; 2012 (9).
 129. Ingaleshwar PS, Pandit S, Desai D, Redder CP, Shetty AS, Mithun KM. Immunohistochemical analysis of angiogenesis by CD34 and mast cells by toluidine blue in different grades of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2016;20(3): 467-473.
 130. Shahsavari F, Farhadi S, Sadri D, Sedehi M. Evaluation of Microvascularity by CD34 Expression in Esophagus and Oral Squamous Cell Carcinoma. *J Contemp Dent Pract*. 2015; 16(6): 458-62.
 131. Bunget A, Fronie A, Afrem E, Corlan Puşcu D, Manolea H, Dan AR, Coman M, Nimigean VR. Microscopic aspects of angiogenesis and lymphangiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Rom J Morphol Embryol*. 2013; 54(3): 623-7.

132. Gonzalez-Moles MA, Ruiz-Avila I, Gil-Montoya JA, Esteban F, Bravo M. Analysis of Ki-67 expression in oral squamous cell carcinoma: why Ki-67 is not a prognostic indicator. *Oral Oncol.* 2010; 46(7): 525-30.
133. Xie S, Liu Y, Qiao X, et al. What is the Prognostic Significance of Ki-67 Positivity in Oral Squamous Cell Carcinoma?. *J Cancer.* 2016;7(7):758–767.
134. Guimarães EP, de Carli ML, Sperandio FF, Hanemann JA, Pereira AA. Cyclin D1 and Ki-67 expression correlates to tumor staging in tongue squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2015; 20(6): e657–e663.
135. Lopes VKM, Jesus AS, Souza LL, Miyahara LAN, Guimarães DM, Pontes HAR, Pontes FSC, Carvalho P. Ki-67 protein predicts survival in oral squamous carcinoma cells: an immunohistochemical study. *Braz Oral Res.* 2017; 31: e66.
136. Humayun S, Prasad VR. Expression of p53 protein and ki-67 antigen in oral premalignant lesions and oral squamous cell carcinomas: An immunohistochemical study. *Natl J Maxillofac Surg.* 2011; 2(1): 38–46.
137. Chatzkel J, Lewis JS Jr, Ley JC, et al. Correlation of Ki-67 Proliferative Antigen Expression and Tumor Response to Induction Chemotherapy Containing Cell Cycle-Specific Agents in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Head Neck Pathol.;* 11(3): 338–345.
138. Matsumoto M, Komiyama K, Okaue M, Shimoyama Y, Iwakami K, Namaki S, Tanaka H, Moro I, Sato H. Predicting tumor metastasis in patients with oral cancer by means of the proliferation marker Ki67. *J Oral Sci.* 1999; 41(2): 53-6.
139. Jing Y, Zhou Q, Zhu H, Zhang Y, Song Y, Zhang X, Huang X, Yang Y, Ni Y, Hu Q. Ki-67 is an independent prognostic marker for the recurrence and relapse of oral squamous cell carcinoma. *Oncol Lett.* 2019; 17(1): 974-980.
140. Wangsa D, Ryott M, Avall-Lundqvist E, et al. Ki-67 expression predicts locoregional recurrence in stage I oral tongue carcinoma. *Br J Cancer.* 2008; 99(7): 1121–1128.
141. Costa V, Kowalski LP, Coutinho-Camillo CM, Begnami MD, Calsavara VF, Neves JI, Kaminagakura E. EGFR amplification and expression in oral squamous cell carcinoma in young adults. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2018; 47(7): 817-823.
142. Kimura I, Kitahara H, Ooi K, et al. Loss of epidermal growth factor receptor expression in oral squamous cell carcinoma is associated with invasiveness and epithelial-mesenchymal transition. *Oncol Lett.* 2016; 11(1): 201–207.

143. Chen IH, Chang JT, Liao CT, Wang HM, Hsieh LL, Cheng AJ. Prognostic significance of EGFR and Her-2 in oral cavity cancer in betel quid prevalent area cancer prognosis. *Br J Cancer*. 2003; 89(4): 681-6.
144. Frohwitter G, Buerger H, VAN Diest PJ, Korsching E, Kleinheinz J, Fillies T. Cytokeratin and protein expression patterns in squamous cell carcinoma of the oral cavity provide evidence for two distinct pathogenetic pathways. *Oncol Lett*. 2016; 12(1): 107-113.
145. Ritchie JM, Smith EM, Summersgill KF, Hoffman HT, Wang D, Klussmann JP, Turek LP, Haugen TH. Human papillomavirus infection as a prognostic factor in carcinomas of the oral cavity and oropharynx. *Int J Cancer*. 2003 Apr 10; 104(3): 336-44.
146. Lill C, Bachtiry B, Selzer E, Mittlboeck M, Thurnher D. A 5-year update of patients with HPV positive versus negative oropharyngeal cancer after radiochemotherapy in Austria. *Wien Klin Wochenschr*. 2017; 129(11-12): 398–403.
147. Candotto V, Lauritano D, Nardone M, et al. HPV infection in the oral cavity: epidemiology, clinical manifestations and relationship with oral cancer. *Oral Implantol (Rome)*. 2017; 10(3): 209–220.
148. Kim SM. Human papilloma virus in oral cancer. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg*. 2016; 42(6): 327–336.
149. Sathish N, Wang X, Yuan Y. Human Papillomavirus (HPV)-associated Oral Cancers and Treatment Strategies. *J Dent Res*. 2014; 93(7 Suppl): 29S–36S.
150. Hübbers CU, Akgül B. HPV and cancer of the oral cavity. *Virulence*.; 6(3):244–248.
151. Gupta S, Gupta S. Role of human papillomavirus in oral squamous cell carcinoma and oral potentially malignant disorders: A review of the literature. *Indian J Dent*. 2015; 6(2): 91–98.
152. Kobayashi K, Hisamatsu K, Suzui N, Hara A, Tomita H, Miyazaki T. A Review of HPV-Related Head and Neck Cancer. *J Clin Med*. 2018; 7(9): 241.
153. Shah JP, Gil Z. Current concepts in management of oral cancer-surgery. *Oral Oncol* 2009; 45(4-5): 394-401.
154. Shah AK. Postoperative pathologic assessment of surgical margins in oral cancer: A contemporary review. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2018; 22(1): 78–85.
155. Zhu Q, Tian G, Gao J. Construction of prognostic risk prediction model of oral squamous cell carcinoma based on co-methylated genes. *Int J Mol Med*. 2019, Jun 13. [Epub ahead of print]

156. Almela T, Al-Sahaf S, Brook IM, Khoshroo K, Rasoulianboroujeni M, Fahimipour F, Tahriri M, Dashtimoghadam E, Bolt R, Tayebi L, Moharamzadeh K. 3D printed tissue engineered model for bone invasion of oral cancer. *Tissue Cell* 2018;52:71-77.