

TATIANA GLOBA, VERGIL PETROVICI, ȘAPTEFRAȚI LILIAN,  
CARPENCO ECATERINA, VALERIU DAVID

## EVALUAREA EXPRESIEI P53 ÎN SARCINILE UTERINE DEREGLATE ÎN TERMEN PRECOCE CU PROFIL HIDATIFORM MOLAR

<sup>1</sup>Laboratorul de morfologie,

<sup>2</sup>Catedra de histologie, citologie și embriologie, IP Universitatea  
de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemitanu”,

<sup>3</sup>Serviciul de anatomie patologică și citopatologie, IMSP IMȘIC, Chișinău, Republica Moldova

### REZUMAT

#### EVALUAREA EXPRESIEI P53 ÎN SARCINILE UTERINE DEREGLATE ÎN TERMEN PRECOCE CU PROFIL HIDATIFORM MOLAR

**Introducere.** Apoptoza are un rol important în morfogeneza normală a placentei și în neoplaziile gestaționale trofoblastice. Boala trofoblastică gestațională constituie un grup eterogen de leziuni proliferative cu anormalități corio-vilozitare și trofoblastice.

Scopul lucrării. Evaluarea activității pro-apoptotice în compartimentul epitelial trofoblastic vilos și stromal ale vilozităților coriale în mola hidatiformă vs sarcinile rezolvate la indicații sociale/dorință.

**Material și metode.** Produsul avortiv de la 15 paciente diagnosticate cu molă hidatiformă prin imagistica ecografică și morfologică cu anti-p57, NCL-L-p57, clona 25B2. Materialul de control: sarcinile rezolvate la indicații sociale/dorință (n=18). Evaluarea imunohistochimică a inclus markerul pentru proteina p53: anti-p53 (NCL-L-p53-DO7, diluția: 1:50, perioada de incubare 25 min), sistemul de detecție: NovolinkTMMaxPolimer (RE7280-K, Leica).

**Rezultate.** Mola hidatiformă a fost repartizată conform imunoexpresiei diferențiate anti-p57 la nivelul trofoblastului vilos în: MHC – 8 cazuri (53,35%) vs MHP – 7 cazuri (46,6%). A fost apreciat indicele apoptotic (IA) la nivelul citotrofoblastului vilos cu media și eroarea standard: MHC (67.85±5.6), MHP (33.14±12.79) și AS/D (27.52±3.74). Au fost evaluate următoarele corelații statistice în loturile de studiu la nivelul citotrofoblastului vilos: MHC vs MHP (t7,562=2,485, p=0,037), MHC vs AS/D (t0,209=5,874, p=0,000607), AS/D vs MH (t10,173=2,533, p=0,021).

**Concluzii.** Activitatea apoptotică a citotrofoblastului vilos este înaltă în mola hidatiformă completă cu valoare semnificativă statistică foarte mare în lotul MHC vs AS/D. Evaluarea imunohistochimică a proteinei anti-p53 în patologia molară este utilă în diagnosticul diferențiat ca metodă complementară în sarcinile dereglate la termen precoce.

**Cuvinte-cheie:** anti-p53, concept fetal, sarcină molară, boală trofoblastică, apoptoză.

### SUMMARY

#### THE EVALUATION OF P53 EXPRESSION IN EARLY DISTURBED UTERINE PREGNANCIES WITH A HYDATIFORM MOLAR PROFILE

**Introduction.** Apoptosis has an important role in normal placental morphogenesis and in gestational trophoblastic neoplasia. Gestational trophoblastic disease represents a heterogeneous group of proliferative lesions with chorio-villous and trophoblastic abnormalities.

The aim of the work. Assessment of pro-apoptotic activity in villous and stromal trophoblastic epithelial compartment of chorionic villi in hydatidiform mole vs pregnancies solved on social indications/ desire.

**Material and methods.** The abortive product from 15 patients diagnosed with hydatidiform mole by ultrasonographic was analyzed by IHC using anti-p57, NCL-L-p57, clone 25B2. Control material: pregnancies solved on social indications/ desire (n=18). Immunohistochemical evaluation included marker for p53 protein: anti-p53 (NCL-L-p53-DO7, dilution: 1:50, incubation period 25 min), detection system: NovolinkTMMaxPolimer (RE7280-K, Leica).

**Results.** The hydatidiform mole was distributed according to the differential anti-p57 immunoexpression at the level of the villous trophoblast in: MHC – 8 cases (53.35%) vs MHP – 7 cases (46.6%). The apoptotic index (AI) at the villous cytotrophoblast level was assessed with the mean and standard error: MHC (67.85±5.6), MHP

(33.14±12.79) and AS/D (27.52±3.74). The following statistical correlations were found in the study groups at the villous cytotrophoblast level: MHC vs MHP ( $t_{7,562}=2.485$ ,  $p=0.037$ ), MHC vs AS/D ( $t_{0,209}=5.874$ ,  $p=0.000607$ ), AS/D vs MH ( $t_{10,173}=2.533$ ,  $p=0.021$ ).

**Conclusions.** Villous cytotrophoblast apoptotic activity is high in complete hydatidiform mole with very high statistical significance in MHC vs AS/D group. Immunohistochemical evaluation of anti-p53 protein in molar pathology is useful in the differential diagnosis as a complementary method in early-term dysregulated pregnancies.

**Key words:** anti-p53, fetal conceptus, molar pregnancy, trophoblastic disease, apoptosis.

## РЕЗЮМЕ

### ОЦЕНКА ЭКСПРЕССИИ P53 ПРИ НАРУШЕННОЙ МАТОЧНОЙ БЕРЕМЕННОСТИ НА РАННИХ СРОКАХ С ПРОФИЛЕМ ПУЗЫРНОГО ЗАНОСА

**Введение.** Апоптоз играет важную роль в нормальном морфогенезе плаценты и гестационных неоплазиях трофобласта. Гестационная трофобластическая болезнь является группой гетерогенных пролиферативных повреждений с хориоворсинчатыми и трофобластическими отклонениями.

**Цель работы.** Оценка про-апоптотической активности ворсинчатого и стромального эпителия трофобласта в ворсинках хориона при пузырьном заносе в сравнении с беременностями прерванными по социальным показаниям или по желанию.

**Материалы и методы.** Абортусы от 15 пациенток с диагнозом пузырьный занос, подтвержденном с помощью УЗИ и морфологически с anti-p57, NCL-L-p57, клон 25B2. Контрольный материал: Беременности прерванные по социальным показаниям или по желанию ( $n=18$ ). Иммуногистохимическая оценка включала маркер для протеина p53: anti-p53 (NCL-L-p53-DO7, растворение: 1:50, период инкубации 25 мин), система определения: Novolink TM MaxPolimer (RE7280-K, Leica).

**Результаты.** Пузырный занос был подразделен в соответствии с различной иммуноэкспрессией anti-p57 на уровне ворсинчатого трофобласта: МНС – 8 случаев (53,35%) vs МНР – 7 случаев (46,6%). Была дана оценка индексу апоптоза (IA) на уровне ворсинок цитотрофобласта со стандартной среднестатистической ошибкой: МНС (67.85±5.6), МНР (33.14±12.79) и AS/D (27.52±3.74). Были оценены следующие статистические соотношения в изучаемых образцах на уровне ворсинчатого цитотрофобласта: МНС vs МНР ( $t_{7,562}=2.485$ ,  $p=0.037$ ), МНС vs AS/D ( $t_{0,209}=5.874$ ,  $p=0.000607$ ), AS/D vs MH ( $t_{10,173}=2.533$ ,  $p=0.021$ ).

**Выводы.** Апоптотическая активность ворсинчатого цитотрофобласта является высокой при полном пузырьном заносе со значительной статистической достоверностью в образцах МНС по сравнению с AS/D. Иммуногистохимическая оценка белка anti-p53 может быть использована как дополнительный метод дифференциальной диагностики прерванной беременности на ранних сроках.

**Ключевые слова:** anti-p53, зародыш, пузырьный занос, беременность с пузырьным заносом, трофобластическая болезнь, трофобластический апоптоз.

## INTRODUCERE

Boala trofoblastică gestațională constituie un grup eterogen de leziuni proliferative anormale în compartimentul epitelial trofoblastic, de comun cu leziunile hidropice și hidropic-chistice în stroma a coriovilară, fenomene prin careorexie celulară stromală și vasculară în anormalitățile corio-vilozitare. Grație criteriilor histopatologice pe larg descifrate, leziunile distincte descifrabile non-molare vs cele molare în compartimentul germinativ sunt stabilite în cursul examenului histomorfologic și tratate frecvent ca neconcludente în prezența variabilității interobservator și intraobservator. Această neconcludență în descifrarea distinctă în sarcinile dereglate în termen precoce cu profil molar și non-molar sunt rezultatul mascării particularităților morfologice în compartimentul corio-vilar [7, 8].

Diagnosticul diferențial în cadrul subtipurilor de molă hidatiformă (completă și parțială) ca parte componentă a bolii trofoblastice gestaționale (BTG), de comun cu anormalitățile corio-vilozitare atestate frecvent în sarcinile dereglate la termen mic sunt importante pentru managementul clinic în descifrarea riscului pentru boala trofoblastică. În același timp, de soarta diagnosticării patologiei va depinde și tactica medicală în orientarea pacientului în scopul micșorării infertilității, reducerii profilului malformativ în stadiile mai avansate ale periozării dezvoltării intrauterine etc.

La momentul actual, cât și pe parcursul multor ani, găsirea unui marker pentru comportamentul compromis, agresiv molar sau și pseudomolar în sarcinile precoce rămâne un subiect în continuare de studiu.

Un șir de studii au relevat impactul expresiei proteinei p53 în diagnosticul diferențiat în patologia molară vs

celelalte non-molare, patologia molară intragrup, avortului hidropic cu rezultate dispersate și caractere incomplet de diferențiere [9, 10].

p53 este o proteină supresoare tumorală cu rol implicat în dezvoltarea și progresia diferitor tipuri de tumori [12]. Fiind un inductor al apoptozei, supraexprimarea proteinei p53 este întâlnită în boala trofoblastică gestațională [13]. Moartea celulelor în consecința apoptozei este reglementată de diverși factori atât cu efect pro-apoptotic, cât și anti-apoptotic. Apoptoza reprezintă moartea programată biologică a celulei, un proces complex genetic ce include mecanisme intracelulare intrinseci. Este implicat în controlul homeostaziei tisulare ca unul din mecanismele biologice universale, reglarea autodistrugerii și înlăturarea celulelor patologice [11]. Astfel, scopul studiului a fost evaluarea activității pro-apoptotice în compartimentul epitelial trofoblastic vilos și stromal ale vilozităților coriale în mola hidatiformă.

## MATERIAL ȘI METODE. CARACTERISTICA GENERALĂ

În calitate de material de studiu au servit probele tisulare prelevate din conceptul fetal obținut după avort medical de la 15 paciente cu sarcini dereglate la termen mic (3-12 s.g.), sarcinile declanșate în cadrul Centrului Perinatal, nivelul III, IMSP IMȘiC în perioada anilor 2019 – 2021, cu diagnosticul morfopatologic de molă hidatiformă, incluse în lotul de studiu (LI). Vârsta pacientelor a variat între 17-47 ani cu o medie de 28,4±9,36 ani. Toate pacientele au fost supuse examinării prin ultrasonografie (USG) cu stabilirea în 5 cazuri ale aspectelor morfologice ecografice caracteristice structurilor hidatiforme molare.

Materialul de control a constituit probele tisulare prelevate a conceptului fetal după avort la indicații sociale/dorință de la 18 paciente care au constituit lotul de control (L<sub>II</sub>), vârsta pacientelor inclusă între 22-40 ani cu o medie de 30,5±5,6 ani. Concomitent, în calitate de control extern în cazul aplicării anti-p57, a fost aplicată testarea pe parenchim hepatic prelevat postmortem. Datele clinice au fost obținute din fișele medicale ale fiecărui pacient.

Metodologia examinării histologice a inclus histoprocizarea probelor tisulare, complexul de testări cu aplicarea metodei histologice uzuale cu hematoxilină-eozină și metoda imunohistochimică cu anti-p53 cu evaluarea particularităților microscopice, prelucrare statistică.

**Procesarea primară.** Materialul tisular al produsului de concepție a fost prelevat în termen scurt în secțiile de obstetrică cu fixare rapidă în soluție de formalină de 10%, pH 7,2-7,4 pentru a reduce riscul lizei timpurii a materialului tisular și a suprapunerii florei bacteriene. Perioada de fixare în soluție de formalină a fost nu mai mare de 24 ore. Sistemul de impregnare în parafină a fost DP500/CIT2002 (Bio-Optica, Italia). Procesarea

histochimică și histologică a probelor a fost efectuată la histoprocatorul „TISSUE-TEK, VIP 6AI” (Sakura, Japan), secționarea la microtomul HM325 (Thermoscientific) (USA). Secțiunile cu grosimea de 5 μm au fost etalate pe lame încărcate pozitiv (APTACA, Italy).

**Metoda histologică.** Secțiunile au fost colorate prin metoda clasică convențională cu hematoxilină-eozină (H.E), utilizând hematoxilina Mayer (HEMM-36/21, BIOGNOST, Slovenia) și eozina Y 1% (EOY10-35/21, BIOGNOST, Slovenia). Secțiunile pentru H.E au fost colorate automat cu autostainerul AUS-240, (Bio-Optica, Italia) și montate automat (TISSUE-TEK, ClasTM, Sakura, Japan). Secțiunile potrivite (material tisular suficient) au fost selectate pentru colorarea imunohistochimică.

**Metoda imunohistochimică.** Esecurile imunohistochimice au fost efectuate aplicând procedurile adaptate manual pentru anticorpii utilizați: anti-p53 (clone DO7, Novocastra Liquid Mouse Monoclonal Antibody for human p53 protein (Product code: NCL-L-p53: Leica Biosystems Newcastle Ltd, Newcastle, UK) și anti-p57 (clone 25B2, Novocastra Liquid Mouse Monoclonal Antibody for human p57 protein (Product code: NCL-L-p57: Leica Biosystems Newcastle Ltd, Newcastle, UK) cu aplicarea sistemului de detecție: Novolink<sup>TM</sup>-MaxPolimer, Leica, (RE7280-K) [1, 2]. A fost aplicată metoda imunohistochimică convențională (Tabelul 1). Deparafinarea a fost efectuată în două băi de Toluenă (cod UN1294, Sigma-Oldrich) a 5 minute fiecare, o baie mixtă de Toluenă și Alcool 99,9% (cod 06-10077F) timp de 5 minute, urmate de 2 băi în alcool absolut 99,9% cu rehidratare în 2 prize de 10 minute fiecare în apă distilată. Aplicarea anticorpilor primari a fost precedată de expunerea secțiunilor tisulare cu soluție de citrat de Na, pH 6.0 în scopul demascării epitopilor în baie de apă la temperatura 95°C-96°C a soluției de demascare timp de 20 minute cu timp de pretratare și posttratare total de 60 minute. Neutralizarea peroxidazei endogene cu peroxidase block timp de 5 minute. Aplicarea Protein Blok bloc în decurs de 5 minute. Incubarea secțiunilor cu anticorpii primari a constituit, respectiv 25 minute în cazul (anti-p53) și 30 minute pentru (anti-p57) la temperatura camerei. Ulterior a urmat etapele aplicării anticorpului post primar și a novolink polimer cu expunerea secțiunilor a câte 5 minute fiecare. DAB (3,3' - diaminobenzidină) a fost aplicat drept substrat cromogen timp de 5 minute. Contracolorarea nucleilor s-a efectuat cu Hematoxilină, Leica (RE7164). Produsul final al reacției a fost semnificată prin colorare în maro cu patern nuclear. Apoi, panelul lamelor histologice a fost supuse procedurii de dehidratare și clarifiere prin 2 prize de alcool absolut, o priză mixtă de alcool și toluenă și trei prize de toluenă, fiecare expunere fiind de 5 minute. Procedura finală a constat în montarea lamelor cu soluția BMC-100. În procedura de colorare imunohistochimică manuală a fost aplicată Sequenza<sup>TM</sup> Immunostaining Center cu folosirea Thermo Shandon Coverplate.

| Antibody / clone | Source / incubation time / dilution                            | Retrieval system / time  | Detection / time                    |
|------------------|--|--|-------------------------------------|
| P53/DO7          | Leica Biosystems Newcastle Ltd, Newcastle, UK / 25 min / 1:50  | Solution Citrat de Na, pH 6.0 / Baie de apă la temperatura de 95°C-96°C / 20 min | Novolink™MaxPolimer, Leica / 30 min |
| p57/25B2         | Leica Biosystems Newcastle Ltd, Newcastle, UK / 30 min / 1:100 | Solution Citrat de Na, pH 6.0 / Baie de apă la temperatura de 95°C-96°C / 20 min | Novolink™MaxPolimer, Leica / 30 min |

**Tabelul 1. Anticorpii utilizați: sursa, diluția, sistem de demascare, sistem de detecție, timp de incubare.**

**Evaluare microscopică.** Expresia pozitivă a p57 în compartimentul germinativ coriovilar și gestațional deciduo-endometrial a fost determinată în baza pozitivității reactive nucleare în celulele deciduale, trofoblastul vilos și trofoblastul extravilos intermediar (control intern pozitiv). Imunopozitivitatea p57 a fost interpretată ca satisfăcătoare (negativă) când celulele stromei coriovilare și ale trofoblastului vilozităților coriale au fost complet negative sau au prezentat o imunoexpresie nucleară în mai puțin de 10% din celule, în prezența concomitentă a controlului intern pozitiv. În calitate de control extern pozitiv au servit vilozitățile coriale și placarde deciduale din placenta umană normală. Controlul extern negativ a fost reprezentat de ficat (imuno reacție negativă), fiind inclus în fiecare set de cercetare. În toate situsurile de cercetare expresia citoplasmatică a fost considerată nespecifică. Metoda de cuantificare a fost aplicată după Gupta și colab. [3]. Cuantificarea celulelor pozitive s-a efectuat la microscopul Axio Imager A2 (Carl Zeiss, Germania) dotat cu cameră de înregistrare AXIOCam MRc5.

Expresia proteinei anti-p53 a fost evaluată în compartimentul vilozităților coriale (componenta epitelială trofoblastică) în toate cazurile, pe o secțiune din bloc de parafină. Inițial, la mărirea x100, s-au identificat zonele cu cea mai marcată expresie nucleară. Ulterior, s-au numărat celulele imunoreactive în trei câmpuri de vedere, la mărirea x400, în raport la 100 celule. Cele 3 valori au servit pentru calcularea valorii medii a indicelui apoptotic (IA/ %). Acesta a reprezentat valoarea procentuală a celulelor colorate pozitiv vs 100 de celule. S-a atribuit următorul scor:

- negativ – în cazul IA < 10%;
- +1 – în cazul IA cuprins între 10-25%;
- +2 – în cazul IA cuprins între 26-50%;
- +3 – în cazul IA > 50%.

Intensitatea imunoexpresiei a fost evaluată ca: 0 (absență); +1 (slabă); +2 (moderată); +3 (pronunțată); Notă:

scorurile 0 și +1 au fost considerate drept negative. În situsurile de cercetare expresia nucleară a fost tratată ca specifică. Metoda de cuantificare a fost aplicată după Qiao S. et al, 1988 [4].

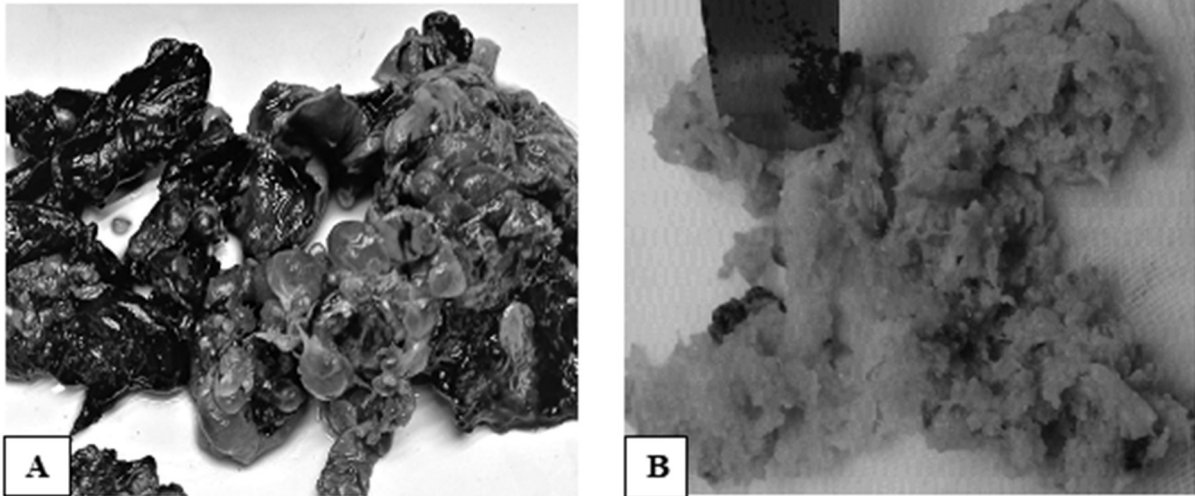
Cuantificarea celulelor pozitive s-a efectuat la microscopul Axio Imager A2 (Carl Zeiss, Germania) dotat cu cameră de înregistrare AXIOCam MRc5.

**Analiza datelor.** Rezultatele studiului au fost stocate și grupate în baza de date MS Excel 2010. Analiza datelor a fost efectuată folosind programul SPSS (SPSS Statistics 23.0; IBM, Chicago, IL, SUA). S-au aplicat statistici descriptive cu determinarea mediei aritmetice (M) a valorilor p53 și a erorii standard (SE). De asemenea, am comparat valorile IA p53 în LI vs LII, precum și în interiorul LI (mola hidatiform completă vs parțială) prin aplicarea testului t. Pentru a analiza corelațiile intranazologice, am aplicat testul Pearson. Rezultatele au fost considerate semnificative statistic la un  $p < 0,05$ .

## REZULTATE

Rezultatele evaluării fișelor de examinare a cazurilor incluse în lotul (LI) au constatat, că în 33,3% din cazuri, diagnosticul clinic primar a fost stabilit ca molă hidatiformă. Restul cazurilor au fost tractate drept sarcini în evoluție cu avort spontan sau sarcini stagnante, hiperplazie glandulară endometrială în asociere cu sindrom hemoragic. Examinările macroscopice ale produsului avortic în perioada precece au scos în evidență două subtipuri dominante ale formelor de concept fetal: tip V – concept fetal hidatiform molar (CFHM) și tip VI – concept fetal dezorganizat (CFD), [5], (fig. 1).

Prin testarea imunohistochimică cu anti-p57 a cazurilor examinate în loturile de studiu, conform particularităților profilului imunomorfologic atestat la nivelul trofoblastului vilos (imuno reacție negativă sau pozitivă din partea citotrofoblastului vilos), au fost descifrate două subtipuri a molei hidatiforme gestaționale: mola

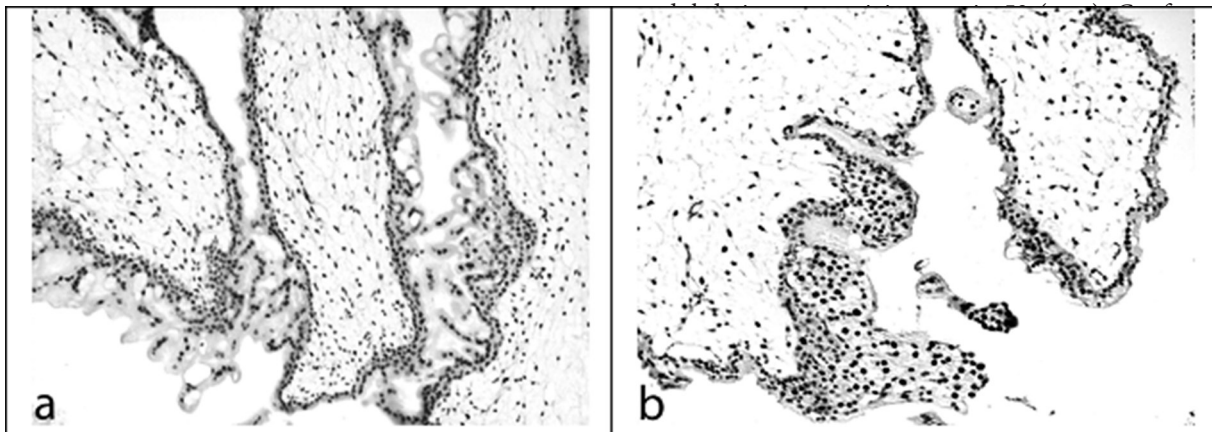


**Fig. 1. Particularități macroscopice ale conceptului fetal: a) Aspect molar a sacului germinativ în avort cu modificări brune a plastului decidual și hemoragice în coaguli adezivi (CFHM); b) Aspect semiterciform a conceptului dezintegrat în avort medical (CFD).**

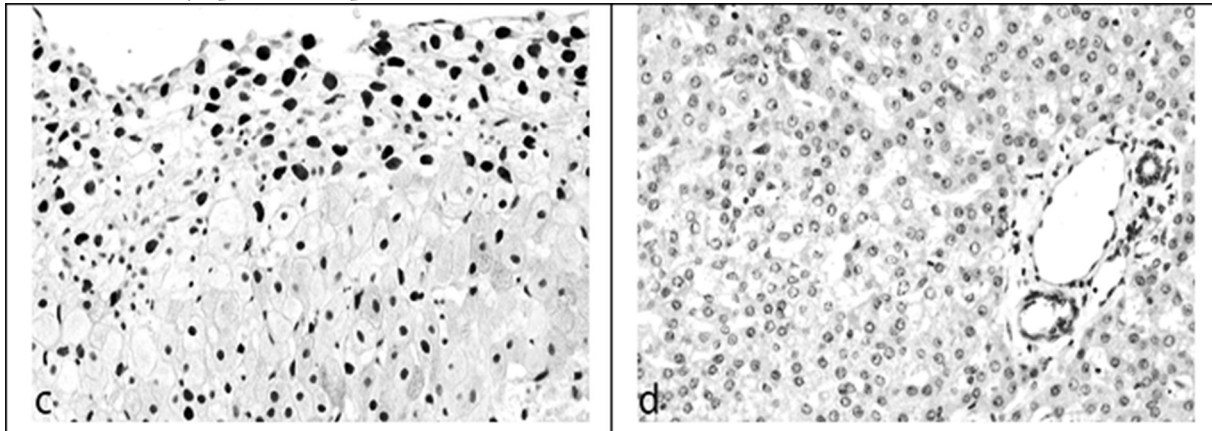
hidatiformă completă – 7 cazuri (46.7%) și mola hidatiformă parțială – 8 cazuri (53.3%), (fig. 2 a, b). În toate cazurile studiate, controlul intern pozitiv s-a atestat la nivelul trofoblastului extravilos, în comun cu expresia intensă din partea celulelor deciduale (fig. 2 c). În calitate de control negativ extern au servit hepatocitele ce

nu au prezentat imunoreacție pozitivă [6], (fig. 2d), de comun cu imunoexpresie pozitivă pe material tisular din cadrul conceptului fetal tip VI (fig. 3).

Ulterior, cazurile au fost analizate sub aspectul apoptotic al trofoblastului vilos și a celulelor stromale din situsul corio-vilozitar, redat prin indicele apoptotic (IA) și



**Fig. 2. a) MHC: imunoexpresie negativă a trofoblastului vilos; b) MHP: imunoexpresie pozitivă a trofoblastului vilos. Imunoreacție pentru anti-p57, DAB; x100.**



**Fig. 2. c) imunoexpresie intensă pozitivă a decidualocitelor și trofoblastului extravilos (control intern pozitiv); d) imunoexpresie negativă a hepatocitelor (control extern pozitiv); Imunoreacție pentru anti-p57, DAB; x200.**

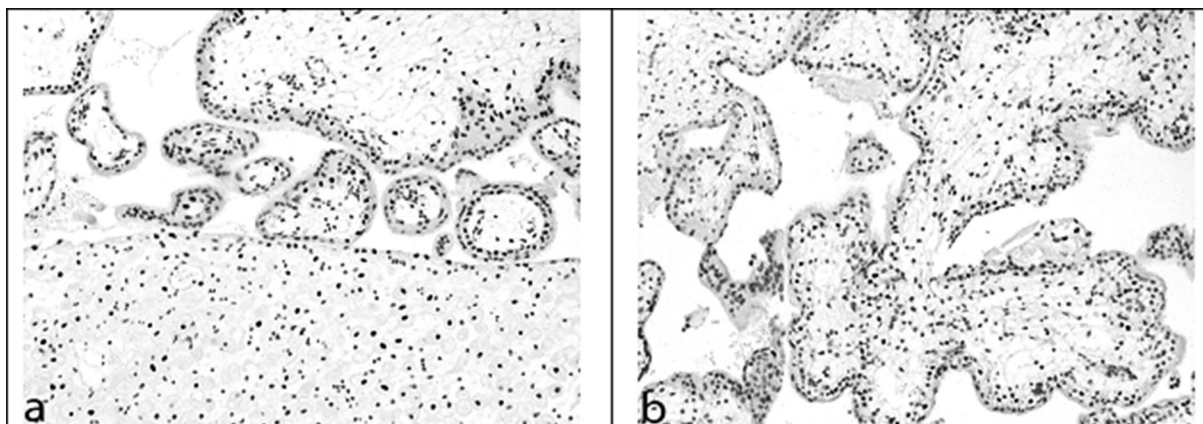


Fig. 3. Sarcină în avort social. Imunoexpresie intensă pozitivă a trofoblastului vilos. Imunoreacție pentru anti-p57, DAB; x100.

Tabelul 1. Valoarea medie și eroarea standard pentru markerul p53

| Unitate nozologică | p53 (IA%)            |                          |            |
|--------------------|----------------------|--------------------------|------------|
|                    | Citotrofoblast vilos | Sincitiotrofoblast vilos | Stroma     |
|                    | M±ES                 | M±ES                     | M±ES       |
| MHCompletă         | 67.85±5.6            | 9.28±2.71                | 18.68±3.13 |
| MHPațială          | 33.14±12.79          | 6.28±3.87                | 22.1±8.41  |
| AS/Dorință         | 27.52±3.74           | 4.52±0.63                | 13.61±1.55 |

și celulelor stromale, valorile numerice de distribuire în raport de subtipurile molei hidatiforme și a lotului control, sunt elucidate în tabelul nr. 1.

Conform rezultatelor obținute, imunoexpresia anti-p53 la nivelul citotrofoblastului vilos a fost atestată maxim în lotul cu patologie molară cu valoarea medie (67.85±5.6), subtipul molar complet fiind net superior atât intragrup, cât și vs grupului de sarcini rezolvate la indicații sociale sau/și la dorință (27.52±3.74) (tab. 1, fig.4).

Pentru a testa ipoteza precum că fiecare entitate morfologică a fost asociată cu valori medii diferite, semnifica-

tive statistice, ale IA p53, a fost efectuat testul t-student. Au fost determinate un șir de corelații statistice intergrup la compartimentul citotrofoblastului vilos: MHC vs MHP (t7,562=2,485, p=0,037), MHC vs AS/D (t0,209=5,874, p=0,000607) și AS/D vd MH (t10,173=2,533, p=0,021). În restul compartimentelor, adică sincitiotrofoblast și stromă vilozitară corelații statistice nu s-au determinat.

La evaluarea imunoexpresiei la nivelul sincitiotrofoblastului, imunoreactivitatea anti-p53 a fost una slabă, cu o valoare medie de 9.28±2.71 în lotul molei hidatiforme complete vs 4.52±0.63 în sarcinile rezolvate la indicații sociale (fig. 5).

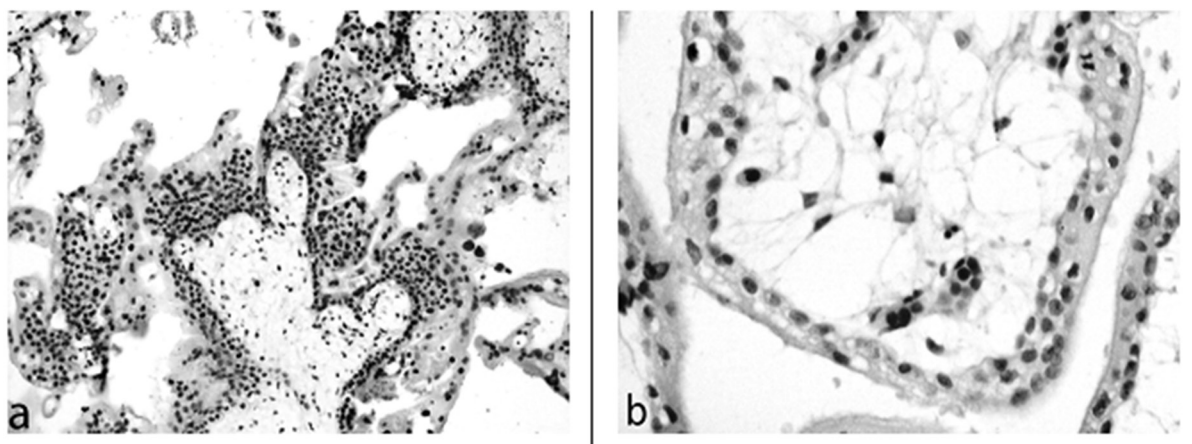


Fig. 4. a) MHC: imunoexpresie înaltă pozitivă a citotrofoblastului vilos. Scor de distribuire (+3); b) AS/D: imunoexpresie slabă pozitivă a citotrofoblastului vilos. Scor de distribuire (+1). Imunoreacție pentru anti-p53, DAB; x100, 400.

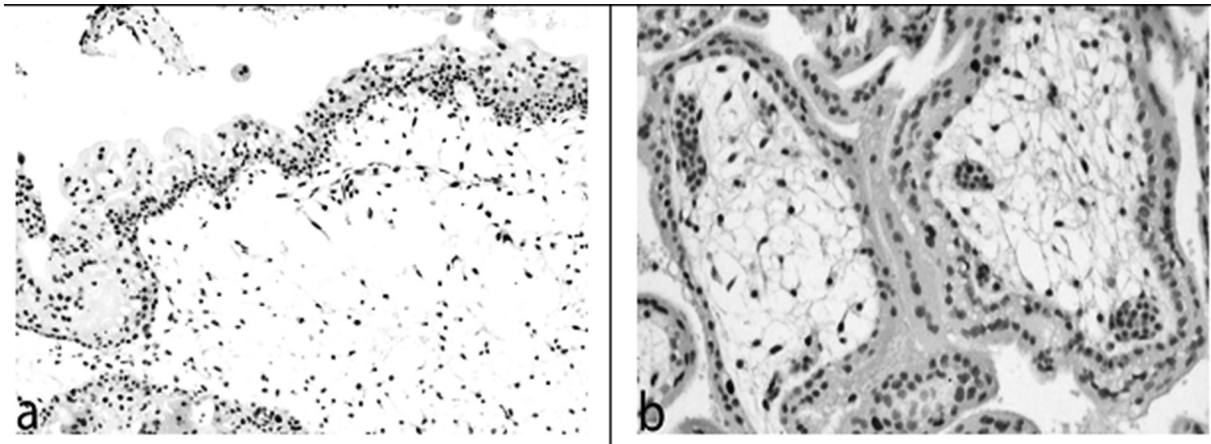


Fig. 5. a) MHC: imunoexpresie slabă pozitivă a sincițiutrofoblastului vilos. Scor de distribuire (+1); b) AS/D: imunoexpresie negativă a sincițiutrofoblastului vilos. Scor de distribuire (0). Imunoreacție pentru anti-p53, DAB; x 100, 200.

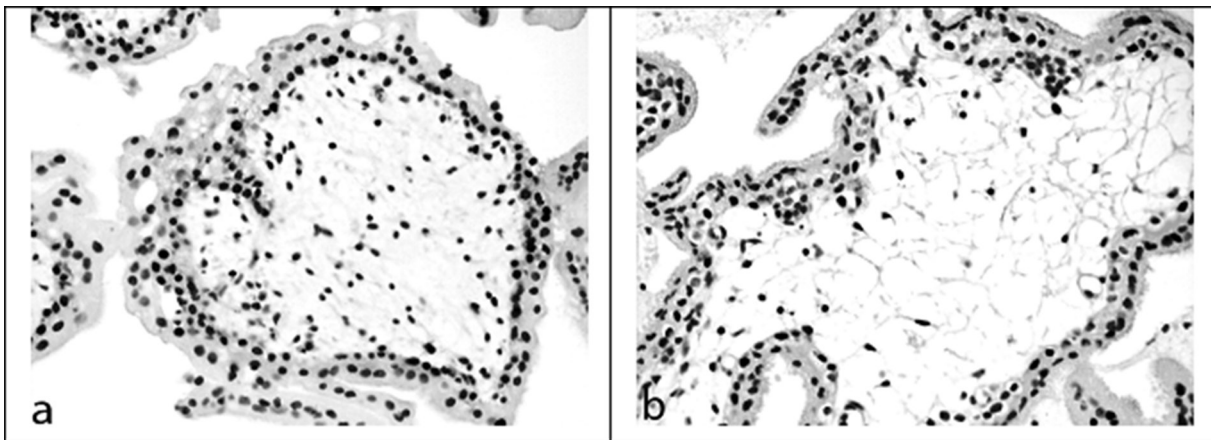


Fig. 6. a) MHC: imunoexpresie înaltă pozitivă a citotrofoblastului vilos și slabă pozitivă în sincitiutrofoblast și în stromă. Scor de distribuire (+3, +1); b) AS/D: imunoexpresie moderată pozitivă a citotrofoblastului vilos și negativă în sincitiutrofoblast și în stromă. Scor de distribuire (+2, 0). Imunoreacție pentru anti-p53, DAB; x200.

Evaluarea imunoreacției cu anti-p53 în compartimentul stromal a determinat o imunoexpresie celulară puțin mai ridicată vs componenta sincițială a trofoblastului vilos în ambele loturi cu un scor de distribuire +1 și 0 (fig. 6).

În compartimentul molar parțial și per total ale formelor molare, rezultatele nu sunt statistic reprezentative. Concomitent, la examinarea intranozologică au fost stabilite un șir de corelații (tab. 2).

La examinarea eseurilor statistice s-a stabilit în ambele subtipuri molare o corelație statistică înaltă ( $r=0.808$ ,  $p=0.02$ ) și ( $r=0.852$ ,  $p=0.015$ ) în lipsa ei în lotul cu sarcini rezolvate la indicații sociale/dorință ( $r=0.174$ ,  $p=0.503$ ).

Ulterior, studiul sa axat pe evaluarea distribuirii imunoreactivității p53 în loturile studiate, fiind reflectată în tabelul 3.

Tabelul 2. Corelații intragrup

|               | MHC              |                      | MHP              |                      | AS/D             |                      |
|---------------|------------------|----------------------|------------------|----------------------|------------------|----------------------|
|               | p53 citovilos IA | p53 sincițiuvilos IA | p53 citovilos IA | p53 sincițiuvilos IA | p53 citovilos IA | p53 sincițiuvilos IA |
| Pearson Corr. | 0.808            |                      | 0.852            |                      | 0.174            |                      |
| p             | <b>0.028</b>     |                      | <b>0.015</b>     |                      | 0.503            |                      |
| N             | 7                |                      | 7                |                      | 17               |                      |

Notă: Rezultatele au fost considerate semnificative statistic la un  $p<0,05$  și au marcate **bold**

**Tabelul 3. Repartizarea imunoreactivității p53 (scor)**

| Unitate nozologică | Citotrofoblast/score |    |    |    | Sincitiotrofoblast/score |    |    |    | Stroma/score |    |    |    |
|--------------------|----------------------|----|----|----|--------------------------|----|----|----|--------------|----|----|----|
|                    | 0                    | +1 | +2 | +3 | 0                        | +1 | +2 | +3 | 0            | +1 | +2 | +3 |
| MHCompletă         | 0                    | 0  | 1  | 6  | 4                        | 3  | 0  | 0  | 2            | 2  | 3  | 0  |
| MHPățială          | 3                    | 1  | 1  | 2  | 5                        | 1  | 1  | 0  | 2            | 3  | 1  | 1  |
| AS/Dorință         | 2                    | 8  | 6  | 1  | 17                       | 0  | 0  | 0  | 3            | 13 | 1  | 0  |

**Notă:** 0 = < 10% celule pozitive (negativ); > 10% celule pozitive (pozitiv): + (10-25%); ++ (26-50%); +++ (> 50%). Intensitatea imunoexpresiei a fost evaluată ca: 0 (absentă); + 1 (slabă); ++ (moderată); +++ (pronunțată):

**Notă:** 0 și 1 (negative).

În raport de formele nozologice evaluate și situsurile de cercetare, în MHC, nivelul citotrofoblastului vilos, 7 cazuri/87.5% au exprimat p53, gradul expresiei variind de la +2 – 1 caz (12.5%) și +3 – 6 cazuri (75%); p53 la nivelul sincitiotrofoblastului a fost exprimată în 3 cazuri/37.5% cu un grad de expresie +3 și lipsa expresiei în 4 cazuri (50%); p53 în stroma coriovilară a fost exprimată în 5 cazuri (62.5%), gradul expresiei variind de la +1 – 2 cazuri (25%) și +2 – 3 cazuri (37.5%), lipsa expresiei fiind atestată în 2 cazuri (25%). Într-un caz (12.5%) expresia acestei proteine nu a putut fi examinată datorită decelării secțiunii de pe lamă în timpul procedurii de demascare.

În MHP expresia p53 la nivelul citotrofoblastului vilos a fost atestată în 4 cazuri (57.1%), gradul de expresie variind de la +1 – 1 caz (14,3%), +2 – 1 caz (14.3%) și +3 – 2 cazuri (28.6%). Lipsa expresiei a fost stabilită în 3 cazuri (42.9%). p53 la nivelul sincitiotrofoblastului a fost atestată în 2 cazuri (28.6%), gradul de expresie variind în limitele +1 și +2 a câte 1 caz (14.3%). Lipsa expresiei a fost constatată în 5 cazuri (71,4%). p53 în stroma coriovilară a fost atestată în 5 cazuri (71.4%), gradul de expresiei variind de la +1 – 3 cazuri (42.9%), +2 și +3 a câte 1 caz pentru fiecare (14.3%). Lipsa expresiei a fost stabilită în 2 cazuri (28.6%).

În sarcinile rezolvate la indicații sociale/dorință expresia p53 în citotrofoblastul vilos a fost determinată în 15 cazuri (88.2%), gradul de expresie fiind de +1 – 8 cazuri (47.1%), +2 – 6 cazuri (35.2%) și +3 – 1 caz (5.9%). Lipsa expresiei a fost determinată în 2 cazuri (11.8%). Expresia p53 în compartimentul sincitiotrofoblastic a fost unul negativ în 100% cazuri. p53 în stroma coriovilară a fost determinată în 14 cazuri (82.4%), gradul de expresie fiind de +1 – 13 cazuri (76.5%), +2 – 1 caz (5.9%). Lipsa expresiei a fost determinată în 3 cazuri (17.6%). Într-un caz (5.6%) expresia acestei proteine nu a putut fi examinată datorită finisării blocului histologic.

## DISCUȚII

p53 reprezintă o proteină produsă într-o cantitate mică în toate țesuturile organismului nostru în condiții nor-

male, fiind cunoscută ca genă cu supresie tumorală și negativ acționând asupra diviziunilor celulare. Este o proteină cu masă moleculară de 53KD localizată pe brațul scurt al cromozomului 17p13.1. În condiții patologice la alterarea ADN sau a unui citostres, are loc creșterea semnificativă de secreție, care este urmată de blocarea interfeței în trecerea celulei în faza de sinteză a ciclului celular, urmată de o perioadă de reparare a ADN. În cazul mutațiilor la nivelul genei p53, acest bloc nu are loc și ADN alterat este urmat de replicare, fapt contribuabil patogenetic în inițierea unor leziuni patologice [14]. Rolul biologic a acestei proteine este de a asigura integritatea genomului printr-un spectru larg de activități: în calitate de factor de transcripție, prin inducerea sau inhibarea unor gene, sau în calitate de regulator de proteine în cazul diferitor căi de semnalizare [15]. Stresul genotoxic ca urmare ale multiplelor leziuni severe asupra ADN, induce apoptoza prin activarea proteinei p53. În același timp, pierderile funcțiilor acestei proteine și activitățile dereglate ale sale, contribuie la implicarea ei atât în patologiiile maligne, cât și într-un șir de boli somatice de caractere neurodegenerative, cardiovascular, infecțioase, metabolice etc. [16]. În această ordine de idei, un șir de lucrări au fost efectuate în evaluarea și impactului imunoexpresiei p53 în patologia trofoblastică gestațională prin evaluarea supraexpresiei proteinei cu scop de diagnostic diferențiat sau și de pronostic, dar cu caracter discipant [17]. Studiul dat efectuat de noi a pus în evidență o supraexpresie din partea trofoblastului și anume a citotrofoblastului în prezența unui indice apoptotic predominant în cazul subtipului molar complet vs sarcinilor corespunzătoare lotului de control (67.85±14.82 vs 27.52±15.45) în lipsa unor rezultate reprezentative în lotul cu patologie molară parțială (tabelul 1). Concomitent, intranozologic au fost obținute și un șir de corelații cu caractere pozitive după Pearson în compartimentul trofoblastic lotului hidatiform molar și absente din partea celui de control (tabelul 2). La evaluarea repartizării imunoreactivității pentru p53 în loturile de studiu (tabelul 3), maxim imunoexpresia a fost atestată în grupul cu patologie molară completă (+3) în 75% de cazuri vs sarcinilor rezolvate la



dorință (+1) în 47.1% în compartimentul citotrofoblastic. Aceste rezultate, ca urmare a comparării intergrup au scos în evidență un șir de corelații semnificativ statistice și anume : MHC vs MHP ( $t_{7,562}=2,485$ ,  $p=0,037$ ), MHC vs AS/D ( $t_{0,209}=5,874$ ,  $p=0,000607$ ) și AS/D vd MH ( $t_{10,173}=2,533$ ,  $p=0,021$ ).

Rezultatele date sunt în conformitate cu un șir de studii, care denotă imunoexpresia accentuată și diferențiată în compartimentul citotrofoblastic vilos [17]. Totodată, în studiul dat a fost determinată și o discrepanță în grupul corespunzător sarcinilor evolute cu molă hidatiformă parțială în evaluarea valorii medii și erorii standard pentru markerul p53. În opinia noastră, acest fapt constatat ar putea fi ca rezultat al caracterului polimorf coriovilar monofocal al profilului germinativ. Astfel, pentru a mări acuratețea rezultatelor analizei statistice în compartimentul lotului cu molă hidatiformă parțială, în viitor, se necesită de a continua studiul pe un număr mult mai mare de cazuri.

În acest context, per ansamblu, investigația imunohistochimică prin atestarea imunocolorării cu anti-p53 vine în ajutor ca metodă complementară în diagnosticul diferențiat în cadrul sarcinilor dereglate în termen precoce.

## CONCLUZII

Activitatea apoptotică a citotrofoblastului vilos este înaltă în mola hidatiformă completă cu valoare semnificativă statistică foarte mare în lotul MHC vs AS/D. Evaluarea imunohistochimică a proteinei anti-p53 în patologia molară este utilă în diagnosticul diferențiat ca metodă complementară în sarcinile dereglate la termen precoce.

## BIBLIOGRAFIE

1. David V., Petrovici V., Globa Tatiana, Carpenco Ecaterina, Plaxivii Ana. Protocolul tehnicii imunohistochimice manuale cu utilizarea anticorpului anti-p53, NCL-L-p53-DO7, sistemul de detecție NovolinkTMMMaxPolimer (RE7280-K). Certificat de inovator nr. 5894.
2. David V., Fulga V., Sinițina L., Carpenco E., Cecoltan S. Protocolul tehnicii imunohistochimice manuale cu utilizarea anticorpului anti-p57, monoclonal antimouse, NCL-L-p57, clona 25B2, sistemul de detecție NovolinkTMMMaxPolimer (RE7280-k). Certificat de inovator nr. 5893.
3. Gupta M., Vang R., Yemelyanova A. et al. Diagnostic reproducibility of hydatiform moles: ancillary techniques (p57 immunohistochemistry and molecular genotyping) improve morphologic diagnosis for both recently trained and experienced gynecologic pathologists. *Am. J. Surg. Pathol.*, 2012, 36 (12):1747-1760.
4. Qiao S., Nagasaka T., Harada T., Nakashima N. p53, Bax and Bcl-2 expresion and apoptosis in gestational trophoblast of complete hydatiform mole. *Placenta* 1988; 19:361-9.
5. Carpenco Ecaterina, Petrovici V., Sinițina Lilia, Fulga Veaceslav, David V. Evaluation of Ki67 proliferative marker expression in the trofoblastic disease. *Moldovan Medical Journal*. 2022; 65(2):
6. David V., Petrovici V., Șaptefrați L., Fulga V., Carpenco Ecaterina, Franț Elena. Evaluation of p57 expression in early disordered pregnancies with molar status vs non-molar ones. *Moldovan Medical Journal*. 2022; 65(2):
7. Tse KY and Ngan HY. Gestational trophoblastic disease. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.*, 2012, 26 (3):357-370.
8. Golfier F, Clerc J and Hajri T. Contribution of referent pathologists to the quality of trophoblastic diseases diagnosis. *Hum. Reprod.*, 2011, 26(10):2651-2658.
9. Rath G., Soni S., Prasad C. et al. Bcl-2 ant p53 expressions in Indian women with complete hydatiform mole. *Singapore. Med. J.*, 2011, 52(7):502-507.
10. Uzunlar A., Yilmaz F., Bayhan G. and Akkus Z. Expression of p53, proliferation cell nuclear antigen, and Ki-67 in gestational trophoblastic disease. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 2002, 23:79-83.
11. Seon-Yong Jeong, Dai-Wu Seol. The role of mitochondrian in apoptosis. *BMB. Rep.* 2008; 41:11-22.
12. Cardoso SV, Silveira-Junior JB, De Carvalho V. et al. Expresion of metallothionein and p53 antigens are correlated in oral squamous cell carcinoma. *Anti-cancer Res* 2009; 29(4):1189-93.
13. Petignat P., Laurini R., Goffin F. et al. Expression of matrix metalloproteinase-2 and mutant p53 is increased in hydatiform mole as compared with normal placenta. *Int J Gynecol Cancer* 2006; 2006: 16(4):1679-84.
14. Raica M., Mederle O., Suciuc C. Histologia pentru patolog. *Curs postuniversitar*, 2006, pag. 125-140.
15. Horn HF, Vousden KH. Coping with stress: multiple ways to activate p53. *Oncogene*, 2007; 26(9):1306-16.
16. Harris SL., Levien AJ. The p53 pathay: positive and negative feedback loops. *Oncogene*, 2005; 24(17):2899-998.
17. Semary SS., Elrahman SA., Mohammed MH. The utility of p53, p63, p57 and Ki67 Immunohistochemistry in the differentiation between hydroptic abortion and molar pregnancy. (Immunohistochemical study). *J Hospital Medicine*, 2018; 73(1):572535.