

STABILITATEA CITOKERATINEI BAZALE CK5 ÎN PROCESUL DE METASTAZARE A CARCINOMULUI MAMAR

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 de morfologie,
IP USMF „Nicolae Testemițanu”

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

Rezumat

Cancerul de sân este lider printre cauzele deceselor la femei. Evoluția metastatică a acestuia se caracterizează prin instabilitatea profilului molecular. *Scopul lucrării:* evaluarea expresiei citokeratinei bazale CK5 în procesul de metastazare a carcinomului mamar ductal invaziv de tip NOS (neclasificat altfel). *Material și metode:* 135 de paciente în stadii clinice avansate, fără chimio/radioterapie antecedenteseului chirurgical. Specimenele au fost evaluate histologic (tipul, gradul), imunohistochimic (markerul CK5/XM26), datele au fost supuse analizei statistice. *Rezultate:* carcinomul mamar de tip NOS în majoritatea cazurilor este CK5 negativ (119 cazuri/88,1%). Expresia CK5 în sediul limfonodal a fost una diferită în 8 cazuri/8,8% de cea din tumora primară. *Concluzii:* Odată cu înaintarea în vârstă scade gradul de diferențiere al carcinomului ductal invaziv de tip NOS. Această tumoare în majoritatea cazurilor nu expresează citokeratina bazală CK5. Markerul dat este instabil pe parcursul metastazării, evoluând atât în direcția achiziționării, cât și pierderii expresiei, ultimul tip de transfer constituind majoritatea.

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

Summary. Stability of basal cytokeratin ck5 in the process of metastasizing of mammary carcinoma

Nowadays, mammary carcinoma is the leading cause of deaths among women. Its metastatic evolution is characterized by the instability of molecular profile. *The Aim:* assessment of basal cytokeratin CK5 expression in the metastatic process of mammary ductal invasive carcinoma of NOS (Not Otherwise Specified) type. *Material and methods:* 135 patients with clinically advanced mammary carcinoma, with no chemo/radiotherapy before the surgical intervention. Specimens were evaluated histologically (type, grade) and immunohistochemically (marker CK5/XM26), obtained data have been statistically analyzed. *Results:* mammary carcinoma of the NOS type in the most of the cases is CK5 negative (119 cases/88,1%). Expression of CK5 in the lymph nodes was different in 8 cases (8,8%) in contrast to the primary tumor. *Conclusions:* as older, the grade of differentiation in mammary carcinoma of the NOS type tends to decrease. In most of the cases, this type of tumor does not express CK5. This marker is not stable during the metastasizing and might be either acquired or lost, the last type of transfer being more common.

Key words: breast carcinoma, basal cytokeratin CK5, metastases

Rezюме. Стабильность базального цитокератина ck5 в процессе метастазирования рака молочной железы

На сегодняшний день, рак молочной железы (PMЖ) является главной причиной смертности среди женского населения. Эволюция метастазов характеризуется нестабильностью молекулярного профиля опухолевых клеток. *Цель исследования:* определение экспрессии базального цитокератина CK5 в процессе метастазирования инфильтративного протокового PMЖ NOS (Not Otherwise Classified) типа. *Материал и методы исследования:* 135 случаев в поздней клинической стадии, без химио/радиотерапии предшествующей хирургическому вмешательству. Образцы были исследованы гистологически и иммуногистохимически, используя маркер CK5/XM26. Полученные данные были статистически обработаны. *Результаты:* инфильтративный протоковый PMЖ NOS типа в большинстве случаев (n=119/88,1%) CK5 отрицателен. Экспрессия CK5 в лимфатических узлах отличалась от первичной опухоли в 8 случаях (8,8%). *Выводы:* с возрастом, степень дифференциации инфильтративного протокового PMЖ NOS типа имеет тенденцию к уменьшению. В большинстве случаев, этот вид PMЖ CK5 отрицателен. Данный маркер нестабилен и в процессе метастазирования, его экспрессия может быть приобретена либо утрачена, последний вид эволюции, будучи более характерным.

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

Introducere. Cancerul de sân este lider în cauza deceselor la femei. Este caracterizat printr-o rată înaltă a recurențelor locale și la distanță. Explorarea profilului molecular are drept scop evidențierea markerilor cu putere prognostică și/sau predictivă, precum și elaborarea unui tratament personalizat. Citokeratina CK5 definește tumorile mamare de origine ductală, compartimentul bazal. În structura moleculară a carcinomului mamar pozitivitatea acestui marker este asociată cu subtipul Basal-like și tumori cu mutații de genă BRCA1 [1]. Una din particularitățile comune ale tumorilor maligne este dezvoltarea invadopodilor și metastazarea [2]. Proprietățile metastatice ale tumorii nu sunt în totalitate inerente și sunt puternic influențate de celulele stromale. *Scopul lucrării:* studiul comparativ al expresiei citokeratinei bazale CK5 în tumora primară vs metastaza limfonodală axilară ipsilaterală.

Material și metode. Pacienți. Expresia citokeratinei bazale CK5 a fost studiată pe un lot de 135 tumori colectate la IMSP Institutul Oncologic din Republica Moldova în 2012-2015. În toate cazurile selectate s-a diagnosticat carcinom mamar ductal invaziv de tip NOS în stadii clinice avansate. Toate pacientele nu au primit chimio-/radioterapie antecedent eseului chirurgical. Pacientele au fost repartizate după grupa de vârstă precum urmează: „până la 49” – 37 cazuri/27,4% și „după 49” – 98 cazuri/72,6%.

Metoda histologică și imunohistochimică. Țesăturile prelevate au fost fixate timp de 24-48 ore în formalină tamponată 10%, PH 7,2-7,4 și incluse în *Paraplast High Melt* (Leica Biosystems). Specimenele au fost evaluate histologic (tipul, gradul de diferențiere după Scarff-Bloom-Richardson), imunohistochimic (markerul CK5/XM26, cod PA0468, Leica Biosystem, incubare 15 minute) [3]. Intru evitarea divergențelor posibile legate de procesarea materi-

alului, tumora primară și metastaza limfonodală au fost incluse în același bloc. Toate procedeele de deparafinare (*Bond Dewax Solution*, cod AR9222, Leica Biosystem), demascare (*Bond Epitope Retrieval Solution2*, cod AR9640) și vizualizare (*Bond Polymer Refine Detection System*, cod DS9800), s-au efectuat automat, utilizând *Leica Bond-Max* (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) autostainer. Contracolorarea nucleilor s-a efectuat cu hematoxilină *Mayer*, modificată după *Lille* (HMM500, Scy-Tek Laboratories). Evaluarea cantitativă a markerului CK5 s-a efectuat în corespundere cu sistemul de gradare propus de Azoulay S. et al. (2005), interpretat 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. Tumorile cu scor „+1 – +3” au fost considerate CK5 pozitive [4]. **Metoda statistică.** Analiza statistică s-a efectuat cu ajutorul soft-ului Winstat 2012.1 (R. Fitch Software, Bad Krozingen, Germany). Diferența dintre 2 grupuri de variabile cantitative s-a efectuat prin testul t-Student. Pentru evidențierea gradului de asociere dintre valorile markerilor utilizați în studiu am efectuat teste de corelație a rangurilor (coeficient Spearman (r_s)). Gradul asocierii s-a analizat în corespundere cu recomandările lui Evans JD [5]. În toate procedeele, valoarea de prag pentru rezultatele semnificativ statistice a fost stabilită la un $p \leq 0,05$.

Rezultate. Tumora primară în majoritatea cazurilor a fost CK5 negativă – 119 cazuri/88,1%. Cazurile pozitive au fost repartizate după scor în felul următor: „+1” – 9 cazuri/6,6%, „+2” – 4 cazuri/3% și „+3” – 3 cazuri/2,2%. Majoritatea tumorilor examinate au fost echivalente gradului G2 și G3 de diferențiere (Tabelul 1).

Tabelul 1

Expresia ciokeratinei bazale CK5 din tumora primară (CK5tm), în funcție de gradul de diferențiere al carcinomului și vârsta pacientelor

CK5tm	Gradul de diferențiere	Grupa de vârstă	Cazuri	
			n	%
0	G1	după 49	4	3,0
0	G2	după 49	53	39,3
0	G2	până la 49	22	16,3
0	G3	după 49	32	23,7
0	G3	până la 49	7	5,2
1	G2	după 49	3	2,2
1	G2	până la 49	4	3,0
1	G3	după 49	2	1,5
2	G1	până la 49	1	0,7
2	G2	până la 49	2	1,5
2	G3	după 49	2	1,5
3	G2	până la 49	1	0,7
3	G3	după 49	2	1,5
Total			135	100

Studiului comparativ cu metastaza limfonodală (CK5mt) au fost supuse 92 cazuri, din care metastazele au fost considerate CK5 negative în 83 cazuri/90,2%. Cazurile pozitive (9 cazuri/9,8%) au fost repartizate după scorul CK5 precum urmează: „+1” – 4 cazuri/4,3%, „+2” – cazuri/2,2% și „+3” – 3,3%. Eseul statistic a evidențiat că expresia CK5 în metastază (CK5mt) este în funcție de valoarea CK5 în tumora primară (CK5tm), indicele de corelație indicând valori rezonabile, semnificativ statistice ($r_s=0,62$ la un $p<0,0001$) (Tabelul 2).

Tabelul 2

Indicele de corelație a expresiei CK5 de diversă localizare cu vârsta pacientelor și gradul de diferențiere al tumorii

	CK5tm	CK5mt	Vârsta	Grad
CK5tm				
r_s		0,62	-0,10	0,05
p		0,0001	0,173	0,331
CK5mt				
r_s	0,62		-0,03	0,01
p	0,0001		0,388	0,461
Vârsta				
r_s	-0,10	-0,03		0,22
p	0,173	0,388		0,016
Grad				
r_s	0,05	0,01	0,22	
p	0,331	0,461	0,016	

r_s – coeficientul de corelație Spearman; **Grad** – gradul de diferențiere al tumorii. Cu **Bold** sunt selectate rezultatele semnificativ statistic ($p<0,05$).

La compararea valorilor CK5 de ambele localizări nu am primit diferențe semnificativ statistice

($t=1,30$ la un $p<0,20$). O corelație pozitivă, de valoare joasă, dar statistic semnificativă s-a determinat la compararea vârstei cu gradul de diferențiere al tumorii ($r_s=0,22$, la un $p<0,016$). La compararea expresiei CK5 de ambele localizări am determinat 8 cazuri/8,8% cu transfer de scor (Tabelul 3). Din acestea, majoritatea (6 cazuri/6,6%) au evoluat cu pierderea expresiei CK5 după metastazare.

Tabelul 3

Studiul comparativ al expresiei CK5 în tumora primară vs metastaza limfonodală (CK5mt)

Expresia (după CK5tm)	CK5tm	CK5mt	n	%	% cu transfer de scor
negativă	0	0	77	83,7	2 cazuri / 2,2%
	0	1	1	1,1	
	0	2	1	1,1	
pozitivă	1	0	3	3,3	6 cazuri / 6,6%
	1	1	1	1,1	
	1	3	1	1,1	
	2	0	3	3,3	
	2	1	1	1,1	
	2	2	1	1,1	
	3	1	1	1,1	
	3	3	2	2,2	
Total			92	100	

Cu **Bold** sunt selectate cazurile cu transfer de scor CK5 în urma metastazării.

În relație cu gradul de diferențiere, 4 tumori/4,4% au fost evaluate cu G3 și 2 tumori/2,2% cu G2. Ambele tumori care au achiziționat CK5 în sediul metastatic au fost evaluate ca carcinoame slab diferențiate, G3.

Discuții. Cancerul mamar este tumora cea mai frecvent întâlnită la femei în lume. Prognosticul nefavorabil este datorat recidivelor frecvente și/sau dezvoltarea metastazelor la distanță [6]. Utilizarea tehnologiei *DNA microarrays* și evaluarea semnăturii genetice au permis de a concluda că această tumoare este una foarte eterogenă, chiar în cadrul aceleași forme histologice. Astfel au fost definite subtipurile moleculare ale carcinomului mamar având la bază expresia genelor/receptorilor pentru estrogeni, progesteron și HER2 [7]. La ziua de azi, gama markerilor utilizați în studiul mamar este una impunătoare, fiecărui nou receptor fiind atribuit un rol prognostic și/sau predictiv. Citokeratinele sunt filamente intermediare cu rol important în creștere și diferențiere, ce oferă specificitate celulelor epiteliale. Țesutul glandular mamar în normă este reprezentat de celule lumenale pozitive pentru CK7, CK8/18, C19 și celule bazale evidențiate prin expresia CK5/6, CK14 și CK17. Celulele CK5 pozitive constituie cca 5% din totalitatea epitelocitelor și sunt considerate celule pluripotente cu posibilitatea de a se diferenția prin câteva etape

sucesive în mioepiteliocite sau celule glandulare [8,9]. Odată cu diferențierea celulele pierd această citokeratină. În practica oncologică acest marker, de rând cu HER1 este utilizat pentru a defini subtipul molecular Basal-like, caracterizat prin agresivitate înaltă, recurențe frecvente și absența unui tratament țintit [10]. Abd El-Rehim DM et al. (2004) au raportat că expresia acestui marker corelează pozitiv cu dimensiunea tumorii, recurențele locale, regionale, pronosticul nefavorabil și invers proporțional cu vârsta pacientelor [11]. În studiul nostru CK5 susține această tendință nefastă pentru paciente de vârstă tânără, deși statistic nu s-au atins cote semnificativ veridice (Tabelul 2). Una din caracteristicile comune ale tumorilor maligne este dezvoltarea metastazelor. În carcinomul mamar invazia tumorală este rezultatul unui efort coordonat dintre celulele de origine glandulară și microambianță. Ultima, prin secreția a unui vast spectru de citokine, factori de creștere, proteaze pot influența dezvoltarea tranziției epitelio-mezenchimale, în urma căreia tumoarea își schimbă radical profilul său molecular [12]. În studiile noastre publicate anterior, am evidențiat un șir de receptori, precum ER, PR, HER2, E-cadherina care au manifestat o evoluție aleatorie în sediul limfonodal [13,14]. Aceasta ne-a permis să concluzionăm că carcinomul mamar ductal invaziv este celular eterogen, iar expresia receptorilor tumorali nu este stabilă pe parcursul evoluției metastatice. În studiul prezent am evidențiat, că și citokeratina bazală CK5 în 8,8% cazuri are o altă prezentare în microambianța limfonodală comparativ cu sediul primar. Deși evoluția carcinomului mamar de tip NOS a ținut preponderent de pierderea CK5 la metastazare, reapariția acestui marker în nodul limfatic în 2,2% cazuri prezintă o temă deschisă pentru cercetări și discuții ulterioare.

Concluzie: Odată cu înaintarea în vârstă scade gradul de diferențiere al carcinomului ductal invaziv de tip NOS. Această tumoare în majoritatea cazurilor nu expresează citokeratina bazală CK5. Markerul dat este instabil pe parcursul metastazării, evoluând atât în direcția achiziționării, cât și pierderii expresiei, ultimul tip de transfer constituind majoritatea.

Mulțumiri. 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. Bhalla A., Manjari M., Kahlon S.K., Kumar P., Kalra N. *Cytokeratin 5/6 expression in benign and malignant breast lesions*. Indian. J. Pathol. Microbiol., 2010; 53(4):676-80.

2. Hoffmann C., Mao X., Dieterle M., Moreau F., Al Absi A., Steinmetz A., Oudin A., Berchem G., Janji B., Thomas C. *CRP2, a new invadopodia actin bundling factor critically promotes breast cancer cell invasion and metastasis*. Oncotarget. 2016 Feb 11. doi: 10.18632/oncotarget.7327.

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

4. 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.

5. Evans J.D. *Straightforward statistics for the behavioral sciences*, Pacific Grove, CA: Brooks/Cole Publishing, 1996.

6. Kataja V., Castiglione M., ESMO Guidelines Working Group. *Locally recurrent or metastatic breast cancer: ESMO Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up*. Ann. Oncol., 2008; 19 (Suppl 2): ii11-3.

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., Lonning P.E., Borresen-Dale A.L., Brown P.O., Botstein D. *Molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2000; 406:747-52.

8. Boecker W., Buerger H., Schmitz K., Ellis I.A., van Diest P.J., Sinn H.P., Geradts J., Diallo R., Poremba C., Herbst H. *Ductal epithelial proliferations of the breast: A biological continuum? Comparative genomic hybridization and high-molecular-weight cytokeratin expression patterns*. J.Pathol., 2001;195(4):415-21.

9. Chu P.G., Weiss L.M. *Keratin expression in human tissues and neoplasms*. Histopathology, 2002;40(5):403-39.

10. 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.

11. 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.

12. McSherry E.A., Donatello S., Hopkins A.M., McDonnell S. *Molecular basis of invasion in breast cancer*. Cell. Mol. Life. Sci., 2007; 64(24):3201-18.

13. Raica M., Câmpean A.M., Ceausu R.A., Fulga V., Nica C., Rudico L., Saptefrati L. *Hormone receptors and HER2 expression in primary breast carcinoma and corresponding lymph node metastasis: do we need both?* Anticancer. Res., 2014;34(3):1435-40.

14. Fulga V., Rudico L., Balica A.R., Cimpean A.M., Saptefrati L., Margan M.M., Raica M. *Differential expression of e-cadherin in primary breast cancer and corresponding lymph node metastases*. Anticancer. Res., 2015; 35(2):759-65.