

ЭТИОЛОГИЧЕСКИЕ И ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПЛЕОМОРФНЫХ АДЕНОМ СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ

В.А. Маланчук¹, И.С.Бродецкий¹, М.С. Кротевиц²

¹Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца

²Национальный институт Рака

г. Киев, Украина

E-mail: i2g3o4@bigmir.net

Резюме. Целью наших исследований является определение этиологических и диагностических иммуногистохимических показателей плеоморфных аденом слюнных желез. Иммуногистохимическое исследование было проведено на материале 20 эксцизионных биопсий пациентов с плеоморфными аденомами слюнных желез. Анализ полученных данных показал, что околоушная железа была одной из наиболее распространенных локализаций среди пациентов с плеоморфными аденомами. Среди вирусных агентов преобладали - вирус папилломы человека 16 типа и Эпштейн-Барр вирус, что соответствовало 16 (80 %) и 6 (30 %) случаям. Среди гормонов распределение было следующее: эстроген и прогестерон по – 2 (10 %) случая соответственно. Плаг 1 имел наивысшую экспрессию в околоушной железе – 18 (90 %) случаев. Анализы иммуногистохимических исследований этиологических и диагностических показателей плеоморфных аденом слюнных желез выявили экспрессию 5 маркеров – ВПЧ 16 типа, ЭБВ, эстрогена, прогестерона, Плаг 1.

Ключевые слова: опухоли слюнных желез, плеоморфная аденома, иммуногистохимия, эстроген, прогестерон, вирус папилломы человека (ВПЧ) 16 типа, Эпштейн-Барр вирус (ЭБВ), Плаг 1.

ETIOLOGICAL AND DIAGNOSTIC IMMUNOHISTOCHEMICAL INDICES OF PLEOMORPHIC ADENOMAS OF SALIVARY GLANDS

V.O. Malanchuk¹, I.S. Brodetskyi¹, M.S. Krotevych²

¹Bogomolets national medical university

²National Cancer Institute

Kyiv, Ukraine

Resume. The purpose of the research was to determine etiological and diagnostic immunohistochemical indices of pleomorphic adenomas of the salivary glands. The immunohistochemical study was conducted based on excisional biopsies of

pleomorphic adenomas of the salivary glands in 20 patients. The analyses of the research showed that the parotid salivary gland was affected in most of the patients with pleomorphic adenomas. Among the viruses that were present – 16 (80%) patients had human papillomavirus type 16 (HPV type 16), and 6 (30%) patients had the Epstein–Barr virus (EBV) dominating. Among the hormones, the distribution was as follows: oestrogen and progesterone in 2 (10%) cases, respectively. PLAG1 had the highest expression in the parotid salivary gland tissues – 18 (90%) cases. The analyses of the immunohistochemical research of the etiological and diagnostic indices of pleomorphic adenomas of the salivary glands showed the expression of 5 markers – HPV type 16, EBV, estrogen, progesterone, Plag 1.

Keywords: salivary gland tumours, pleomorphic adenoma, immunohistochemistry, oestrogen, progesterone, human papillomavirus type 16, Epstein-Barr virus, PLAG1.

Введение

Диагностические методы занимают одно из ключевых мест в современной медицине. Они позволяют уточнить клинический диагноз, подобрать оптимальный метод лечения и провести профилактические мероприятия [1]. Среди наиболее известных - рентгенографические (КТ и МРТ с контрастом и без, сцинтиграфические исследования), ультразвуковые (ультрасонография), разновидности биопсий (инцизионная, эксцизионная, прицизионная, пункционная), иммунологические, гистологические, иммуногистохимические [2]. Каждый из перечисленных методов используется для диагностики различных новообразований человека, в том числе опухолей слюнных желез. Они составляют от 1 до 5% от всех новообразований человека [3]. Среди наиболее распространенных доброкачественных опухолей слюнных желез выделяют - плеоморфную аденому (61-90%) [4].

Клинические особенности плеоморфных аденом достаточно изучены, и не представляют особой сложности для профильных специалистов при установлении предварительного кли-

нического диагноза. Однако вопросы этиологии, морфологической и иммуногистохимической верификации этой нозологии постоянно дискутируются и дополняются новыми данными.

Влияние вирусной инфекции на развитие различных видов опухолей и их эндокринная зависимость уже достаточно изучена. Так, в частности известно о роли вируса папилломы человека (6, 8, 16, 18 типа) в развитии рака шейки матки [6] и влияния гиперэстрогемии на развитие опухолей молочных желез [7].

Известно, что точность морфологической верификации, как правило, составляет не более 85%. Для повышения процента морфологической верификации используют современный иммуногистохимический анализ тканей опухоли. Он позволяет не только установить характер опухоли (доброкачественная или злокачественная), а также тип дифференцировки, характер роста, и большинство дополнительных признаков новообразования для получения окончательного диагноза [5]. Среди наиболее известных иммуногистохимических маркеров для диагностики плеоморфных аденом используют Плаг

1 (Plag1). Точность постановки диагноза по этому показателю составляет не менее 94% [21].

Таким образом, большинство литературных источников и научных статей пытаются оценивать и проводить диагностику опухолей слюнных желез (плеоморфных аденом) только по одному или нескольким однотипным иммуногистохимическим маркерам, а работ, которые подходят комплексно или указывают на совокупность важных этиологических и диагностических показателей изучено недостаточно. Поэтому целью наших исследований является определение этиологических и диагностических иммуногистохимических показателей плеоморфных аденом слюнных желез.

Материалы и методы

Гистологическое типирование новообразований слюнных желез проведено с использованием рутинной окраски гематоксилином и эозином и иммуногистохимического исследования.

Исследование проведено на материале эксцизионных биопсий доброкачественных новообразований слюнных желез (плеоморфных аденом) у 20 пациентов. Для исследования проведен забор опухоли с удаленной околоушной и подчелюстной слюнной железы размером 10x10 мм., толщиной до 4 мм. Вырезанные кусочки опухоли укладывались в кассеты и с помощью держателя кассет их размещали на 16 часов в емкость для фиксации в забуференный 10% формалин с рН 7,4. Уплотняли данный материал в парафине с применением гистопроцессора Histos-5 («Milestone», Италия), по программе для операционного материала - 4 мм.

После завершения программы пропитки в парафине кассеты вынимались из парафинового блока гистопроцессора и на станции для заливки HESTION TEC-2800 Embedding Center кусочки тканей заливались расплавленным парафином в формочки с последующим затверждением на холодильном модуле станции HESTION TEC-2800 Cryo Console. Из полученных парафиновых блоков изготавливали гистологические срезы толщиной 5 мкм с помощью микротомы Microm HM325 («Thermo Scientific», Германия). Срезы окрашивали гематоксилином и эозином для патогистологического исследования опухоли, морфометрии и подсчета объема жизнеспособной опухолевой ткани.

Имуногистохимическое исследование проводили с моноклональным мышинным антителом против человека Monoclonal Mouse Anti-Epstein Barr Virus LMP Clones CS. 1-4 (Dako IS 753, Дания); с моноклональным кроличьим антителом против человека Polyclonal Rabbit Antibody p16 (CDKN2A) (Thermo scientific PAL. 16662) с моноклональным кроличьим антителом против человека Monoclonal Rabbit Anti-Human Estrogen Receptor α Clone SPI (Dako IS 151, Дания) с моноклональным мышинным антителом против человека Monoclonal Mouse Anti-Human Progesteron Receptor Clone PgR 636, (Dako IR068), Дания; Plag1 Monoclonal Antibody (M02) clone 3B7, Китай; с использованием системы детекции En Vision™ FLEX, Dako, Дания. Демаскировку антигена проводили в цитратном буфере рН 6,0 при 95 °С. Первичные антитела инкубировали при комнатной температуре 30 мин., Вторичные – 20 мин. Срезы докраши-

вают гематоксилином Gill. Для положительного контроля использовали тканевые образцы с определенной положительной реактивностью, для отрицательного - проводили процедуру без применения первичных антител.

Полученные препараты изучали и фотографировали с помощью микроскопа OLYMPUS CX 41 с камерой и программным обеспечением Quick PHOTO MICRO 2.3 при стандартизированных условиях.

Результаты и их обсуждение

Анализ таблицы 1 показывает, что у большинства больных с плеоморфными аденомами поражена была околоушная слюнная железа. Среди вирусов, которые присутствовали в тканях опухоли околоушной слюнной железы у 14 (70 %) больных доминировал – ВПЧ 16 типа и вирус Эпштейн-Барра – 6 (30%). Среди гормонов распределение было следующее – 2 (10%) – прогестерон, 2 (10 %) – эстроген. Показатель Плаг 1 имел наибольшую экспрессию в тканях околоушной слюнной железы – 18 (90 %).

Таблица 1 - Иммуногистохимические показатели плеоморфных аденом различных видов слюнных желез (n=20)

Иммуногистохимический показатель	Околоушная слюнная железа	Подчелюстная слюнная железа	Подъязычная слюнная железа	Малые слюнные железы
Эпштейн-Барра вирус	6 (30 %)	-	-	-
ВПЧ 16 типа	14 (70 %)	1 (5 %)	-	1 (5 %)
Эстроген	2 (10 %)			
Прогестерон	2 (10 %)			
Плаг1	18 (90 %)	1 (5 %)		1 (5 %)

* При подсчете учитывали, что у одного больного были положительными сразу несколько иммуногистохимических показателей

Таблица 2 - Иммуногистохимические показатели плеоморфных аденом слюнных желез (n = 20)

Показатели иммуногистохимии	Абсолютное количество	Относительное количество
1.Эстроген	2	10 %
2.Прогестерон	2	10 %
3.Эпштейн-Барра вирус	6	30 %
4.ВПЧ 16	16	80 %
5. Плаг 1	20	100%

* При подсчете учитывали, что у одного больного были положительными сразу несколько иммуногистохимических показателей

При подсчете иммуногистохимических показателей плеоморфных аденом слюнных желез наблюдалось повыше-

ние показателей Плаг 1 до 100 % и ВПЧ 16 типа до 80 % (Рис. 1, 2, 3, 4, 5).

Таблица 3 - Иммуногистохимический показатель Плаг 1. Характеристика по интенсивности окраски для плеоморфных аденом слюнных желез (n = 20)

Показатель иммуногистохимии	+	++	+++
Плаг1	4 (20 %)	10 (50 %)	6 (30 %)

Анализ полученных данных указывает на то, что у 10 (50%) биоптатов интенсивность маркера составляла «++», в 6 (30%) биоптатов «+++», у 4 (20%) биоптатов «+».

Влияние вирусной инфекции на развитие опухолей уже достаточно известно. Большинство из них играют значительную роль в этиологии как доброкачественных, так и злокачественных опухолей. Среди наиболее известных вирусных агентов – вирус папилломы человека, Эпштейн-Барра вирус, цитомегаловирус, вирусы гепатитов В и С, вирусы герпеса различных типов. Вирус папилломы человека, цитомегаловирус и вирус простого герпеса играют значительную роль в развитии рака шейки матки [8]. Вирус папилломы человека вызывает развитие различных видов орофарингеальной, гипо- и назофарингеальных карцином, и немеланомного рака кожи. Вирусы гепатита В и С, саркома Капоши ассоциированный герпес-вирус принимают участие в развитии различных видов гепатоцеллюлярного рака [10]. Эпштейн-Барра вирус, в большинстве случаев, вызывает развитие большинство лимфоцит-ассоциированных опухолей, в частности лимфом [9]. Также, установлена взаи-

мосьвязь между некоторыми вирусами (ретровирус активируется вирусом саркомы Капоши ассоциированным герпес-вирусом, и Эпштейн-Барра вирусом) и их возможностью взаимно активировать и усиливать активность друг друга и таким образом способствовать развитию опухолей с последующим канцерогенезом [11].

Слюнные железы, как орган, кроме слюноотделительной функции выполняет эндокринную и иммунную, достаточно часто испытывает поражения со стороны различных вирусов с последующим развитием опухолевого процесса. Большинство ученых описывают иммуногистохимические исследования плеоморфных аденом, аденолимфом и аденокарцином, где среди основных вирусных агентов выделяют – ВПЧ 16 и 18 типов, ЭБВ [12,13]. Так, среди плеоморфных аденом 16-24 (33-39%) имеют положительную реакцию на ВПЧ 16 типа и 2 (5-7%) ЭБВ [8]. Встречаются отдельные работы, в которых сообщается про отсутствие вирусов ВПЧ, ЭБВ в тканях опухолей и интактных слюнных железах, или незначительный и статистически недостоверный процент наблюдений, ставит под сомнение влия-

яние этих видов вирусных патогенов на развитие опухолей слюнных желез [14].

Проведенные нами иммуногистохимические исследования опухолей слюнных желез (плеоморфных аденом) свидетельствуют о доминировании двух видов вирусов ВПЧ 16 типа – 16 (80%) и ЭБВ – 6 (30%). Проводя сравнение полученных данных с доступными научными источниками можно сделать вывод о повышении (распространенности) вируса ВПЧ 16 и ЭБВ в тканях опухолей слюнных желез, а значит их роль в развитии опухолей не вызывает сомнений.

В литературных источниках, достаточно давно, ведется дискуссия о важности влияния некоторых видов гормонов на опухолегенез. Так, среди основных выделяют – андроген, эстроген и прогестерон – гормоны, действующие через специфические рецепторы и играющие важную роль в росте и развитии нескольких опухолей, в том числе карциномы молочной железы, эндометрия и простаты [15]. (Actis A.V. 2005) указывает на определенную связь и сходство по гистопатологическим типам между опухолями слюнных желез и опухолями молочной железы и простаты. Так, строение плеоморфных аденом очень похоже с мукоцеллоподобной опухолью молочной железы [16].

Проводя анализ большинства иммуногистохимических исследований тканей опухолей слюнных желез по данным разных авторов видно, что экспрессия эстрогена, андрогена, прогестерона составляет от 7-30% для доброкачественных опухолей, и от 30-50% для злокачественных опухолей [15,17,18]. При этом, часть авторов в своих иссле-

дованиях, утверждает, что экспрессия эстрогена, андрогена, прогестерона не имеет существенного значения в опухолегенезе слюнных желез [19,20].

Проведенные нами иммуногистохимические исследования опухолей слюнных желез (плеоморфных аденом), показало экспрессию эстрогеновых и прогестероновых рецепторов на уровне не более (10 %) в обоих случаях. Полученный результат, свидетельствует об достаточно низкой гормональной зависимости плеоморфных аденом слюнных желез.

Таким образом, можно достоверно утверждать, что сравнивая роль вирусов и гормонов на возможное развитие опухолевого процесса в тканях слюнных желез, первичное звено принадлежит вирусам ВПЧ16 и ЭБВ. Наличие же эстрогеновых и прогестероновых рецепторов в тканях опухолей слюнных желез может дополнительно усиливать рост опухолей только в отдельных клинических случаях.

Важность иммуногистохимии в диагностике доброкачественных опухолей, также не вызывает сомнений. Способность к малигнизации и рецидивированию среди некоторых из них, в частности плеоморфных аденом слюнных желез, побуждает к поиску более современных и прицельных иммуногистохимических маркеров опухолей [21].

Известен факт, что одним из факторов развития плеоморфных аденом являются хромосомные транслокации в контрольных точках 8q12, 3p21 и 12q13-15, что соответствует генам PLAG1, b-катенина 8 и HMGIC9 [22]. Именно Плаг 1, на сегодняшний день является основным и достоверным им-

муногистохимическим маркером, который используется для подтверждения диагноза «плеоморфная аденома слюнной железы».

Плаг 1 (ген плеоморфной аденомы №1) – это протоонкоген, который по некоторым данным в 93% случаев встречается среди плеоморфных аденом и в 94% случаях при рецидивах плеоморфных аденом. Он экспрессируется в эпителиальных клетках, но его частота более выражена в миоэпителиальных клетках. Играет определенную роль в эмбриогенезе, развитии плода и уменьшает свою экспрессию при развитии организма. Экспрессия Плаг1 была также описана кроме плеоморфных аденом, при липобластомах, гепатобластомах, лейомиомах, леомиосаркомах, и в некоторых случаях острой миелоидной лейкемии. Плаг1 усиливает экспрессию нескольких факторов роста генов, которые не только вносят значительный вклад в опухоленогенез, но также подавляет гены, которые ингибируют клеточную пролиферацию. Таким образом, Плаг1 может играть двойную роль в формировании опухоли, и это было подтверждено в исследованиях на доброкачественных опухолях и низкодифференцированных карциномах [23].

Проведенные нами исследования показали, что у 20 (100 %) больных с морфологическим диагнозом «плеоморфная аденома слюнных желез» иммуногистохимический маркер Плаг1 показал положительную реакцию. То есть, точность иммуногистохимической верификации составила 100 %. При этом интенсивность окраски по этому показателю, была разная. В большин-

стве случаев у 10 (50 %) больных - интенсивность составляла «++». В 18 (90 %) больных процесс был локализован в околоушной слюнной железе.

Таким образом, использование Плаг1 в диагностике плеоморфных аденом слюнных желез позволяет дополнительно повысить окончательную верификацию диагноза иммуногистохимическим методом на уровне 100 %.

Выводы:

1. Проведенные исследования этиологических и диагностических показателей плеоморфных аденом слюнных желез иммуногистохимическим методом показали наличие экспрессии 5 - ти маркеров – ВПЧ 16 типа, ЭБВ, эстрогена, прогестерона, Плаг 1.

2. Наибольшую иммуногистохимическую экспрессию среди плеоморфных аденом слюнных желез показали маркеры Плаг 1 – 20 (100 %) и ВПЧ 16 типа – 16 (80 %).

Литература

1. Маланчук, В.О. *Хірургічна стоматологія та щелепно-лицева хірургія: навчальний посібник*/В.О. Маланчук, О.С. Воловар, І.Ю. Гарляускайте. – Київ: Логос, 2011. – 627 с.

2. Маланчук, В.О. *Хірургічна стоматологія та щелепно-лицева хірургія*/ В.О. Маланчук, І.П. Логвіненко, Т.О. Маланчук. – Київ: Логос, 2011. – 606 с.

3. Пачес А.И. *Опухоли слюнных желез*/ А.И.Пачес, Т.Д. Таболиновская. - Москва: Практическая медицина, 2009. – 470 с.

4. da Silva LP, Serpa MS, Viveiros SK, Sena DAC, de Carvalho Pinho RF, de Abreu Guimarães LD, et al. *Salivary gland tumours in a Brazilian population: A 20-year retrospective and multicentric study of 2292 cases. J Craniomaxillofac*

- Surg.* 2018 Dec;46(12):2227-2233. doi: 10.1016/j.jcms.2018.09.028. PubMed PMID: 30528989.
5. Prichard JW Overview of automated immunohistochemistry. *Arch Pathol Lab Med.* 2014 Dec;138(12):1578-82. doi: 10.5858/arpa.2014-0083-RA. PubMed PMID: 25427039.
6. Chen LP, Thomas EK, Hu SL, Hellström I, Hellström KE. Human papillomavirus type 16 nucleoprotein E7 is a tumour rejection antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Jan 1;88(1):110-4. DOI: 10.1073/pnas.88.1.110. PubMed PMID: 1846033; PubMed Central PMCID: PMC50759.
7. Ozono S, Onozuka M, Sato K, Ito Y. Immunohistochemical localization of estradiol, progesterone, and progesterone receptor in human salivary glands and salivary adenoid cystic carcinomas. *Cell Struct Funct.* 1992 Jun;17(3):169-75. PubMed PMID: 1322800.
8. Lin FC, Chen PL, Tsao TY, Li CR, Jeng KC, Tsai SC. Prevalence of human papillomavirus and Epstein-Barr virus in salivary gland diseases. *J Int Med Res.* 2014 Oct;42(5):1093-101. doi: 10.1177/0300060514543041. PubMed PMID: 25136053.
9. Laane CJ, Murr AH, Mhatre AN, Jones KD, Lalwani AK. Role of Epstein-Barr virus and cytomegalovirus in the aetiology of benign parotid tumours. *Head Neck.* 2002 May;24(5):443-50. DOI: 10.1002/hed.10065. PubMed PMID: 12001074.
10. Müller-Coan BG, Caetano BFR, Pagano JS, Elgui de Oliveira D. Cancer Progression Goes Viral: The Role of Oncoviruses in Aggressiveness of Malignancies. *Trends Cancer* 2018 Jul;4(7):485-498. doi: 10.1016/j.trecan.2018.04.006. PubMed PMID: 29937047.
11. Chen J, Foroozesh M, Qin Z. Transactivation of human endogenous retroviruses by tumour viruses and their functions in virus-associated malignancies. *Oncogenesis.* 2019 Jan 14;8(1):6. doi: 10.1038/s41389-018-0114-y. PubMed PMID: 30643113; PubMed Central PMCID: PMC6331641.
12. Miah MS, Majumdar S, White S, Robinson M, Kernohan N. Human papillomavirus and salivary gland neoplasia: a p16INK4 immunohistochemical and in situ hybridisation study. *J Laryngol Otol.* 2015 Oct;129(10):1000-3. doi: 10.1017/S0022215115001851. PubMed PMID: 26190415.
13. Hühns M, Simm G, Erbersdobler A, Zimpfer A. HPV Infection, but Not EBV or HHV-8 Infection, Is Associated with Salivary Gland Tumours. *Biomed Res Int.* 2015;2015:829349. doi: 10.1155/2015/829349. PubMed PMID: 26618178; PubMed Central PMCID: PMC4651650.
14. Skálová A, Kašpírková J, Andrlé P, Hostička L, Vaneček T. Human papillomaviruses are not involved in the etiopathogenesis of salivary gland tumours. *Cesk Patol.* 2013 Apr;49(2):72-5. PubMed PMID: 23641711.
15. Aquino G, Collina F, Sabatino R, Cerrone M, Longo F, Ionna F, et al. Sex Hormone Receptors in Benign and Malignant Salivary Gland Tumours: Prognostic and Predictive Role. *Int J Mol Sci.* 2018 Jan 30;19(2). pii: E399. doi: 10.3390/ijms19020399. PubMed PMID: 29385707; PubMed Central PMCID: PMC5855621.
16. Actis AB. A hypothesis to relate salivary tumours with mammary and prostate neoplasias. *Bioinformation.* 2005 Apr 21;1(1):12-3. DOI: 10.6026/97320630001012. PubMed PMID: 17597843; PubMed Central PMCID: PMC1891622.
17. Can NT, Lingen MW, Mashek H, McElherne J, Briese R, Fitzpatrick C, et al. Expression of Hormone Receptors and HER-2 in Benign and Malignant Salivary Gland Tumours. *Head Neck Pathol.* 2018

Mar;12(1):95-104. doi: 10.1007/s12105-017-0833-y. PubMed PMID: 28681314; PubMed Central PMCID: PMC5873488.

18. Nasser SM, Faquin WC, Dayal Y. Expression of androgen, oestrogen, and progesterone receptors in salivary gland tumours. Frequent expression of androgen receptor in a subset of malignant salivary gland tumours. *Am J Clin Pathol.* 2003 Jun;119(6):801-6. DOI:10.1309/RVTP-1G0Q-727W-JUQD PubMed PMID: 12817426.

19. Teymoortash A, Lippert BM, Werner JA. Steroid hormone receptors in parotid gland cystadenolymphoma (Warthin's tumour). *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 2001 Oct;26(5):411-6. PubMed PMID: 11678950.

20. Tarakji B, Kujan O. Expression of oestrogen progesterone and androgen receptors in salivary gland tumours. A review of the literature. *Gulf J Oncolog.* 2012 Jan;(11):50-9. PubMed PMID: 22227546.

21. Lin F, Chen Z. Standardization of Diagnostic Immunohistochemistry: Literature Review and Geisinger Experience. *Arch Pathol Lab Med.* 2014 Dec;138(12):1564-77. doi: 10.5858/arpa.2014-0074-RA. PubMed PMID: 25427038.

22. Weinreb I. Translocation-associated salivary gland tumours: a review and update. *Adv Anat Pathol.* 2013 Nov;20(6):367-77. doi: 10.1097/PAP.0b013e3182a92cc3. PubMed PMID: 24113307.

23. de Brito BS, Gaspar NG, Egal ES, Sanchez-Romero C, Martins AS, Tincani AJ, et al. PLAG1 expression is maintained in recurrent pleomorphic adenoma. *Virchows Arch.* 2016 Oct;469(4):477-81. doi: 10.1007/s00428-016-1980-3. PubMed PMID: 27381214.