

УДК: 616.316-006.5-076:577.2

Використання імуногістохімічного маркера PLAG1 у діагностиці плеоморфної аденоми слинних залоз

Use of the Immunohistochemical Marker PLAG1 for the Diagnosis of Pleomorphic Adenoma of the Salivary Glands

Маланчук В.О.¹, д.мед.н., проф., зав. каф.,
Бродецький І.С.¹, к.мед.н., доц.,
Кротеви́ч М.С.², к.мед.н., зав. відділенням

¹Національний медичний університет
ім. О.О. Богомольця

²Національний інститут раку, Київ
Malanchuk V.O.¹, Brodetskyi I.S.¹,
Krotevych M.S.²

¹Bogomolets National Medical University

²National Cancer Institute, Kyiv

Адреса для кореспонденції:
Бродецький Ігор Сергійович
e-mail: i2g3o4@bigmir.net

Мета: Проведення імуногістохімічного аналізу біопсійного матеріалу хворих з плеоморфними аденомами слинних залоз із використанням маркера PLAG1. **Методи:** Дослідження проведено на матеріалі ексцизійних біопсій плеоморфних аденом слинних залоз 28 пацієнтів. Гістологічне типування новоутворень слинних залоз здійснено з використанням рутинного забарвлення гематоксиліном і еозином та імуногістохімічного дослідження. Імуногістохімічне дослідження проводили з PLAG1 Monoclonal Antibody (M02) clone 3B7 (Китай) з використанням системи детекції EnVision™ FLEX, Dako (Данія). Для позитивного контролю використовували тканинні зразки з визначеною позитивною реактивністю, для негативного контролю проводили процедуру без застосування первинних антитіл. Отримані препарати вивчали та фотографували за допомогою мікроскопа OLYMPUS CX 41 з камерою і програмним забезпеченням Quick PHOTO MICRO 2.3 у стандартизованих умовах. **Результати:** PLAG1 (ген плеоморфної аденоми №1) — це протоонкоген, який, за деякими даними, у 93% випадків трапляється серед плеоморфних аденом і в 94% випадках — при рецидивах плеоморфної аденоми. Він експресується в епітеліальних клітинах, але його частота вираженіша в міоепітеліальних клітинах. Відіграє певну роль в ембріогенезі, розвитку плода і зменшує свою експресію при розвитку організму. Проведений нами аналіз на імуногістохімічний маркер PLAG1 показав позитивну реакцію у 96,4% біоптатів плеоморфних аденом слинних залоз, при цьому інтенсивність забарвлення за рекомендованою шкалою була різною — у 12 (44,44%) «++», у 9 (33,33%) — «+++», у 6 (22,22%) — «+». Серед усіх слинних залоз, в переважній кількості — 24 (88,88%) PLAG1 був позитивним для білявушної слинної залози. **Висновки:** Серед 4 гістологічних типів плеоморфної аденоми, імуногістохімічний показник PLAG1 домінував у мезенхімальному та комбінованому (мезенхімально-епітеліальному) типах — 15 (55,55%) та 10 (37,03%) відповідно.

Ключові слова: пухлини слинних залоз, плеоморфна аденома, імуногістохімічні маркери, PLAG1.

Purpose: To conduct immunohistochemical analysis of biopsy material from patients with pleomorphic adenomas of salivary glands using PLAG1 marker. **Methods:** The study was conducted based on excision biopsies of pleomorphic adenomas of salivary glands in 28 patients. Histologic typing of salivary glands tumors was performed using routine coloration with hematoxylin and eosin and immunohistochemical study. Immunohistochemical study was performed with PLAG1 Monoclonal Antibody (M02) clone 3B7, China, using EnVision™ FLEX Detection System, Dako, Denmark. For positive control tissue samples with definite positive reactivity were used, for negative — the procedure without the use of primary antibodies was performed. The obtained histological samples of tissues were studied and photographed using a microscope OLYMPUS CX 41 with a camera and software Quick PHOTO MICRO 2.3 under standardized conditions. **Results:** PLAG1 (Pleomorphic adenoma gene № 1) is a protooncogene, which, according to some reports, occurs in 93% of cases of pleomorphic adenomas and in 94% of cases with recurrence of pleomorphic adenoma. It is expressed in epithelial cells but its frequency is more pronounced in myoepithelial cells. It plays a certain role in embryogenesis, fetal development and reduces its expression during morphosis. Our analysis of PLAG1 immunohistochemical marker showed positive reaction in 96.4% of biopsies of pleomorphic adenomas of salivary glands and intensity score by the recommended scale was different — in 12 (44,44%) — «++», in 9 (33,33%) — «+++», in 6 (22,22%) — «+». PLAG1 was positive for parotid salivary gland in the majority — 24 (88,88%) of all salivary glands. **Conclusions:** Among 4 histological types of pleomorphic adenoma, PLAG1 immunohistochemical indicator dominated in mesenchymal and combined (mesenchymal-epithelial) types — 15 (55,55%) and 10 (37,03%) respectively.

Key words: tumors of salivary glands, pleomorphic adenoma, immunohistochemical markers, PLAG1.

Однією із актуальних проблем сучасної щелепно-лицевої хірургії залишаються питання діагностики пухлини слинних залоз. В більшості випадків практикуючі лікарі орієнтуються на традиційні методи діагностики – клінічні та інструментальні (УЗД, КТ, МРТ, ТАБ та ін.) [1]. Попередній клінічний діагноз встановлюється, зазвичай, використовуючи один або декілька з вищезазначених методів, а також, враховуючи загальновідомі статистичні дані про частоту новоутворень слинних залоз [2].

За більшістю джерел літератури на першому місці за частотою розповсюдження серед пухлин слинних залоз залишається плеоморфна аденома – від 61–90% [3].

Після проведення хірургічного втручання та отримання резектату пухлини (біопсійного матеріалу), патогістолог на основі даних мікроскопії встановлює остаточний діагноз. Точність морфологічної верифікації, зазвичай, становить не більш ніж 85% [4]. Для підвищення відсотка морфологічної верифікації використовують сучасний імуногістохімічний аналіз парафінових блоків, вироблених із тканин пухлини. Він дозволяє не тільки встановити характер пухлини (доброякісна чи злоякісна), а також тип диференціювання, характер росту, та більшість додаткових ознак новоутворення для отримання остаточного діагнозу [5]. Серед найвідоміших імуногістохімічних маркерів для діагностики плеоморфної аденоми використовують PLAG1 [6]. Точність встановлення діагнозу за цим показником становить не менш ніж 94% [7]. Враховуючи відсутність даних про використання цього маркера в нашій країні, а також його значення залежно від гістологічного типу плеоморфних аденом слинних залоз, метою наших досліджень є проведення імуногістохімічного аналізу біопсійного матеріалу хворих із плео-

Таблиця 1. Характеристика маркера PLAG1 за інтенсивністю забарвлення в плеоморфних аденомах слинних залоз

Показник імуногістохімії	+	++	+++
PLAG1	6 (22,22%)	12 (44,44%)	9 (33,33%)
Загальна кількість обстежених хворих (або біоптати) з аденомами, 28	Позитивний у 27 хворих		

Примітка: в одного хворого показник був негативний

Таблиця 2. Значення Plag1 для плеоморфних аденом залежно від локалізації у слинних залозах

Показник імуногістохімії	Білявушна слинна залоза	Підщелепна слинна залоза	Під'язична слинна залоза	Малі слинні залози
PLAG1	24 (88,88%)	2 (7,4%)	–	1 (3,7%)
Загальна кількість обстежених хворих з аденомами, 28	Позитивний у 27 хворих			

Примітка: в одного хворого показник був негативний

морфними аденомами слинних залоз із використанням маркера PLAG1.

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ

Гістологічне типування новоутворень слинних залоз проведено з використанням рутинного забарвлення гематоксиліном і еозином та імуногістохімічного дослідження.

Дослідження проведено на матеріалі ексцизійних біопсій плеоморфних аденом слинних залоз у 28 пацієнтів. Для дослідження забирали пухлини з видаленої білявушної та підщелепної слинних залоз розміром 10×10 мм, товщиною до 4 мм, вирізані шматочки пухлини вкладали у касети і за допомогою тримача для касет, на 16 годин розміщували у ємкість для фіксації в забуференому 10% формаліні з pH 7,4. Ущільнювали матеріал у парафіні із застосуванням гістопроектора Histos-5 («Milestone», Італія), за програмою для операційного матеріалу – 4 мм. Після завершення програми просочення в парафіні касети виймали з парафінового блоку гістопроектора і на станції для заливки HESTION TEC-2800

Embedding Center шматочки тканин заливали розплавленим парафіном у формочки з подальшим застиганням на холодильному модулі станції HESTION TEC-2800 Cryo Console. З отриманих парафінових блоків виготовляли гістологічні зрізи товщиною 5 мкм за допомогою мікротома Microm HM325 («Thermo Scientific», Німеччина). Зрізи забарвлювали гематоксиліном і еозином для патогістологічного дослідження пухлини, морфометрії і підрахунку обсягу життєздатної пухлинної тканини.

Імуногістохімічне дослідження проводили з PLAG1 Monoclonal Antibody (M02) clone 3B7 (Китай); з використанням системи детекції EnVision TM FLEX («Дакко», Данія). Демаскували антиген у цитратному буфері pH 6,0 при 95°C. Первинні антитіла інкубували при кімнатній температурі 30 хв, вторинні – 20 хв. Проводили подальше забарвлювання зрізів гематоксиліном Gill. Для позитивного контролю використовували тканинні зразки з визначеною позитивною реактивністю, для негативного проводили процедуру без застосування первинних антитіл.

Таблиця 3. Значення PLAG1 залежно від гістологічного типу плеоморфної аденоми слинних залоз

Показник імуногістохімії	Мезенхімальний тип	Епітеліальний тип	Комбінований (мезенхімально-епітеліальний) тип	Міоепітеліальний тип
PLAG1	15 (55,55%)	2 (7,4%)	10 (37,03%)	—
Загальна кількість обстежених хворих з аденомами, 28	Позитивний у 27 хворих			

Примітка: в одного хворого показник був негативний

Отримані препарати вивчали та фотографували за допомогою мікроскопа OLYMPUS CX 41 із камерою і програмним забезпеченням Quick PHOTO MICRO 2.3 у стандартизованих умовах.

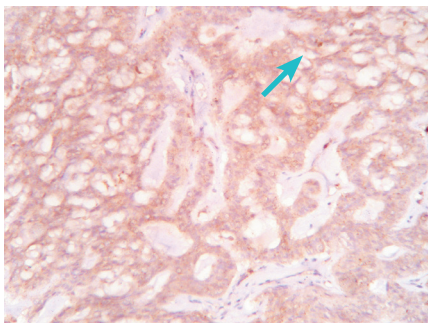
РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз отриманих даних вказує на те, що у 12 (44,44%) хворих (або біоптати) інтенсивність маркера становила «++», у 9 (33,33%) хворих «+++», у 6 (22,22%) хворих «+» (мал. 1–3). Серед усіх слинних залоз, переважно – у 24 випадках (88,88%), PLAG1 був позитивним для білявушної слинної залози. Серед 4 гістологічних типів плеоморфної аденоми імуногістохімічний показник PLAG1 домінував у мезенхімальному та комбінованому (мезенхімально-епітеліальному) типах – 15 (55,55%) та 10 (37,03%) відповідно.

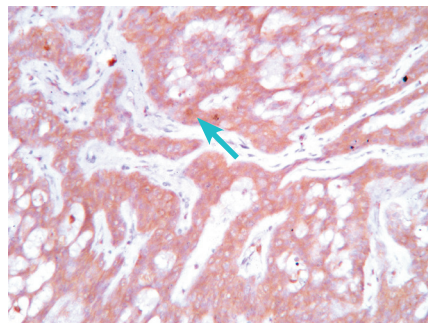
Імуногістохімічний аналіз видаленого матеріалу пухлин залишається одним із найважливіших методів завершальної діагностики біопсійного матеріалу разом із патогістологічним обстеженням [8]. У більшості випадків цей метод використовують для верифікації злویкісних новоутворень та подальшого вибору прицільного хімотерапевтичного лікування. Важливість імуногістохімії в діагностиці доброякісних пухлин, також, не викликає сумнівів. Здатність до малігнізації та рецидиву серед деяких з них, зокрема плеоморфної аденоми слинних залоз, спонукає до пошуку сучасніших та прицілних імуногістохімічних маркерів пухлин [9]. Відомо, що одним із чинників розвитку плеоморфної аденоми є хромосомні транслокації в контрольних точках 8q12, 3p21 та 12q13–15, що відповідає генам PLAG1, b-катеніну 8 та HMGIC9 [10]. Сьогодні саме PLAG1 є основним

та достовірним імуногістохімічним маркером, що використовується для підтвердження діагнозу «плеоморфна аденома слинних залоз».

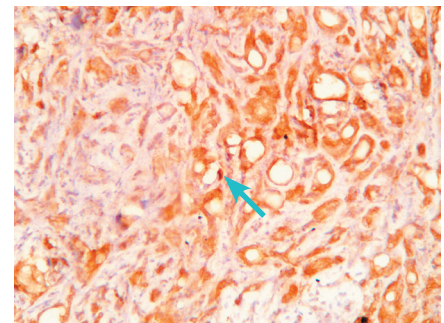
PLAG1 (ген плеоморфної аденоми №1) – це протоонкоген, який, за деякими даними, у 93% випадків поширений серед плеоморфних аденом і в 94% випадках – при рецидивах плеоморфної аденоми. Він експресується в епітеліальних клітинах, але його частота вираженіша в міоепітеліальних клітинах. Відіграє певну роль в ембріогенезі, розвитку плода і зменшує свою експресію під час розвитку організму. Експресія PLAG1, крім плеоморфних аденом, була також описана при ліпобластомах, гепатобластомах, лейміомах, лейоміосаркомах і деяких випадках гострої мієлоїдної лейкемії. PLAG1 протеїн підсилює експресію декількох факторів росту генів, які не тільки значно впливають на пухлиногенез, але також пригнічує гени, які інгібують



Мал. 1. Гістопрепарат тканин плеоморфної аденоми привушної слинної залози пацієнта Б., 46 років, збільшення ×200. Слабко позитивна (+) ядерно-цитоплазматична імуногістохімічна реакція на PLAG1 (вказано стрілкою)



Мал. 2. Гістопрепарат тканин плеоморфної аденоми привушної слинної залози пацієнта Ф., 18 років, збільшення ×200. Помірно позитивна (++) ядерно-цитоплазматична імуногістохімічна реакція на PLAG1 (вказано стрілкою)



Мал. 3. Гістопрепарат тканин плеоморфної аденоми привушної слинної залози пацієнта Б., 68 років, збільшення ×200. Сильно позитивна (+++) ядерно-цитоплазматична імуногістохімічна реакція на PLAG1 (вказано стрілкою)

клітинну проліферацію. Отже, PLAG1 може відігравати подвійну роль у формуванні пухлини і це було підтверджено дослідженнями на доброякісних пухлинах і низькодиференційованих карциномах [7].

Проведені нами дослідження показали, що у 27 (96,4%) хворих із морфологічним діагнозом «плеоморфна аденома слинних залоз» імуногістохімічний маркер PLAG1 мав позитивну реакцію. Тобто точність імуногістохімічної верифікації становила 96,4%. Водночас інтенсивність забарвлення за цим показником була різною. У 12 (44,44%) хворих інтенсивність становила «+++». У

24 (88,88%) хворих процес локалізувався в білявушній слинній залозі. Серед гістологічних типів плеоморфної аденоми імуногістохімічний маркер PLAG1 переважав у мезенхімальному типі – 15 (55,55%).

Використання PLAG1 у діагностиці плеоморфної аденоми слинної залози дозволяє додатково підвищити морфологічну та імуногістохімічну верифікацію діагнозу на рівні 96,4%.

ВИСНОВКИ

Спостерігали позитивну реакцію імуногістохімічного маркера PLAG1 у

96,4% біопатів плеоморфних аденом слинних залоз, водночас інтенсивність забарвлення за рекомендованою шкалою була різною – у 12 (44,44%) «+++», у 9 (33,33%) – «+++», у 6 (22,22%) – «+». Більшість біопатів плеоморфних аденом слинних залоз з позитивною реакцією на імуногістохімічний маркер PLAG1 була характерною для білявушних слинних залоз – 24 (88,88%). Серед 4 гістологічних типів плеоморфної аденоми імуногістохімічний показник PLAG1 переважав у мезенхімальному та комбінованому (мезенхімально-епітеліальному) типах – 15 (55,55%) та 10 (37,03%) відповідно.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Пачес А.И. Опухоли слюнных желез / А.И. Пачес, Т.Д. Таболинская. – Москва: Практическая медицина, 2009. – 470 с.
2. Da Silva L.P. Salivary gland tumors in a Brazilian population: a 20-year retrospective and multicentric study of 2292 cases / L.P. Da Silva, M.S. Serpa, S.K. Viveiros, [et. al] // Journal of Craniomaxillofacial Surgery. – 2018. – Vol. 46 (12). – P. 2227–2233.
3. Tian Z. Salivary gland neoplasms in oral and maxillofacial regions: a 23-year retrospective study of 6982 cases in an eastern Chinese population / Z. Tian, L. Li, L. Wang, [et. al] // International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. – 2010. – Vol. 39. – P. 235–242.
4. Cheuk W. Advances in salivary gland pathology / W. Cheuk, J.K. C. Chan // Histopathology. – 2007. – Vol. 51(1). – P. 1–20.
5. Prichard J.W. Overview of automated immunohistochemistry / J.W. Prichard // Arch Pathol Lab Med. – 2014. – Vol. 138(12). – P. 1578–1582.
6. Rito M. Salivary Gland Neoplasms: Does Morphological Diversity Reflect Tumor Heterogeneity? / M. Rito, I. Fonseca // Pathobiology. – 2018. – Vol.85 (1–2). – P. 85–95.
7. de Brito B.S. PLAG1 expression is maintained in recurrent pleomorphic adenoma / B.S. de Brito, N.G. Gaspar, E.S. Egal, [et. al] // Virchows Arch. – 2016. – Vol. 469 (4). – P. 477–81.
8. Mori H. Methods of Immunohistochemistry and Immunofluorescence: Converting Invisible to Visible / H. Mori, R.D. Cardiff // Methods Mol Biol. – 2016. – Vol. 1458. – P. 1–12.
9. Lin F. Standardization of Diagnostic Immunohistochemistry: Literature Review and Geisinger Experience / F. Lin, Z. Chen // Archives of Pathology & Laboratory Medicine. – 2014. – Vol. 138(12). – P. 1564–1577.
10. Weinreb I. Translocation-associated salivary gland tumors: a review and update / I. Weinreb // Adv Anat Pathol. – 2013. – Vol. 20(6). – P. 367–77.

REFERENCES

1. Paches, A.I., & Tabolinovskaja, T.D. 2009 *Opuholi sljunnyh zhelez*. Moskva: Prakticheskaja medicina, 470 s. (in Russian).
2. Da Silva L.P., Serpa, M.S. Viveiros, S.K & [et. al] (2018). Salivary gland tumors in a Brazilian population: a 20-year retrospective and multicentric study of 2292 cases. *Journal of Craniomaxillofacial Surgery*. Vol. 46 (12), p. 2227–2233 (in English).
3. Tian, Z., Li, L., & Wang, L. [et. al]. (2010). Salivary gland neoplasms in oral and maxillofacial regions: a 23-year retrospective study of 6982 cases in an eastern Chinese population. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. Vol. 39, p. 235–242 (in English).
4. Cheuk, W., & Chan, J.K.C. (2007). Advances in salivary gland pathology. *Histopathology*. Vol. 51(1), p. 1–20 (in English).
5. Prichard, J.W. (2014). Overview of automated immunohistochemistry. *Arch Pathol Lab Med*. Vol. 138(12), p. 1578–1582 (in English).
6. Rito, M., & Fonseca, I. (2018). Salivary Gland Neoplasms: Does Morphological Diversity Reflect Tumor Heterogeneity? *Pathobiology*. Vol. 85 (1–2), p. 85–95 (in English).
7. de Brito B.S., Gaspar, N.G., Egal, E.S. & [et. al]. (2016). PLAG1 expression is maintained in recurrent pleomorphic adenoma. *Virchows Arch*. Vol. 469 (4), p. 477–81 (in English).
8. Mori, H., & Cardiff, R.D. (2016). Methods of Immunohistochemistry and Immunofluorescence: Converting Invisible to Visible. *Methods Mol Biol*. Vol. 1458, p. 1–12 (in English).
9. Lin, F. (2014). Standardization of Diagnostic Immunohistochemistry: Literature Review and Geisinger Experience. Z. Chen. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. Vol. 138 (12), p. 1564–1577 (in English).
10. Weinreb, I. (2013). Translocation-associated salivary gland tumors: a review and update. *Adv Anat Pathol*. Vol. 20(6), p. 367–77 (in English).

Стаття надійшла в редакцію 10 червня 2019 року