

ACTIVITATEA PROLIFERATIVĂ A CARCINOMULUI MAMAR DUCTAL INVAZIV ÎN FUNCȚIE DE EXPRESIA CITOKERATINEI BAZALE CK5

Veaceslav Fulga^{1,2} – dr. în șt. med., conf. univ., Oxana Mazuru² – cercet. șt.,
Valeriu David^{1,2} – dr. în șt. med., conf. univ., Vitalie Mazuru¹ – dr. în șt. med., asist.,

Lilian Șaptefrați¹ – dr. hab. în șt. med., conf. univ.,

¹Catedra de Histologie, Citologie și Embriologie, ²Laboratorul Morfologie,
IP USMF „Nicolae Testemițanu”

e-mail: vmfulga@usmf.md, tel. +373-22-205-229

Rezumat

Carcinoamele mamare pozitive la citokeratinele bazale CK5/6/17 au o evoluție agresivă, metastazează timpuriu și au un pronostic nefavorabil. Datele recente clasifică tumorile mamare în activ și lent proliferante, caracterizate prin diversă rată a recurențelor [1]. *Scopul lucrării:* evaluarea activității proliferante a celulelor tumorale în dependență de expresia citokeratinei bazale CK5. *Rezultate:* Au fost studiate histologic și imunohistochimic 116 tumori diagnosticate drept carcinom mamar ductal invaziv de tip NOS (neclasificat altfel). Majoritatea cazurilor nu au expresat CK5 (101 cazuri/87,1%), dintre care 50 cazuri/43,1% au prezentat proliferare redusă, iar 51 cazuri/44% activ proliferante. Din totalul de 15 cazuri CK5 pozitive, 13 au fost intens proliferante. *Concluzii:* Carcinomul mamar ductal invaziv de tip NOS este preponderent CK5 negativ. Tumorile CK5 pozitive sunt cu predilecție intens proliferative, iar cele CK5 negative pot fi în egală măsură activ sau lent proliferante.

Cuvinte-cheie: carcinom mamar, citokeratina bazală CK5, Ki67

Summary. Proliferative activity of ductal invasive breast carcinoma depending on the expression of basal cytokeratin CK5

Breast carcinomas which express basal cytokeratines CK5/6/17 have an aggressive evolution, early metastasize and have a poor prognosis. The recent data classify mammary tumors into slowly and fast proliferative malignancies, being characterized by a diverse rate of recurrences [1]. *The Aim:* assessment of proliferative activity of the tumor-modified cells in accordance to expression of the basal cytokeratin CK5. *Results:* there were studied histologically and immunohistochemically 116 tumors diagnosed as ductal invasive breast carcinoma of NOS (Not Otherwise Classified) type. The most of the cases did not express CK5 (101 cases/87.1%), among which 50 cases/41.1% presented low proliferative activity. From all CK5 positive cancers (15 cases), 13 had intensive proliferative pattern. *Conclusions:* ductal invasive breast carcinoma is predominantly CK5 negative. CK5 positive tumors usually exhibit an intense proliferative activity, meanwhile the CK5 negative carcinomas could have slow as well as fast proliferative pattern.

Key words: breast carcinoma, basal cytokeratin CK5, Ki67

Резюме. Проллиферативная активность инфильтративного протокового рака молочной железы в зависимости от экспрессии базального цитокератина CK5

Варианты рака молочной железы (РМЖ) экспрессирующие базальные цитокератины CK5/6/17 характеризуются агрессивным течением, ранним метастазированием и неблагоприятным прогнозом. Последние данные классифицируют РМЖ в медленно и быстро пролиферирующие опухоли, каждой из которых свойственна разная частота рецидивов [1]. *Цель исследования:* определение пролиферативной активности опухолевых клеток в зависимости от экспрессии базального цитокератина CK5. *Результаты:* были исследованы гистологически и иммуногистохимически 116 опухолей диагностированных как инфильтративный протоковый РМЖ NOS (Not Otherwise Classified) типа. Большинство опухолей не экспрессировало CK5 (101 случай/87,1%), из которых в 50 случаях/41,1% раковые клетки имели низкую пролиферативную активность. Среди опухолей положительных к CK5 (15 случаев), в 13 случаях была установлена высокая пролиферативная активность. *Выводы:* в большинстве случаев, инфильтративный протоковый РМЖ является CK5 отрицательной опухолью. CK5 положительные формы РМЖ обычно имеют высокую пролиферативную активность, в то время как CK5 отрицательные формы могут иметь в равной степени как низкую, так и высокую пролиферативную активность.

Ключевые слова: рак молочной железы, базальный цитокератин CK5, Ki67

Introducere. Cancerul mamar este o tumoare eterogenă după structură, evoluție și tipul tratamentului aplicat. Markerii contemporani utilizați au ca scop de a omogeniza vasta varietate de tipuri histologice,

de a prezice progresia tumorală și dezvoltare a terapiei personalizate. Datele recente clasifică tumorile mamare în activ și lent proliferante, caracterizate prin diversă capacitate metastatică și rată de dezvoltare a recurențelor [1]. *Scopul lucrării:* evaluarea activității proliferante a celulelor tumorale în dependență de expresia citokeratinei bazale CK5.

Material și metode. Pacienți. A fost examinat materialul biologic de la 116 paciente, colectat în decursul anilor 2012-2015 în incinta IMSP Institutul Oncologic din Republica Moldova. Pacientele nu au primit chimio-/radioterapie antecedent eseului chirurgical. Vârsta medie a pacientelor examinate a fost $56,8 \pm 1$ ani.

Metoda histologică. Țesuturile prelevate au fost fixate timp de 24-48 ore în formalină tampo-nată 10%, PH 7,2-7,4. Materialul a fost inclus în *Paraplast High Melt* (Leica Biosystems). Ulterior au fost realizate secțiuni seriate cu grosimea de 3-5 microni (*Shandon, HM355S Automatic Microtome*, Thermo Scientific, USA), etalate pe lame silanate (S3003, Dako, Denmark). Toate secțiunile au fost colorate cu hematoxină-eozină utilizând hematoxină *Harris* (HHS32, SigmaAldrich) și eozină *CS701* (Dako, Denmark). Secțiunile au fost examinate de 2 morfopatologi independenți. În studiu au fost selectate cazurile cu carcinom ductal invaziv de tip NOS (neclasificat altfel). Gradarea histopatologică am realizat-o în baza criteriilor stabilite de OMS (sistemul Scarff-Bloom-Richardson) [2].

Metoda imunohistochimică. Toate procedeele de deparafinare, demascare și vizualizare s-au efectuat automat, utilizând autostainerul *Leica Bond-Max* (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). Deparafinarea s-a efectuat în 2 băi de *Bond Dewax Solution* (cod AR9222) a 5 minute fiecare, urmată de 3 băi în alcool de 100%, 90% și 70% de 2 minute fiecare, finisate cu rehidratare de 5 minute în apă. Activitatea peroxidazei endogene a fost blocată prin tratarea secțiunilor timp de 5 minute cu *Dako REAL™ Peroxidase-Blocking Solution* (S2023, Dako). Citokeratina CK5 a fost pusă în evidență prin incubare 15 minute cu anticorpul CK5/XM26 (cod PA0468, Leica Biosystem). Receptorul nuclear de proliferare Ki67 a fost marcat cu anticorpul Ki67/K2 (cod PA0230, Leica Biosystem), după incubare timp de 15 minute. Procedurile ulterioare au fost identice pentru ambii markeri. Demascarea s-a efectuat prin încălzire cu un sistem bazat pe EDTA pH9.0 (*Bond Epitope Retrieval Solution2*, cod AR9640, Leica Biosystem). Vizualizarea receptorilor s-a efectuat cu un sistem polimeric complex, care include DAB (3,3'-diaminobenzidină tetrahidroclorid hidrat) în calitate de cromogen (*Bond Polymer Refine Detection System*, cod DS9800).

Contracolorarea nucleilor s-a efectuat cu hematoxină *Mayer*, modificată după *Lille* (HMM500, ScyTek Laboratories). Ulterior piesele histologice au fost dehidratate manual în serii crescute de alcool etilic (70-100%), clarificate cu xilen și montate. Pentru montarea pieselor am folosit soluția *Leica CV Mount* (Leica Biosystems, cod 14046430011). Cuantificarea celulelor marcate cu Ki67 s-a efectuat în baza metodei semiautomate propuse de Suci C. et al. (2014) [3]. Această metodă constă în cuantificarea a cel puțin 10 câmpuri la obiectiv x40 cu cel mai înalt număr de celule tumorale marcate (sau cel puțin 1000 celule tumorale total), finalizată prin evaluarea mediei în procente. Cuantificarea s-a efectuat la microscopul *Nikon Eclipse 80i*, cu cameră video ajustată *Nikon DS-Fi1* (Nikon Instruments Europe BV).

Pentru separarea cazurilor după activitatea proliferativă, marcată ($\geq 14\%$ celule Ki67 pozitive) sau redusă ($< 14\%$ celule Ki67 pozitive) am utilizat pragul de 14 celule tumorale Ki67 pozitive. Acest prag a fost propus de Goldhirsch A. et al. (2013) și unanim acceptat de practica oncologică [4].

Evaluarea cantitativă a markerului CK5 s-a efectuat precum: „0” – absența colorării; „+1” – colorare de intensitate scăzută a $< 10\%$ celule tumorale; „+2” – determinarea paternului membranelor sau membranelor și citoplasmatic la 10-50% celule; „+3” – colorarea intensă a mai mult de 50% celule tumorale [5]. Tumorile cu scor „+1 – +3” au fost considerate CK5 pozitive.

Metoda statistică. Rezultatele studiului au fost stocate și grupate în baza de date MS Access 2007 (Microsoft Office 2007). Analiza statistică s-a efectuat cu ajutorul soft-ului Winstat 2012.1 (R. Fitch Software, Bad Krozingen, Germany). Pentru evidențierea gradului de asociere dintre valorile markerilor utilizați în studiu am efectuat testul de corelație liniară (coeficientul Pearson (r)). În cazul Ki67 s-a determinat adițional media aritmetică $\pm$ eroarea standard și mediana. Rezultatele au fost considerate statistic semnificative la un $p \leq 0,05$.

Rezultate. Tumorile au fost repartizate după gradul de diferențiere precum: G1 – 6 cazuri/5,2%, G2 – 69 cazuri/59,5% și G3 41 cazuri/35,3%. Majoritatea cazurilor au fost evaluate drept CK5 negative (101 cazuri/87,1%). În baza indicelui Ki67 cazurile au fost repartizate în: 52 cazuri/44,8% cu proliferare redusă, 64 cazuri/55,2% cu proliferare marcată. Valoarea medie a Ki67 a constituit $21,4 \pm 1,8$, cu o mediană de 15. Cazurile CK5 negative au prezentat practic aceeași activitate proliferativă: 50 cazuri/43,1% proliferare redusă, 51 cazuri/44% activ proliferante. Din totalul de 15 cazuri CK5 pozitive, 13 au prezentat un indice Ki67 înalt (Tabelul 1).

Tabelul 1
Activitatea proliferativă a carcinomului mamar ductal invaziv de tip NOS în dependență de expresia CK5 și gradul de diferențiere al tumorii

CK5	Proliferare	Gradul de diferențiere	n	%
0	marcată	G1	1	0,9
0	marcată	G2	17	14,7
0	marcată	G2	10	8,6
0	marcată	G3	17	14,7
0	marcată	G3	6	5,2
0	redușă	G1	3	2,6
0	redușă	G1	1	0,9
0	redușă	G2	25	21,6
0	redușă	G2	9	7,8
0	redușă	G3	12	10,3
1	marcată	G2	3	2,6
1	marcată	G2	1	0,9
1	marcată	G3	2	1,7
1	redușă	G2	1	0,9
2	marcată	G1	1	0,9
2	marcată	G2	1	0,9
2	marcată	G3	2	1,7
2	redușă	G2	1	0,9
3	marcată	G2	1	0,9
3	marcată	G3	2	1,7

La compararea rezultatelor studiului dat am determinat o corelație pozitivă dintre activitatea proliferativă a tumorii și expresia CK5 (Tabelul 2).

Tabelul 2
Testul de corelație lineară dintre indicele de proliferare Ki67, gradul de diferențiere al tumorii, vârsta pacientelor și expresia citokeratinei bazale CK5

	Ki67	Gradul de diferențiere	Vârsta	CK5
Ki67				
r		0,27	0,06	0,40
p		0,002	0,27	0,001
Gradul de diferențiere				
r	0,27		0,18	0,05
p	0,002		0,02	0,29
Vârsta				
r	0,06	0,18		-0,08
p	0,27	0,02		0,19
CK5				
r	0,40	0,05	-0,08	
p	0,001	0,29	0,19	

Notă: r – coeficientul de corelație Pearson. Rezultatele semnificativ statistic ($p \leq 0,05$) sunt selectate cu **BOLD**.

Discuții. Țesutul glandular mamar constă dintr-o gamă largă de populații celulare, imunohistochimic distincte: celule stem ($CD49^+$, $CD24^+$, $ALDH^+$), celule stem comitate, bipotente ($CK5^+$), celule comitate în direcție glandulară ($CK5^+/CK8/18/19^+$), glandulocite mature ($CK8/18/19^+$), precursori mioepiteliali ($CK5/6^+/SMA^+$) și mioepiteliocite diferențiate (SMA^+) [6]. Citokeratinele sunt filamente intermediare ce conferă individualitate celulelor epiteliale de diversă localizare. Celulele CK5 pozitive sunt localizate în segmentul bazal al unității terminale ductal-lobulare și reprezintă sursa comună pentru dezvoltarea celulelor glandulare și mioepiteliale. Odată cu diferențierea, celulele pierd această citokeratină, înlocuind-o cu filamente $CK8/18/19^+$ în cazul glandulocitelor sau SMA^+ (smooth muscle actin) în mioepiteliocite. CK5 este frecvent utilizat în diferențierea patologiilor non-invazive de cele invazive, cum ar fi cicatricea radială vs carcinom invaziv G1, papilom intraductal vs carcinom intraductal papilar. Odată cu definirea subtipurilor moleculare de către Perou CM et al. (2000) acest marker este utilizat pentru a pune în evidență subtipul Basal-like [7]. Acestui tip de carcinom îi este caracteristică o slabă diferențiere (G3) și un potențial invaziv sporit. Rakha EA et al. (2008) consideră subtipul Basal-like drept unul agresiv, cu pronostic rezervat, indiferent de statutul nodal și dimensiunea tumorii [8]. Carcinomul CK5 pozitiv de asemenea se evidențiază printr-o incidență sporită a metastazelor viscerale, îndeosebi la nivel de plămân și creier. Imunohistochimic așa tumori sunt suplimentar caracterizate ca estrogen, progesteron, HER2 negative și p53 pozitive. Rezultatele noastre confirmă datele lui Joensuu K et al. (2013), care au demonstrat că statutul pozitiv al CK5 corelează cu tipul ductal al tumorii, cu gradul scăzut de diferențiere și cu absența expresiei de ER. [1] Aceste date corespund și afirmațiilor lui Rao C. et al. (2013), precum că tumorile CK5 pozitive sunt intens proliferative [9].

Ki67 este o proteină nucleară non-histonă expresată de celulă în toate fazele ciclului celular, cu excepția G0. Numeroase studii de profil au demonstrat valoarea pronostică a acestui marker în diverse tumori [10,11]. În cazul carcinomului mamar acest marker a demonstrat o corelație înaltă cu gradul de diferențiere și vârsta pacientelor. În opinia lui Keam B. et al. (2007, 2011) indicele Ki67 înalt vorbește în favoarea unui răspuns adecvat la chimioterapie comparativ cu tumorile slab proliferante, deși pronosticul rămâne a fi unul rezervat [12,13]. Conform datelor lui Joensuu K. et al. (2013) indicele Ki67 definește

2 tipuri de tumori: expresia sporită este caracteristică pentru tumori rapid-recurente, iar un Ki67 redus caracterizează un carcinom tardiv-recurent [1]. Rao C. et al. (2013) au evidențiat că carcinoamele mamare tind să prolifereze activ, iar această tendință este mai exprimată în cazul tumorilor CK5 negative [9]. În studiul nostru am demonstrat că tumorile luminal diferențiate, CK5 negative pot avea atât activitate proliferativă înaltă, cât și redusă, pe când carcinoamele bazale, CK5 pozitive sunt în majoritate activ proliferante.

Concluzie. Carcinomul mamar ductal invaziv de tip NOS este preponderent CK5 negativ. Tumorile CK5 pozitive sunt cu predilecție intens proliferative, iar cele CK5 negative pot fi în egală măsură activ sau lent proliferante.

Mulțumiri. Prim autorul ține să mulțumească Dlui profesor Marius Raica și întregului colectiv al Departamentului de Morfologie Microscopică și Histologie, Centrului de Cercetări în Angiogenează al Universității de Medicină și Farmacie "Victor Babeș", Timișoara, România prin suportul enorm al cărora această cercetare a fost realizată. Această lucrare a fost realizată cu suportul Academiei de Științe a Moldovei, proiect instituțional de cercetări 15.817.04.09F, contract nr. 55 Inst din 06.03.2015.

Bibliografie

1. Joensuu K., Leidenius M., Kero M., Andersson L.C., Horwitz K.B., Heikkilä P. *ER, PR, HER2, Ki-67 and CK5 in Early and Late Relapsing Breast Cancer-Reduced CK5 Expression in Metastases*. Breast Cancer (Auckl). 2013; 7:23-34.
2. Tavassoli F.A., Devilee P. *Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs*. Lyon, IARC, 2003.
3. Suciuc C., Muresan A., Cornea R., Suciuc O., Dema A., Raica M. *Semi-automated evaluation of Ki-67 index in invasive ductal carcinoma of the breast*. Oncol. Lett., 2014; 7(1):107-114.
4. Goldhirsch A., Winer E.P., Coates A.S., Gelber R.D., Piccart-Gebhart M., Thürlimann B., Senn H.J., Panel members. *Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International*

Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer. Ann. Oncol., 2013; 24(9):2206-23.

5. Azoulay S., Laé M., Fréneaux P., Merle S., Al Ghuzlan A., Chnecker C., Rosty C., Klijanienko J., Sigal-Zafrani B., Salmon R., Fourquet A., Sastre-Garau X., Vincent-Salomon A. *KIT is highly expressed in adenoid cystic carcinoma of the breast, a basal-like carcinoma associated with a favorable outcome*. Mod. Pathol., 2005; 18:1623-31.

6. Abd El-Rehim D.M., Pinder S.E., Paish C.E., Bell J., Blamey R.W., Robertson J.F., Nicholson R.I., Ellis I.O. *Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma*. J. Pathol., 2004; 203(2):661-71.

7. Perou C.M., Sorlie T., Eisen M.B., van de Rijn M., Jeffrey S.S., Rees C.A., Pollack J.R., Ross D.T., Johnsen H., Akslen L.A., Fluge O., Pergamenschikov A., Williams C., Zhu S.X., Lønning P.E., Børresen-Dale A.L., Brown P.O., Botstein D. *Molecular portraits of human breast tumours*. Nature., 2000; 406:747-752.

8. Rakha E.A., Reis-Filho J.S., Ellis I.O. *Basal-like breast cancer: A critical review*. J. Clin. Oncol. 2008; 26:2568-81.

9. Rao C., Shetty J., Prasad K.H. *Immunohistochemical profile and morphology in triple - negative breast cancers*. J. Clin. Diagn. Res., 2013; 7(7):1361-5.

10. Sahin AA, Ro J, Ro JY, Blick M.B., el-Naggar A.K., Ordonez N.G., Fritsche H.A., Smith T.L., Hortobagyi G.N., Ayala A.G. *Ki-67 immunostaining in node-negative stage I/II breast carcinoma. Significant correlation with prognosis*. Cancer., 1991;68(3):549-57.

11. Keshgegian AA, Cnaan A. *Proliferation markers in breast carcinoma. Mitotic figure count, S-phase fraction, proliferating cell nuclear antigen, Ki-67 and MIB-1*. Am J Clin Pathol., 1995;104(1):42-9.

12. Keam B, Im SA, Kim HJ, Oh DY, Kim JH, Lee SH, Chie EK, Han W, Kim DW, Moon WK. Kim TY, Park IA, Noh DY, Heo DS, Ha SW, Bang YJ. *Prognostic impact of clinicopathologic parameters in stage II/III breast cancer treated with neoadjuvant docetaxel and doxorubicin chemotherapy: paradoxical features of the triple negative breast cancer*. BMC. Cancer., 2007; 7:203.

13. Keam B, Im SA, Lee KH, Han SW, Oh DY, Kim JH, Lee SH, Han W, Kim DW, Kim TY, Park IA, Noh DY, Heo DS, Bang YJ. *Ki-67 can be used for further classification of triple-negative breast cancer into two subtypes with different response and prognosis*. Breast. Cancer. Res., 2011; 13 (2):R22.