

В.О. Маланчук<sup>1</sup>, І.С. Бродецький<sup>1</sup>, М.С. Кротевич<sup>2</sup><sup>1</sup>Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ<sup>2</sup>Національний інститут раку, Київ

## Імуногістохімічні показники деяких видів гормонів серед доброякісних пухлин слинних залоз

Імуногістохімічне дослідження (ІГХД) в діагностиці новоутворень слинних залоз (СЗ) залишається золотим стандартом остаточної верифікації пухлин поряд із патоморфологічним обстеженням резектату. Серед найвідоміших маркерів — різні типи вірусів папіломи людини, цитомегаловірус, вірус Епштейна — Барр, рецептори до гормонів прогестерону (PR), естрогену (ER), андрогену (AR), різні цитокератини для підтвердження малігнізації пухлин. Більшість останніх робіт, присвячених можливості впливу ендокринної регуляції на тканини пухлин СЗ, свідчить про наявність у них PR, ER, AR. Їх вміст у тканинах пухлин СЗ досить різноманітний залежно від певної географічної популяції населення. **Мета** — вивчення вмісту PR, ER у тканинах пухлин СЗ шляхом ІГХД. **Об'єкт і методи дослідження.** Гістологічне типування новоутворень СЗ проведено з використанням рутинного забарвлення гематоксиліном і еозином та ІГХД. Дослідження проведено на матеріалі ексцизійних біопсій СЗ (плеоморфних аденом та аденолімфом) у 32 пацієнтів. ІГХД проводили з моноклональним кролячим антитілом проти людини ER («Dako IS 151», Данія), з моноклональним мишачим антитілом проти людини PR («Dako IR068», Данія), з використанням системи детекції «EnVision™ FLEX» («Dako», Данія). Для позитивного контролю використовували тканинні зразки з визначеною позитивною реактивністю, для негативного — проводили процедуру без застосування первинних антитіл. **Результати.** В усіх хворих із плеоморфними аденомами ураженню підлягала тільки привушна СЗ. Серед гормонів, наявних у тканинах пухлин привушної СЗ, у 3 (10,7%) — прогестерон, 2 (7,14%) — естроген. Серед аденолімфом СЗ домінував естроген — 3 (75%). **Висновки.** Серед доброякісних пухлин СЗ (плеоморфні аденоми й аденолімфоми) характерна експресія ER та PR. В усіх пацієнтів, в яких виявлені позитивні реакції на експресію ER та PR, новоутворення локалізувались у привушних СЗ.

**Ключові слова:** пухлини слинних залоз, плеоморфна аденома, аденолімфома, імуногістохімічне дослідження, естроген, прогестерон.

### Вступ

Імуногістохімічне дослідження (ІГХД) в діагностиці новоутворень слинних залоз (СЗ) залишається золотим стандартом остаточної верифікації пухлин поряд із патоморфологічним обстеженням резектату (Richard J.W., 2014). Серед найвідоміших маркерів — різні типи вірусів папіломи людини, цитомегаловірус, вірус Епштейна — Барр, рецептори до гормонів прогестерону (PR), естрогену (ER), андрогену (AR), різні цитокератини для підтвердження малігнізації пухлин (Lin F.C.F. et al., 2014). Саме виявлення PR, ER, AR у тканинах видалених пухлин СЗ може виявити їх певну ендокринну залежність. Це може допомогти у розробці нових схем лікування доброякісних та злоякісних пухлин.

Організм людини має чітко сформовану ендокринну регуляцію: гіпоталамус — орган-мішень. Не є винятком грудна залоза (ГЗ), тканини ендометрія, яєчки та яєчники, в тканинах яких знаходяться PR, ER, AR. Наявність цих рецепторів робить ці органи вразливими до розвитку ендокриннозалежних пухлин як доброякісного, так і злоякісного походження (Ozono S. et al., 1992).

Також на сьогодні достовірно встановлена наявність певного взаємозв'язку за гістопатологічними типами між тканинами ГЗ, ендометрія, яєчків та яєчників. Так, мукоцеліподібна пухлина ГЗ схожа за будовою з плеоморфною аденомою. Отже, можна стверджувати про можливу залежність пухлин СЗ від ендокринної регуляції або впливу (Actis A.V., 2005).

Більшість останніх робіт, присвячених можливості впливу ендокринної регуляції на тканини пухлин СЗ, свідчить про наявність в них PR, ER, AR (Kolude B. et al., 2013). Їх вміст у тканинах пухлин СЗ досить різноманітний залежно від певної географічної популяції населення (Ito F.A. et al., 2009).

**Мета** — вивчення вмісту PR, ER у тканинах пухлин СЗ шляхом ІГХД.

### Об'єкт і методи дослідження

Гістологічне типування новоутворень СЗ проведено з використанням рутинного забарвлення гематоксиліном і еозином та ІГХД.

Дослідження проведено на матеріалі ексцизійних біопсій СЗ (плеоморфних аденом та аденолімфом) у 32 пацієнтів. Проведено забір пухлини з видаленої привушної та підщелепної СЗ розміром 10x10 мм, товщиною <4 мм. Вирізані шматочки пухлини вкладали у касети і за допомогою тримача для касет розміщували на 16 год у ємкість для фіксації в забуференому 10% розчині формаліну з рН 7,4. Ущільнювали матеріал у парафін із застосуванням гістіопроесорса «Histo-5» («Milestone», Італія) за програмою для операційного матеріалу — 4 мм. Після завершення програми просочення в парафін касети виймали з парафінового блоку гістіопроесорса, і на станції для заливки «NESTION TEC-2800 Embedding Center» шматочки тканин заливали розплавленим парафіном у формочки з подальшим застиганням на холодильному модулі станції «NESTION 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 та підрахунку об'єму життєздатної пухлинної тканини.

ІГХД проводили з моноклональним кролячим антитілом проти людини (Monoclonal Rabbit Anti-Human Estrogen Receptor a Clone SPI, «Dako IS 151», Данія), з моноклональним мишачим антитілом проти людини (Monoclonal Mouse Anti-Human Progesteron Receptor Clone Pgr 636, «Dako IR068», Данія), з використанням системи детекції «EnVision™ FLEX» («Dako», Данія). Демаскування антигену проводили у цитратному буфері рН 6,0 при 95 °С. Первинні антитіла інкубували при кімнатній температурі протягом 30 хв, вторинні — 20 хв. Зрізи дофарбовували гематоксиліном Gill. Для позитивного контролю використовували тканинні зразки з визначеною позитивною реактивністю, для негативного — 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» за стандартизованих умов.

## Результати та їх обговорення

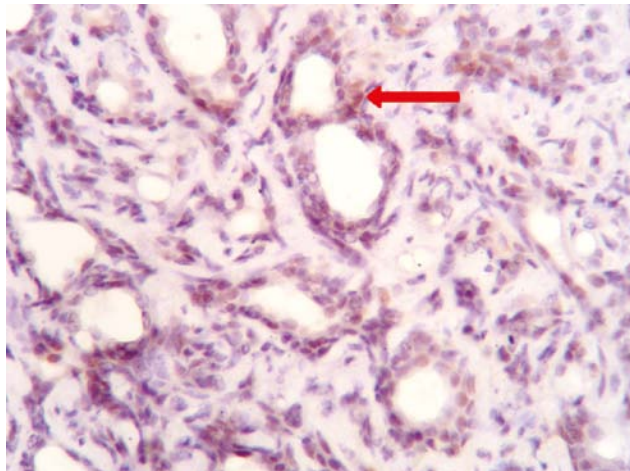
В усіх хворих із плеоморфними аденомами ураженню підлягала тільки привушна СЗ. Серед гормонів, наявних у тканинах пухлини привушної СЗ, у 3 (10,7%) — прогестерон, 2 (7,14%) — естроген (табл. 1, рис. 1, 2).

Серед аденолімфом СЗ домінували показники естрогену — 3 (75%) (табл. 2, рис. 3, 4).

У джерелах літератури достатньо давно ведеться дискусія про важливість впливу деяких гормонів на пухлиногенез. Серед основних — андроген, естроген і прогестерон — гормони, що діють через специфічні рецептори та відіграють важливу роль у рості та розвитку декількох пухлин, у тому числі карциноми ГЗ, ендометрія та передміхурової залози (Aquino G. et al., 2018). A.B. Actis (2005) вказує на певний зв'язок та схожість за гістопатологічними типами між пухлинами СЗ, ГЗ і передміхурової залози. Так, будова плеоморфної аденоми дуже схожа з мукоцеллоподібною пухлиною ГЗ.

Аналіз більшості ІГХД тканин пухлин СЗ за даними різних авторів показав, що експресія ER, AR, PR становить 7–30% для доброякісних та 30–50% — злоякісних пухлин (Nasser S.M. et al., 2003; Aquino G. et al., 2018; Can N.T. et al., 2018). При цьому деякі автори у своїх дослідженнях стверджують, що експресія ER, AR, PR не має суттєвого значення в пухлиногенезі СЗ (Teymoortash A. et al., 2001; Tarakji B., Kujan O., 2012).

Проведені нами ІГХД парафінних блоків від видалених пухлин СЗ (плеоморфні аденоми та аденолімфоми) щодо експресії ER та PR показали для плеоморфних аденом (n=28): ER — 2 (7,14%), PR — 3 (10,14%), для аденолімфом (n=4): ER — 3 (75%), a PR — 1 (25%).



**Рис 1.** Фото гістопрепарату тканин плеоморфної аденоми привушної СЗ пацієнтки П., 23 роки. Зб. 200. Слабопозитивна ядерна імуногістохімічна реакція на ER (позначено стрілкою)

**Таблиця 1.** Показники ІГХД різних типів гормонів серед плеоморфних аденом різних видів СЗ (загальна кількість обстежених — 28, позитивний результат — у 27)

Показник ІГХД	Привушна СЗ	Підщелепна СЗ	Під'язична СЗ	Малі СЗ
ER	2 (7,14%)	—	—	—
PR	3 (10,7%)	—	—	—

У 1 хворого показник був негативний! При підрахунку враховували, що у 1 хворого були позитивними одразу декілька імуногістохімічних показників.

**Таблиця 2.** Показники ІГХД різних типів гормонів серед аденолімфом СЗ (n=4)

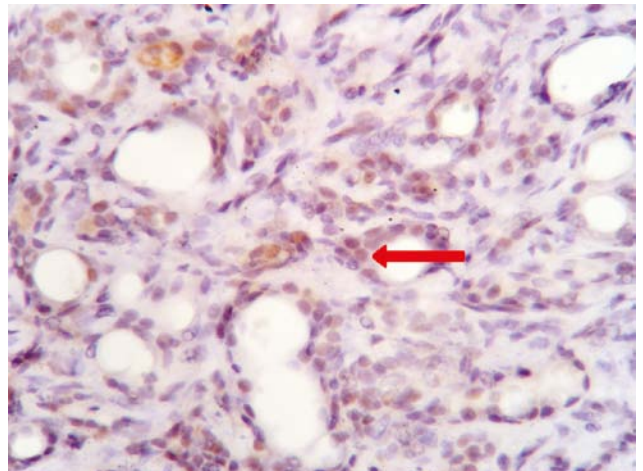
Показник ІГХД	Кількість	
	абсолютна, n	відносна, %
ER	3	75
PR	1	25

При підрахунку враховували, що у 1 хворого були позитивними одразу декілька імуногістохімічних показників. Локалізація аденолімфом в усіх 4 випадках — привушна СЗ.

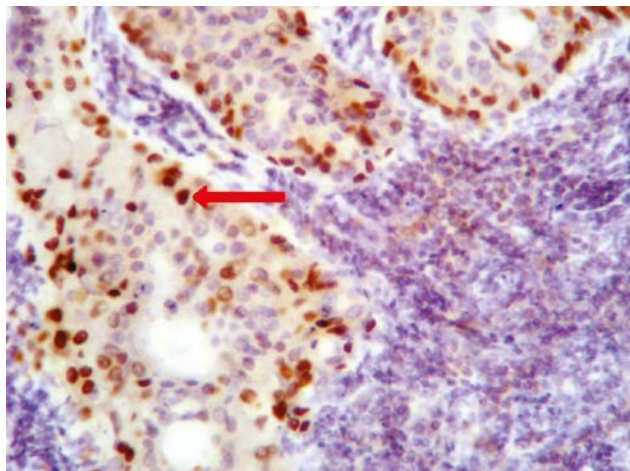
Таким чином, наші дані свідчать про достатньо низьку гормональну залежність серед плеоморфних аденом (ER — 7,14%, PR — 10,14%) та досить високу гормональну залежність серед аденолімфом (ER — 75%, PR — 25%). Зазначимо, що підвищений рівень експресії естрогену у тканинах аденолімфом може пояснюватися незначною кількістю спостережень у досліджуваній групі. Достовірно, що наявність ER та PR у тканинах пухлин СЗ може посилювати ріст пухлин лише в окремих випадках.

## Висновки

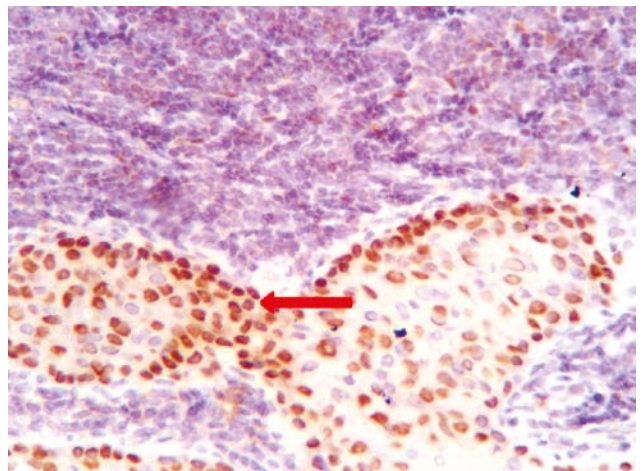
1. Серед доброякісних пухлин СЗ (плеоморфні аденоми та аденолімфоми) характерна експресія естрогену і прогестерону.
2. В усіх пацієнтів, в яких виявлені позитивні реакції на експресію естрогену та прогестерону, новоутворення локалізувались у привушних СЗ.



**Рис 2.** Фото гістопрепарату тканин плеоморфної аденоми привушної СЗ пацієнтки П., 23 роки. Зб. 200. Помірнопозитивна ядерна імуногістохімічна реакція на PR (позначено стрілкою)



**Рис 3.** Фото гістопрепарату тканин аденолімфоми привушної СЗ пацієнтки С., 65 років. Зб. 400. Сильнопозитивна імуногістохімічна реакція на ER (позначено стрілкою)



**Рис 4.** Фото гістопрепарату тканин аденолімфоми привушної СЗ пацієнтки З., 53 роки. Зб. 400. Сильнопозитивна імуногістохімічна реакція на PR (позначено стрілкою)

3. Для плеоморфних аденом СЗ (n=28) відзначали експресію прогестерону у 3 (10,7%), естрогену — у 2 (7,14%) випадках. Для аденолимфом СЗ (n=4) відзначали експресію естрогену у 3 (75%), прогестерону — 1 (25%) випадку.

### Список використаної літератури

- Actis A.B.** (2005) A hypothesis to relate salivary tumors with mammary and prostate neoplasias. *Bioinformation*, 1(1): 12–13.
- Aquino G., Collina F., Sabatino R. et al.** (2018) Sex hormone receptors in benign and malignant salivary gland tumors: prognostic and predictive role. *Int. J. Mol. Sci.*, 19(2): 399.
- Can N.T., Lingen M.W., Mashek H. et al.** (2018) Expression of hormone receptors and HER-2 in benign and malignant salivary gland tumors. *Head Neck Pathol.*, 12(1): 95–104.
- Ito F.A., Coletta R.D., Vargas P.A., Lopes M.A.** (2009) Immunohistochemical study of androgen, estrogen and progesterone receptors in salivary gland tumors. *Braz. Oral. Res.*, 23(4): 393–398.
- Kolude B., Adisa A., Adeyemi B., Lawal A.** (2013) Immunohistochemical expression of oestrogen receptor- $\alpha$  and progesterone receptor in salivary gland tumours. *J. Oral. Pathol. Med.*, 42(9): 716–719.
- Lin F.C., Chen P.L., Tsao T.Y. et al.** (2014) Prevalence of human papillomavirus and Epstein–Barr virus in salivary gland diseases. *J. Int. Med. Res.*, 42(5): 1093–1101.
- Nasser S.M., Faquin W.C., Dayal Y.** (2003) Expression of androgen, estrogen, and progesterone receptors in salivary gland tumors. Frequent expression of androgen receptor in a subset of malignant salivary gland tumors. *Am. J. Clin. Pathol.*, 119(6): 801–806.
- Ozono S., Onozuka M., Sato K., Ito Y.** (1992) Immunohistochemical localization of estradiol, progesterone, and progesterone receptor in human salivary glands and salivary adenoid cystic carcinomas. *Cell Struct. Funct.*, 17(3): 169–175.
- Prichard J.W.** (2014) Overview of automated immunohistochemistry. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 138(12): 1578–1582.
- Tarakji B., Kujan O.** (2012) Expression of oestrogen progesterone and androgen receptors in salivary gland tumours. A review of literature. *Gulf. J. Oncology*, 11: 50–59.
- Teymoortash A., Lippert B.M., Werner J.A.** (2001) Steroid hormone receptors in parotid gland cystadenolymphoma (Warthin's tumour). *Clin. Otolaryngol. Allied. Sci.*, 26(5): 411–416.

### Иммуногистохимические показатели некоторых видов гормонов среди доброкачественных опухолей слюнных желез

**В.А. Маланчук, И.С. Бродетский, М.С. Кротевич**

**Резюме.** Иммуногистохимическое исследование (ИГХИ) в диагностике новообразований слюнных желез (СЖ) остается золотым стандартом окончательной верификации опухолей наряду с патоморфологическим обследованием резектата. Среди наиболее известных маркеров — разные типы вирусов папилломы человека, цитомегаловирус, вирус Эпштейна — Барр, рецепторы к гормонам прогестерона (PR), эстрогена (ER), андрогена (AR), разные цитокиратины для подтверждения малигнизации опухолей. Большинство последних работ, посвященных возможности влияния эндокринной регуляции на ткани опухолей СЖ, свидетельствует о наличии в них PR, ER, AR. Их содержание в тканях опухолей СЖ достаточно разнообразно в зависимости от географической популяции населения. **Цель** — изучение содержания PR, ER в тканях опухолей СЖ путем ИГХИ. **Объект и методы исследования.** Гистологическое типирование новообразований СЖ проведено с использованием рутинной окраски гематоксилином и эозином и ИГХИ. Исследование проведено на материале эксцизионных биопсий СЖ (плеоморфных аденом и аденолимфом) у 32 пациентов. ИГХИ проводили с моноклональным кро-

личным антителом против человека ER («Dako IS 151», Дания), с моноклональным мышинным антителом против человека PR («Dako IR068», Дания), с использованием системы детекции «EnVision™ FLEX» («Dako», Дания). Для положительного контроля использовали тканевые образцы с определенной положительной реактивностью, для отрицательного — проводили процедуру без применения первичных антител. **Результаты.** У всех больных с плеоморфными аденомами поражению подлежала только околоушная СЖ. Среди гормонов, которые присутствовали в тканях опухоли околоушной СЖ, у 3 (10,7%) — прогестерон, у 2 (7,14%) — эстроген. Среди аденолимфом СЖ доминировал эстроген — 3 (75%). **Заключение.** Среди доброкачественных опухолей СЖ (плеоморфные аденомы и аденолимфомы) характерна экспрессия ER и PR. У всех пациентов, у которых выявлены положительные реакции на экспрессию ER и PR, новообразования локализовались в околоушных СЖ.

**Ключевые слова:** опухоли слюнных желез, плеоморфная аденома, аденолимфома, иммуногистохимическое исследование, эстроген, прогестерон.

### Immunohistochemical indices of some types of hormones among benign tumors of the salivary glands

**V.O. Malanchuk, I.S. Brodetskiy, M.S. Krotevych**

**Summary.** Immunohistochemistry (IHC) in the diagnosis of salivary glands (SG) tumors remains the gold standard for final verification of tumors, along with pathomorphological examination of the resectatum. The most prominent markers are various types of human papillomavirus, cytomegaloviruses, Epstein — Barr virus, progesterone (PR), estrogen (ER), androgen (AR) receptors, various cytokeratins to confirm tumors malignancy. The majority of recent works devoted to presence and possibility of endocrine regulation influence on SG tumors tissues testify to presence of PR, ER, AR. Their amount in SG tumors tissues is quite diverse and depends on geographical population. **Objective** — to study the amount of PR, ER in SG tumors tissues by IHC. **Materials and methods.** Histologic typing of SG tumors was performed using routine coloration with hematoxylin and eosin and IHC. The study was conducted based on excisional biopsy of SG (pleomorphic adenoma and adenolymphomas) in 32 patients. IHC was performed with Monoclonal Rabbit antibody Anti-Human ER («Dako IS 151», Denmark), Monoclonal Mouse antibody Anti-Human PR («Dako IR068», Denmark) using «EnVision™ FLEX Detection System» («Dako», Denmark). For positive control tissue samples with definite positive reactivity were used, for negative — the procedure was performed without the use of primary antibodies. **Results.** Data analysis showed that all patients with pleomorphic adenomas had only parotid SG affected. Among the hormones present in the tissues of parotid SG tumor 3 (10.7%) is progesterone, 2 (7.14%) is estrogen. Hormones indicators of estrogen dominated among SG adenolymphomas — 3 (75%). **Conclusions.** SG benign tumors (pleomorphic adenomas and adenolymphomas) are characteristic of ER and PR expression. Tumors localized in parotid SG in all patients demonstrating positive reactions to expression of ER and PR.

**Key words:** tumors of salivary glands, pleomorphic adenoma, adenolymphoma, immunohistochemistry, estrogen, progesterone.

#### Адреса для листування:

Маланчук Владислав Олександрович

03057, Київ, вул. Зоологічна, 1

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця,

кафедра хірургічної стоматології та щелепно-лицевої хірургії

E-mail: mioche@ukr.net

Отримано 07.06.2019