

EXPRESIA MARKERULUI PRO-APOPTOTIC P53 ÎN DEPENDENȚĂ DE ACTIVITATEA PROLIFERATIVĂ A CARCINOMULUI MAMAR DUCTAL INVAZIV

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.,

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

Mutațiile p53 sunt cele mai frecvente anomalii genetice identificate în neoplazii. În carcinomul mamar mutațiile p53 sunt asociate cu un decurs agresiv și pronostic nefavorabil. *Scopul lucrării:* expresia markerului pro-apoptotic p53 în dependență de activitatea proliferativă a carcinomului mamar ductal invaziv de tip NOS (neclasificat altfel). *Material și metode:* au fost studiate histologic și imunohistochimic (markerii p53/DO-7 și Ki67/K2) 87 tumori primare. Vârsta medie a pacientelor a constituit 57,6±1,2 ani. *Rezultate:* În 35 cazuri/40,2% tumoarea a fost cuantificată p53 negativă. Cazurile p53 pozitive au fost repartizate precum urmează: +1 – 12 cazuri/13,8%, +2 – 22 cazuri/25,3% și +3 în 18 cazuri/20,7%. La compararea expresiei p53 și Ki67 am determinat că tumorile p53 negative sunt preponderent slab proliferante (23 cazuri/26,4% sub 14% față de 12 cazuri/13,8% “≥14”). Tumorile p53 pozitive au fost în marea majoritate (39 cazuri/44,8%) intens proliferante și doar 13 cazuri/15% au avut un potențial mitotic redus. *Concluzii:* expresia markerului pro-apoptotic p53 denotă în majoritatea cazurilor o sporire a activității proliferative a tumorii. Tumorile p53 negative sunt preponderent slab proliferante.

Cuvinte-cheie: cancer mamar, apoptoză, p53

Summary. Expression of proo-apoptotic marker p53 depending on the proliferative activity of ductal invasive carcinoma

Mutations of p53 gene are the oftenest abnormalities identified within the neoplasia. In mammary carcinoma p53 mutations are associated aggressive evolution and poor prognosis. *The Aim:* expression of the pro-apoptotic marker p53 depending on the proliferative activity of ductal invasive breast carcinoma of NOS type. *Material and methods:* were assessed histologically and immunohistochemically (p53/DO-7 and Ki67/K2 markers) 87 primary tumors. *Results:* in 35 cases/40,2% the tumor was p53 negative. Positive cases for p 53 presented an intensity of reaction as follows: +1 – 12 cases/13,8%, +2 – 22 cases/25,3% and +3 in 18 cases/20,7%. When compared the expression of p53 with Ki67, it has been remarked that p53 negative tumors are predominantly weakly proliferative (23 cases/26,4% less than 14% in contrast to 12 cases/13,8% as “≥14”). On the other hand, p53 positive tumors in most of the cases (39 cases/44,8%) were strongly proliferative and only 13 cases/15% had a reduced mitotic potential. *Conclusions:* expression of the pro-apoptotic marker p53 indicates in most of the cases on an enhanced mitotic activity of the tumor cells. The p53 negative tumor usually presents low proliferative activity.

Key words: breast cancer, apoptosis, p53

Резюме. Экспрессия проапоптотического маркера p53 в зависимости от пролиферативной активности инфильтративного протокового рака молочной железы

Мутации гена p53 являются самыми частыми аномалиями, выявленными при опухолевых заболеваниях. При раке молочной железы (РМЖ), данные мутации ассоциируются с агрессивным течением и неблагоприятным прогнозом. *Цель исследования:* изучить особенности экспрессии проапоптотического маркера p53 в зависимости от пролиферативной активности инфильтративного протокового РМЖ NOS типа. *Материал и методы исследования:* были изучены гистологически и иммуногистохимически (с использованием маркеров p53/DO-7 и Ki67/K2) 87 первичных опухолей. *Результаты:* в 35 случаях (40,2%) опухоль была p53 отрицательной. Положительные случаи имели следующую интенсивность экспрессии: +1 – 12 случаев/13,8%, +2 – 22 случаев /25,3% и +3 в 18 случаях /20,7%. Сравнив экспрессию p53 с экспрессией Ki67, было выявлено, что p53 отрицательные опухоли являются слабо пролиферирующими (23 случая/26,4% меньше чем 14% в сравнении с 12 случаями /13,8% “≥14”). Напротив, p53 положительные опухоли в большинстве случаев (39 случаев /44,8%) были активно пролиферирующими и только в 13 случаях представляли слабо выраженный митотический потенциал. *Выводы:* экспрессия проапоптотического маркера p53, в большинстве случаев, указывает на повышенный митотический потенциал раковых клеток. p53 отрицательные опухоли обычно имеют низкую пролиферативную активность.

Ключевые слова: рак молочной железы, апоптоз, p53

Introducere. Mutațiile de genă p53 sunt înregistrate în cca 1/3 cazuri de carcinom mamar. Imunohistochimic aceste aberații sunt detectate sub formă de expresie nucleară în exces a p53 în celulele tumorale. În opinia lui Allred DC et al. (1998) acest marker are o valoare prognostică și predictivă, iar tumorile p53 pozitive sunt agresive și timpuriu metastazează [1]. Statutul nefast al tumorilor p53 pozitive este agravat la supraexpresia simultană a HER2 [2]. Scopul lucrării: studiul expresiei markerului pro-apoptotic p53 în dependență de activitatea proliferativă a carcinomului mamar ductal invaziv de tip NOS.

Material și metode. Pacienți. Au fost investigate 87 cazuri, morfologic diagnosticate drept carcinom ductal invaziv de tip NOS. Vârsta medie a pacientelor a constituit $57,6 \pm 1,2$ ani, mediana 58. Toate cazurile au fost colectate în IMSP Institutul Oncologic din Republica Moldova în perioada 2012-2015.

Metoda histologică. Materialul biologic a fost fixat timp de 24-48 ore în formalină tamponată 10%, PH 7,2-7,4. Ulterior acesta a fost inclus în *Paraplast High Melt* (Leica Biosystems). Secțiunile seriate de 3-5 microni grosime au fost realizate cu microtomul *Shandon, HM355S Automatic Microtome* (Thermo Scientific, USA) și etalate ulterior pe lame silanate (S3003, Dako, Denmark). Diagnosticul morfologic și gradul de diferențiere al tumorii au avut la bază secțiuni colorate cu hematoxilină-eozină (hematoxilină *Harris HHS32*, SigmaAldrich și eozină *CS701*, Dako, Denmark): Gradarea histopatologică am realizat-o folosind sistemul Scarff-Bloom-Richardson, recomandat de OMS, 2003 [3].

Metoda imunohistochimică. Toate procedeele imunohistochimice s-au realizat în regim automat cu *Leica Bond-Max* (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) autostainer. Acestea au inclus: deparafinarea 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 în apă timp de 5 minute. Pentru blocarea activității peroxidazei endogene secțiunile au fost tratate timp de 5 minute cu *Dako REAL™ Peroxidase-Blocking Solution* (S2023, Dako). Receptorul pro-apoptotic p53 a fost pus în evidență prin incubare 15 minute cu anticorul P53/DO-7 (cod PA0057, Leica Biosystem). Markerul nuclear de proliferare Ki67 a fost pus în evidență cu anticorul Ki67/K2 (cod PA0230, Leica Biosystem), după incubare timp de 15 minute. Procedeele ulterioare au fost identice pentru ambii markeri. Demascarea s-a efectuat cu *Bond Epitope Retrieval Solution2* (cod AR9640, Leica Biosystem), un sistem de demascare prin încălzire, bazat pe soluție de EDTA pH9.0. Vizualizarea receptorului s-a efectuat cu *Bond Polymer Refine Detection System* (cod DS9800), care include DAB (3,3'-diaminobenzi-

dină tetrahidroclorid hidrat) în calitate de cromogen. Contracolorarea nucleilor s-a efectuat cu hematoxilină *Mayer*, modificată după *Lille* (HMM500, ScyTek Laboratories). În final, piesele histologice au fost dehidratate manual în serii crescute de alcool etilic (70-100%), clarificate cu xilen și montate cu soluția *Leica CV Mount* (Leica Biosystems, cod 14046430011).

Cuantificarea celulelor marcate cu Ki67 s-a efectuat în baza metodei semiautomate propuse de Suciuc et al. (2014) [4]. Această metodă prevede cuantificarea a cel puțin 10 câmpuri la obiectiv x40 cu cel mai înalt număr de celule tumorale marcate (sau cel puțin 1000 celule tumorale per total), finalizată cu evaluarea mediei procentuale. Cuantificarea s-a efectuat la microscopul *Nikon Eclipse 80i*, cu cameră video ajustată *Nikon DS-Fi1* (Nikon Instruments Europe BV). Cazurile au fost clasificate în 2 grupe: cu activitate proliferativă marcată ($\geq 14\%$ celule Ki67 pozitive) și redusă ($< 14\%$ celule Ki67 pozitive). Separarea s-a efectuat în acord cu recomandările lui Goldhirsch A. et al. (2013) [5].

Scorificarea markerului nuclear p53 a fost efectuată în baza recomandărilor Yamashita et al. (2004), precum: **0** – lipsa colorării nucleare; **+1** – $< 10\%$ din celule pozitive; **+2** – 10-30% celule cu pattern nuclear specific; **+3** – $> 30\%$ din celulele tumorale colorate specific. Cazurile +1 - +3 au fost considerate pozitive [6].

Metoda statistică. Rezultatele 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). Gradul de asociere dintre valorile markerilor utilizați în studiu s-a apreciat prin testul de corelație lineară (coeficientul Pearson (r)). În cazul Ki67 și vârstei pacientelor 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 – 5 cazuri/5,8%, G2 – 47 cazuri/54% și G3 – 35 cazuri/40,2%. În 35 cazuri/40,2% tumoarea a fost cuantificată drept p53 negativă. Cazurile p53 pozitive au fost repartizate precum urmează: +1 – 12 cazuri/13,8%, +2 – 22 cazuri/25,3% și +3 în 18 cazuri/20,7%.

Valoarea medie pentru Ki67 a fost calculată la $23,2 \pm 2,2$, cu o mediană de 18,3. La aplicarea baremului de 14% am constatat prevalența cazurilor activ proliferante (51 cazuri/58,6%) față de cele cu un indice Ki67 redus (36 cazuri/41,4%).

La compararea expresiei p53 și Ki67 am determinat că tumorile p53 negative sunt preponderent slab proliferante (23 cazuri/26,4% sub 14% față de 12 cazuri/13,8% " $\geq 14\%$ ") (Tabelul 1). Un alt raport s-a deter-

minat în cazul tumorilor p53 pozitive: în marea majoritate (39 cazuri/44,8%) sunt intens proliferante și doar 13 cazuri/15% au un potențial proliferativ redus.

Tabelul 1

Numărul cazurilor în dependență de expresia p53, indicele de proliferare Ki67 și gradul de diferențiere al tumorii

p53	Indicele Ki67	Gradul de diferențiere	n	%
0	înalt	G1	1	1,1
0	înalt	G2	5	5,7
0	înalt	G3	6	6,9
0	redus	G1	3	3,4
0	redus	G2	12	13,8
0	redus	G3	8	9,2
1	înalt	G2	5	5,7
1	înalt	G3	6	6,9
1	redus	G2	1	1,1
2	înalt	G2	9	10,3
2	înalt	G3	4	4,6
2	redus	G2	7	8,0
2	redus	G3	2	2,3
3	înalt	G1	1	1,1
3	înalt	G2	6	6,9
3	înalt	G3	8	9,2
3	redus	G2	2	2,3
3	redus	G3	1	1,1
Total			87	100

De remarcat, că expresia p53 a corelat pozitiv cu valoarea Ki67. Deși, gradul de asociere a fost unul de talie joasă ($r=0,29$), acesta a fost unul statistic semnificativ ($p<0,003$). În plus, activitatea proliferativă a tumorii a fost pozitiv asociată cu gradul de diferențiere (Tabelul 2).

Tabelul 2

Gradul de asociere după Pearson dintre p53, Ki67, gradul de diferențiere al tumorii și vârsta pacienților

	p53	Ki67	Gradul de diferențiere	Vârsta
p53				
r		0,29	0,07	-0,05
p		0,003	0,268	0,317
Ki67				
r	0,29		0,22	0,12
p	0,003		0,021	0,136
Gradul de diferențiere				
r	0,07	0,22		0,24
p	0,268	0,021		0,013

Notă: cu **Bold** sunt selectate rezultatele statistic semnificative ($p\leq 0,05$).

Discuții. Gena p53 este localizată pe brațul scurt al cromozomului 17 și codifică sinteza a unei fosfoproteine nucleare. Aceasta are un rol vital în reglarea ciclului celular, declanșând apoptoza la afectarea genomului [7]. În celulele nealterate, proteina p53 (numită încă *wild-type p53 protein*) este prezentă preț de câteva minute și rapid degradată de proteosome [8]. Mutațiile de genă p53 însă rezultă cu o proteină stabilă la degradare, care se acumulează în exces în nucleu [9]. În carcinomul mamar mutațiile de genă p53 sunt înregistrate în cca 25% cazuri [10]. În opinia lui Dookeran KA et al. (2010), markerul p53 pozitiv este asociat cu tumori agresive, slab diferențiate, estrogen (ER) și progesteron (PR) negative [11]. Autorul consideră că markerul p53 pozitiv este caracteristic pentru subtipul molecular Basal-like. Însă aceste date au fost contestate de Yang P. et al. (2013) care nu au semnalat asocieri statistice cu ER, PR sau HER2, în schimb au evidențiat o rată sporită a metastazelor la distanță în cazul tumorilor p53 pozitive [9]. În studiul nostru expresia p53 a corelat cu intensitatea proliferativă a tumorii, însă asocieri statistic semnificative cu gradul tumorii nu au fost semnalate (Tabelul 2). În plus am determinat că tumorile p53 pozitive sunt preponderent activ proliferante, comparativ cu cele p53 negative care au un indice mitotic diminuat.

În conformitate cu datele lui Wedin R. et al. (2004) tumorile ER pozitive au oasele drept țintă primară a metastazelor, pe când carcinoamele Basal-like și HER2 pozitive au ca prioritar sediul visceral, inclusiv sistemul nervos central [12]. Totodată Yang P. et al. (2013) susține că expresia p53 de către celulele tumorale este un semn pronostic negativ, din motiv că așa tumori dezvoltă precoce metastaze viscerale [9]. Astfel p53, de rând cu ER, PR și HER2 devine o țintă promițătoare în tratamentul carcinomului mamar.

Concluzii: expresia markerului pro-apoptotic p53 denotă în majoritatea cazurilor o sporire a activității proliferative a tumorii. Tumorile p53 negative sunt preponderent slab proliferante.

Mulțumiri. Autorii țin 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. Allred D.C., Harvey J.M., Berardo M., Clark G.M. *Prognostic and predictive factors in breast cancer by im-*

munohistochemical analysis. Mod. Pathol., 1998;11:155–168.

2. Beenken S.W., Grizzle W.E., Crowe D.R., Conner M.G., Weiss H.L., Sellers M.T., Krontiras H., Urist M.M., Bland K.I. *Molecular biomarkers for breast cancer prognosis: coexpression of c-erbB-2 and p53*. Ann. Surg., 2001; 233:630–638.

3. Tavassoli F.A., Devilee P. *Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs*. Lyon, IARC, 2003.

4. Suciu C., Muresan A., Cornea R., Suciu 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.

5. 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.

6. Yamashita H., Nishio M., Toyama T., Sugiura H., Zhang Z., Kobayashi S., Iwase H. *Coexistence of HER2 over-expression and p53 protein accumulation is a strong prognostic molecular marker in breast cancer*. Breast Cancer. Res., 2004; 6(1):R24-30.

7. Nakopoulou L.L., Alexiadou A., Theodoropoulos G.E., Lazaris A.C., Tzonou A., Keramopoulos A. *Prognostic significance of the co-expression of p53 and c-erbB-2 proteins in breast cancer*. J Pathol., 1996 ;179(1):31-8.

8. Dai M.S., Sun X.X., Lu H. *Aberrant expression of nucleostemin activates p53 and induces cell cycle arrest via inhibition of MDM2*. Mol. Cell. Biol., 2008; 28(13):4365-76.

9. Yang P., Du C.W., Kwan M., Liang S.X., Zhang G.J. *The impact of p53 in predicting clinical outcome of breast cancer patients with visceral metastasis*. Sci. Rep., 2013; 3:2246.

10. Alsner J., Yilmaz M., Guldberg P., Hansen L.L., Overgaard J. *Heterogeneity in the clinical phenotype of TP53 mutations in breast cancer patients*. Clin Cancer Res., 2000; 6(10):3923-31.

11. Dookeran K.A., Dignam J.J., Ferrer K., Sekosan M., McCaskill-Stevens W., Gehlert S. *p53 as a marker of prognosis in African-American women with breast cancer*. Ann. Surg. Oncol., 2010; 17(5):1398-405.

12. Wedin R., Skoog L., Bauer H.C. *Proliferation rate, hormone receptor status and p53 expression in skeletal metastasis of breast carcinoma*. Acta Oncol., 2004; 43(5):460-6.