

RECEȚIONAT:

Ministerul Educației, Culturii și Cercetării

la data: \_\_\_\_\_

**RAPORT ȘTIINȚIFIC**  
**privind executarea proiectului de cercetări științifice**  
**fundamentale (insituționale)**  
**pentru anii 2015-2019**

**Proiectul** Evaluarea imunofenotipică a subtipului molecular în tumoarea primară și metastazele limfonodale în carcinomul invaziv de glandă mamară.

**Cifrul Proiectului** 15.817.04.09F

**Dirrecția Strategică** Biomedicină, farmaceutică, menținerea și fortificarea sănătății

**Termen de executare: 27 decembrie 2019**

Directorul proiectului

\_\_\_\_\_

( nume, prenume)

\_\_\_\_\_

(semnătura)

Rector USMF ”Nicolae Testemițanu”

\_\_\_\_\_

( nume, prenume)

\_\_\_\_\_

(semnătura)

Președintele Senatului

\_\_\_\_\_

( nume, prenume)

\_\_\_\_\_

(semnătura)

**Chișinău 2019**

## **CUPRINS :**

1. Lista executorilor (Anexa nr.1)
2. Obiectivele și sarcinile proiectului (până la o pagină)
3. Rezultatele științifice ale cercetărilor efectuate în cadrul proiectului
4. Rezumat (până la o pagină)
5. Concluzii
6. Participarea în programe și proiecte internaționale (ORIZONT 2020, SCOPES, JOP, IRSIS, NATO, etc.), inclusiv propunerile prezentate/câștigate în cadrul concursurilor naționale/internaționale cu tangență la tematica cercetării proiectului realizat
7. Lista publicațiilor științifice ce țin de rezultatele obținute în cadrul proiectului (Anexa 2)
8. Fișa de prezentare a rezultatelor proiectului de cercetare (Anexa nr.3)

**Lista executorilor** (*funcția în cadrul proiectului, titlul științific, semnătura*)

Nr d/o	Numele/prenumele	Titlul științific	Funcția în cadrul proiectului	Semnătura
1.	David Valeriu	conf. universitar	director de proiect	
2.	Rîvneac Victor	prof. universitar	cer. științific	
3.	Grecichina Ecaterina		cer. șt. superior	
4.	Fulga Veaceslav	conf. universitar	cer. științific	
5.	Carpenco Ecaterina		cer. șt. stagiar	

**Obiectivele și sarcinile proiectului.**

Carcinomul mamar este tumoarea frecventă întâlnită la femei, înregistrând în lume peste 1 mln de cazuri noi/an și constituie circa 18% din decesele prin neoplazii, dezvoltând în 50% cazuri metastaze, preponderent în noduri limfatici.

Tactica de tratament depinde de stadiul progresiei și tipul morfologic al tumorii. Întru eficientizarea tratamentului și evaluarea genezei, progresiei și riscului de recidivă, sunt determinate subtipurile moleculare a carcinomului mamar, procedeele de diagnostic fiind axate pe tumora primară.

Diagnosticul carcinomului mamar are ca bază examenul histopatologic. Cele mai frecvent diagnosticate sunt tipurile histologice invaziv ductal (70-80%) și invaziv lobular (8-15%).

Recent, utilizarea tehnologiilor genetice, ADN microarrays și a „semnăturii genetice” a permis o nouă clasificare a carcinomului mamar în funcție de status-ul receptorilor estrogenici (ER), progesteronici (PR), HER2/neu, Ki67 și distribuirea tumorilor în cel puțin 4 subtipuri moleculare cu implicații clinice majore:

1. Luminal A (ER+, PR+, Her2/neu-) – este frecvent înregistrat la femeile în postmenopauză, de regulă sunt tumori bine diferențiate (G1), cu indice de proliferare scăzut. Sunt considerate tumori cu prognostic favorabil.
2. Luminal B (ER+ și/sau PR+, Her2/neu+ și/sau Ki67<sup>înalt</sup>) – subtip de tumori agresive cu risc sporit de recurențe.
3. Her2/neu supraexprimat – subtip molecular cu risc crescut de recidivă.
4. Triplu negativ/basal like și 5-NP – sunt tumori cu grad de diferențiere G3, indice de proliferare sporit, frecvent prezintă mutații genetice BRCA1 și/sau BRCA2 (asociat cu cancerul ovarian), predominant întâlnit la paciente cu vârstă tânără, incidența înaltă a mutațiilor p53. Sunt considerate actual de prognostic nefavorabil.

Proiectul dat are ca scop studiul comparativ al subtipului molecular al tumorii primare și metastazelor sale limfonodale în carcinomul mamar invaziv: *ductal și lobular*. Prin analize imunohistochemice a markerilor ER-estrogen, PR-progesteron, Her2/neu, Ki67, CK5/6 și EGFR vor fi determinate și supuse studiului comparativ următoarele subtipuri moleculare: *luminal A, luminal B/Her2<sup>+</sup>, Luminal B/Ki67<sup>înalt</sup>, Her2/neu supraexpresat, triplu negativ/basal like, 5-NP (cu fenotip cinci negativ)*. Astfel va fi determinată stabilitatea fenotipului molecular al tumorii pe parcursul progresiei și metastazării. În baza evaluării receptorilor ER și PR se vor defini grupele hormon-dependente și hormon-independente. Expresia cantitativă a ER, PR și Ki67 va sta la baza delimitării subtipurilor luminale A și B/Ki67<sup>înalt</sup>, iar markerul Her2/neu va permite identificarea tipului Her2<sup>+</sup> și luminal B/Her2<sup>+</sup>. Întru elucidarea rolului celulelor epiteliale, precum și evidențierea subtipurilor basal-like și 5-NP, va fi studiată citokeratina CK5/6 și expresia receptorului EGFR. Dereglarea mecanismelor apoptozei va fi studiată prin expresia proteinei p53, expresia căreia reprezintă un factor prognostic, predictiv pentru răspunsul tumoral la diverse terapii, cât și proteina Bcl2, ce reglează moartea celulară și apoptoza. Acesta este un indicator independent de prognostic favorabil pentru toate tipurile de cancer mamar. Totodată, se va studia componentele stromale cu determinarea interrelațiilor dintre densitatea și distribuția mastocitelor și a macrofagelor în diferite subtipuri moleculare de carcinoma de glandă mamară.

### **Rezultatele științifice ale cercetărilor.**

În calitate de obiect de studiu a servit materialul biologic (tumora primară și metastaza limfonodală (LNM)) prelevat postoperator în incinta IMSP Institutul Oncologic din RM pe parcursul anilor 2013-2017 de la 87 paciente cu vârsta 59.3±1.2.

Au fost selectate cazurile diagnosticate cu carcinom mamar invaziv de tip ductal NST (71 cazuri) și lobular (16 tumori), fără chimio- sau radioterapie în antecedente.

Procesarea primară a materialului biologic a fost identică la toate specițiile. Probele tisulare prelevate au fost fixate timp de 24-48 ore în formalină tamponată 10%, pH 7.2-7.4. Materialul a fost inclus în *Paraplast High Melt*.

### **Metodele utilizate:**

#### **1. Metoda histologică**

Toate secțiunile au fost colorate inițial prin metoda clasică, cu hematoxilină-eozină. A fost determinat tipul și gradul histologic al carcinomului, prezența metastazelor în noduri limfatici axilari ipsilaterali. Gradarea histopatologică a fost realizată conform sistemului Scarff-Bloom-Richardson, recomandat de OMS (2003).

#### **2. Metoda imunohistochimică**

Toate procedeele de deparafinare, demascare și vizualizare s-au efectuat automat pas cu pas urmând etapele principale: deparafinarea, blocarea activității peroxidazei endogene,

contracolorarea nucleilor cu hematoxină Mayer, deshidratarea secțiunilor histologice în serii crescute de alcool etilic (70-100%), clarificare cu xylen și montare cu soluția *Leica CV Mount*.

Evaluarea paternului ER, PR a fost efectuată în corespundere cu recomandările lui Allred (2006) care a inclus combinarea procentului de celule imunocolorate cu intensitatea colorării nucleare; Evaluarea paternului HER2 a fost efectuată în corespundere cu recomandările Societății Americane a Oncologilor Cliniciști (ASCO), cazurile +2 și +3 sunt considerate HER2<sup>+</sup>. Evaluarea paternului a markerului CK5 a fost efectuată în corespundere cu sistemul de gradare propus de Azoulay și coaut., (2005), tumorile cu scor +1 / +3 au fost considerate pozitive. Evaluarea receptorului EGFR a fost efectuată în corespundere cu ghidul Dako, EGFR PharmDXTM (Dako, Denmark). Conform acestui ghid, se acceptă orice cantitate numerică de celule tumorale, colorate membranar sau membranar/citoplasmatic, gradul fiind apreciat după comparare cu liniile celulare de control cu scor EGFR pre-determinat. Evaluarea paternului markerului nuclear p53 a fost efectuată în baza recomandărilor Yamashita et al. (2004), control pozitiv: limfocite colorate din stroma tumorii, iar evaluarea paternului Bcl2 - în corespundere cu recomandările lui Callagy et al. (2006): cazurile evaluate cu 0 și +1 sunt considerate negative.

### **3. Rezultate.**

#### **Carcinomul mamar ductal invaziv de tip NOS**

În cadrul tumorii primare, receptorul pentru estrogeni (ER), a fost cuantificat drept negativ în 25,4% cazuri. Restul cazurilor ER pozitive (74,6%) le-au fost atribuite următoarele scoruri Allred: +1 – 5,6% cazuri, +2 – 11,3% cazuri, +3 – 57,7% cazuri.

Receptorul pentru progesteron (PR) a fost considerat negativ în 36,6% cazuri. Celelalte cazuri 63,4% PR pozitive au fost repartizate după scorul Allred precum urmează: +1 – 5,6% cazuri, +2 – 12,7% cazuri, +3 – 45,1% cazuri.

Comparând valorile Allred pentru ER din tumora primară vs metastază s-a determinat că în 3 cazuri (4,2%) expresia ER se schimbă în urma metastazării și anume: într-un caz din negativ în pozitiv și în 2 cazuri din pozitiv în negativ. Schimbul expresiei s-a determinat doar în tumorile cu grad G2 și G3 de diferențiere. Prin compararea valorilor pentru PR de ambele localizări, s-a determinat că acesta s-a schimbat în 9,8% cazuri, și anume în 5,6% cazuri din negativ în pozitiv și în 4,2% cazuri din pozitiv în negativ. Identic cu ER, transferule de scor pentru PR au fost înregistrate doar la tumori cu grad G2 și G3 de diferențiere.

#### **Carcinomul mamar lobular invaziv de tip NOS**

În cadrul tumorii primare receptorul pentru ER a avut o expresie negativă în 18,75% cazuri și pozitivă în 81,25% cazuri, cu următoarea repartizare după scorul Allred: +2 – în 15,38% cazuri, +3 – 84,61% cazuri.

Receptorul PR a fost determinat precum urmează: scor 0 – 18,75% cazuri, scor +2 – 25% cazuri, scor +3 – 56,25% cazuri. Au fost înregistrate aproximativ aceleași relații dintre gradul de diferențiere al tumorilor și scorul pentru PR, precum anterior cu ER.

Evaluând expresia din metastază în raport cu valoarea ER din tumora primară s-a determinat un singur caz de transfer (6,25%), și anume de la +2 la negativ în nodul limfatic.

La compararea expresiei PR de localizare primară și metastatică s-a determinat 2 cazuri (12,5%) de transfer al expresiei din pozitiv în negativ.

Astfel, în baza evaluării receptorilor ER și PR s-au definit grupele hormon-dependente și hormon-independente.

### Concluzii:

1. Carcinoamele mamare invazive de tip ductal NOS și lobular sunt tumori în majoritatea cazurilor estrogen și progesteron pozitive, prezentând gradul G2 și G3 de diferențiere. Valoarea expresiei în metastaza limfonodală este influențată de tumora primară. Valoarea PR este în funcție de gradul expresiei ER.
2. Receptorii hormonal pentru ER și PR sunt instabili pe parcursul metastazării, iar receptorul pentru PR demonstrează o rată superioară a instabilității față de ER.
3. Valoarea expresiei receptorilor ER și PR nu depinde de tipul și vârsta pacientelor, gradul histologic al tumorii exprimând în majoritatea cazurilor gradul G2 și G3 de diferențiere.

Expresia cantitativă a ER, PR și Ki67 a stat la baza delimitării subtipurilor luminale A și B/Ki67<sup>înalt</sup>, iar markerul Her2/neu la identificarea tipului Her2<sup>+</sup> și luminal B/Her2<sup>+</sup> în tumoră și metastază. Analiza statistică a prezentat carcinomul mamar drept tumoare preponderent ER și PR pozitivă, HER2 negativă, cu un indice proliferativ Ki67 înalt, atât la nivel primar, cât și metastatic (tab. 1).

Tabelul. 1 Valorile medii a markerilor ER, PR, HER2, Ki67 în tumoarea primară și metastazele limfonodale.

		ER <sub>tm</sub>	PR <sub>tm</sub>	HER2 <sub>tm</sub>	Ki67 <sub>tm</sub>	ER <sub>mt</sub>	PR <sub>mt</sub>	HER2 <sub>mt</sub>	Ki67 <sub>mt</sub>
Lobular	M	2,2	1,9	0,4	23,8	1,8	1,5	0,4	16,9
	ES	0,3	0,3	0,2	5,2	0,3	0,3	0,1	3,6
Ductal	M	2,2	2,1	0,4	19,1	1,9	1,7	0,3	18,8
	ES	0,1	0,1	0,1	2,2	0,2	0,2	0,1	3,6

- Notă: **tm** – tumoare primară, **mt** – metastaza limfonodală; M – media aritmetică, ES – eroarea standard

Combinarea valorilor markerilor studiați a evidențiat subtipul molecular Luminal B drept cel mai frecvent întâlnit tip de cancer mamar în ambele tipuri histologice (tab. 2).

Tabelul.2 **Incidența și stabilitatea subtipurilor moleculare în dependență de tipul histologic al carcinomului mamar.**

Ductal			
Formatmsubt	Formamtsubt	n	%
?	?	3	4,23
?	?	1	1,41
?	?	2	2,82
Her2	Her2	7	9,86
<b>Her2</b>	<b>Luminal B/Her2/Ki67</b>	<b>1</b>	<b>1,41</b>
Luminal A	Luminal A	15	21,13
<b>Luminal A</b>	<b>Luminal B/Ki67</b>	<b>2</b>	<b>2,82</b>
<b>Luminal B/Her2/Ki67</b>	<b>Her2</b>	<b>1</b>	<b>1,41</b>
<b>Luminal B/Her2/Ki67</b>	<b>Luminal A</b>	<b>1</b>	<b>1,41</b>
<b>Luminal B/Her2/Ki67</b>	<b>Luminal B/Her2</b>	<b>1</b>	<b>1,41</b>
Luminal B/Her2/Ki67	Luminal B/Her2/Ki67	3	4,23
<b>Luminal B/Her2/Ki67</b>	<b>Luminal B/Ki67</b>	<b>2</b>	<b>2,82</b>
<b>Luminal B/Ki67</b>	<b>Luminal A</b>	<b>8</b>	<b>11,27</b>
Luminal B/Ki67	Luminal B/Ki67	24	33,80

Lobular			
Subtip Tm	Subtip Mt	n	%
?	?	1	6,25
Her2	?	1	6,25
Her2	Her2	1	6,25
Luminal A	?	1	6,25
Luminal A	Luminal A	3	18,75
<b>Luminal A</b>	<b>Luminal B/Ki67</b>	<b>1</b>	<b>6,25</b>
<b>Luminal B/Her2/Ki67</b>	<b>Luminal B/Ki67</b>	<b>1</b>	<b>6,25</b>
Luminal B/Ki67	Luminal B/Ki67	7	43,75

- Notă: cazurile cu transfer de scor sunt selectate cu **Bold**. ? – cazurile cu subtip neelucidat, **Tm** – tumoare primară, **Mt** – metastaza limfonodală.

Compararea subtipului molecular în carcinomul mamar ductal și lobular a pus în evidență 18 cazuri/ 20,68% cu transfer de scor pe parcursul metastazării.

#### **Concluzii:**

1. Subtipul Luminal B este cel mai frecvent tip de cancer mamar întâlnit.
2. Subtipurile moleculare nu sunt stabile la metastazare (20,68% cazuri cu transfer de scor).

Pentru relevarea rolului celulelor epiteliale, precum și evidențierea subtipurilor basal-like și 5-NP, au fost studiată citokeratina CK5/6 și expresia receptorului EGFR. Din cele 69 cazuri de tumori NOS (2 cazuri din motive tehnice s-au scos din studiu), 39 cazuri (56,5%) au fost evaluate ca EGFR negative vs 30 cazuri (43,5%) EGFR pozitive. Cazurile EGFR pozitive au fost repartizate după gradul de imunoexpresie precum urmează: scor +1 – 10 cazuri (14,5%), +2 – 16 cazuri (23,2%) și respectiv +3 – 4 cazuri (5,8%). În raport de gradul histologic de diferențiere cazurile EGFR pozitive au fost raportate ca: G2 – 16 cazuri (53,3%) față de G3 – 14 cazuri

(46,7%), pe când în cazurile cu EGFR negative, gradul G2 a predominat, fiind stabilit în 21 cazuri (53,8%), G3 – 16 cazuri (41%) și doar în 2 cazuri a fost apreciat gradul G1 – 5,1%.

CK5 a fost considerat negativ în majoritatea cazurilor (n=63). În raport de gradul histologic de diferențiere, cazurile CK5 negative au fost raportate ca: G2 – 33 cazuri (47,8%), G3 – 28 cazuri (40,6%) și doar în două cazuri a fost stabilit G1 – 2,9%. În cazurile pozitive a predominat G2 – 4 cazuri (5,7%) vs de G3 – 2 cazuri (2,8%) (tab. 3).

**Tabelul 3.** Expresia citokeratinei bazale CK5 și EGFR în funcție de scorul și gradul histologic de diferențiere al carcinomului de tip NOS.

EGFR	Grad	n	%
0	G1	2	2,9
0	G2	21	30,4
0	G3	16	23,2
1	G2	6	8,7
1	G3	4	5,8
2	G2	8	11,6
2	G3	8	11,6
3	G2	2	2,9
3	G3	2	2,9
<b>Total</b>		69	100,0

CK5	Grad	n	%
0	G1	2	2,9
0	G2	33	47,8
0	G3	28	40,6
1	G2	3	4,3
2	G2	1	1,4
2	G3	1	1,4
3	G3	1	1,4
<b>Total</b>		69	100,0

**Metastaza limfonodală.** Studiului comparativ, tumoare primară-metastază, au fost supuse 38 cazuri, repartizate după gradul de diferențiere în: G1 – 1 caz/2,6%, G2 – 16 cazuri/42,1% și G3 – 21 cazuri/55,3%. (tab. 4).

**Tabelul 4.** Expresia EGFR în tumora primară (EGFRtm) vs metastaza limfonodală (EGFRmt) în funcție de scor și gradul de diferențiere al tumorii

	EGFRmt	Grad	n	%
0	0	G1	1	2,6
0	0	G2	10	26,3
0	0	G3	11	28,9
<b>1</b>	<b>0</b>	<b>G3</b>	<b>1</b>	<b>2,6</b>
1	1	G2	2	5,3
1	1	G3	1	2,6
1	2	G3	1	2,6
<b>2</b>	<b>0</b>	<b>G2</b>	<b>1</b>	<b>2,6</b>
<b>2</b>	<b>0</b>	<b>G3</b>	<b>3</b>	<b>7,9</b>
2	2	G2	2	5,3
2	2	G3	3	7,9
2	3	G2	1	2,6
<b>3</b>	<b>0</b>	<b>G3</b>	<b>1</b>	<b>2,6</b>
<b>Total</b>			38	100,0

*Notă:* Cazurile cu transfer de scor au fost selectate cu **Bold**.



Testul t-Student nu a identificat diferențe statistic veridice dintre valoarea EGFR din tumora primară vs metastază ( $t = -1,96$ ,  $p < 0,06$ ). Mai mult, valoarea numerică a acestui receptor în metastază a corelat pozitiv cu scorul EGFR din tumora primară, inclusiv o corelație rezonabilă (0,40) cu semnificație statistică ( $p < 0,007$ ) dintre vârstă și gradul histologic de diferențiere (tab. 5).

**Tabelul 5.** Forța de asociere a scorului EGFR de diversă localizare, cu gradul de diferențiere al tumorii și vârsta pacienților

	EGFRmt	EGFRtm	Grad	Vârsta
<b>EGFRmt</b>				
$r_s$		0,63	-0,04	0,20
p		<b>0,0001</b>	0,398	0,113
<b>EGFRtm</b>				
$r_s$	0,63		0,15	-0,02
p	<b>0,0001</b>		0,184	0,442
<b>Grad</b>				
$r_s$	-0,04	0,15		0,40
p	0,398	0,184		<b>0,007</b>
<b>Vârsta</b>				
$r_s$	0,20	-0,02	0,40	
p	0,113	0,442	<b>0,007</b>	

**Grad** – gradul de diferențiere al tumorii. Rezultatele semnificativ statistic sunt selectate prin **Bold**.

$r_s$  – coeficientul de corelație Spearman și semnificația statistică (p). EGFRtm – expresia EGFR în tumora primară, EGFRmt – în metastază.

La compararea valorilor EGFR de ambele localizări sa determinat 6 cazuri/15,8% cu transfer de scor (tab. 2). De menționat, că toate aceste transferuri au ținut de pierderea paternului pozitiv în microambianța limfonodală.

Instabilitatea CK5 s-a determinat în 2 cazuri, cu dispariția acestui marker la nivel de metastază (tab. 6).

**Tabelul 6.** Expresia CK5 în tumora primară (CK5tm) vs metastaza limfonodală (CK5mt) în funcție de scor și gradul de diferențiere al tumorii.

CK5tm	CK5mt	Grad	No	%
0	0	G1	1	2,6
0	0	G2	15	39,5
0	0	G3	19	50,0
<b>2</b>	<b>0</b>	<b>G2</b>	<b>1</b>	<b>2,6</b>
<b>2</b>	<b>0</b>	<b>G3</b>	<b>1</b>	<b>2,6</b>
3	1	G3	1	2,6
Total			38	100

*Notă:* Cazurile cu transfer de scor au fost selectate cu **Bold**

Carcinomul mamar lobular invaziv (tumora primară). În acest studiu au fost incluse 16 cazuri, din care majoritatea au constituit-o tumorile EGFR negative (11 cazuri/68,75%), iar cazurile cu expresie pozitivă au fost grupate după scor precum: +1 – 1 caz/6,25%, +2 – 2 cazuri/12,5% și +3 – 2 cazuri/12,5%. În relație cu gradul de diferențiere sa determinat că majoritatea tumorilor (14 cazuri/87,5%) au grad G2 și G3, și doar 2 tumori/12,5%, EGFR negative au avut grad G1 (tab. 5).

**Tabelul 5.** Scorul EGFR în dependență de localizare, grupa de vârstă și gradul histologic al tumorii.

Expresia (după EGFRtm)	EGFRtm	EGFRmt	Gradul de diferențiere	n	%	% cazurilor cu transfer de scor
negativă	0	0	G1	2	12,5	-
	0	0	G2	5	31,2	
	0	0	G3	4	25	
pozitivă	1	1	G3	1	6,2	<b>2 cazuri / 12,5%</b>
	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>G2</b>	<b>1</b>	<b>6,3</b>	
	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>G3</b>	<b>1</b>	<b>6,3</b>	
	3	1	G3	2	12,5	
Total				16	100,0	

*Notă:* Cu **Bold** sunt selectate cazurile cu transfer de scor.

Eseul statistic de corelație a determinat o asociere pozitivă, de talie rezonabilă a scorului EGFR cu vârsta pacienților ( $r_s=0,43$ ,  $p<0,048$ ).

Ca și în cazul carcinoamelor ductale invazive, CK5 în majoritatea cazurilor a fost stabilit negativ. Din 16 cazuri analizate, 15 cazuri/93,7 % au fost evaluate cu scor "0" și doar într-un caz 6,3% cu scor +2. În raport cu gradul histologic sa determinat ca majoritatea tumorilor CK5 negative au un grad scăzut de diferențiere (G2 – 5 cazuri/31,3%, G3 – 6 cazuri/37,5%) și doar 2 cazuri/12,5% au fost carcinoame diferențiate G1. Cazul CK5 pozitiv a fost evaluat cu G2 (tab. 6).

**Tabelul 6.** Scorul CK5 în dependență de localizare, grupa de vârstă și gradul histologic al tumorii.

CK5tm	CK5mt	Grad	No	%	% cazurilor cu transfer de scor
0	0	G1	2	12,5	-
0	0	G2	5	31,2	
0	0	G3	6	37,5	
<b>0</b>	<b>1</b>	<b>G3</b>	<b>1</b>	<b>6,2</b>	<b>2 cazuri / 12,5%</b>
<b>0</b>	<b>2</b>	<b>G3</b>	<b>1</b>	<b>6,2</b>	
2	1	G2	1	6,2	-
Total			16	100	

*Notă:* Cu **Bold** sunt selectate cazurile cu transfer de scor.

Testul de corelație nu a evidențiat careva asocieri statistic semnificative dintre CK5 cu vârsta și gradul de diferențiere.

**Metastaza limfonodală.** Majoritatea tumorilor la nivel metastatic au fost evaluate cu scor EGFR zero – 13 cazuri/81,3% (tabelul 5).

La compararea valorilor EGFR de ambele localizări sa determinat că scorurile EGFR sunt statistic diferite ( $t=2,15$ , la un  $p<0,05$ ). Însă testul de corelație a evidențiat o asocieră pozitivă, puternică dintre valorile EGFR din tumora primară și metastază ( $r_s=0,74$ ,  $p=0,0004$ ) (tabelul 7).

**Tabelul 7.** Forța de asocieră dintre EGFR de diversă localizare cu gradul histologic al tumorii și vârsta pacienților: corelație după Spearman.

	EGFRtm	EGFRmt	Vârsta	Gradul de diferențiere
<b>EGFRtm</b>				
$r_s$		0,74	0,45	0,33
p		<b>0,0004</b>	<b>0,031</b>	0,091
<b>EGFRmt</b>				
$r_s$	0,74		0,14	0,39
p	<b>0,0004</b>		0,289	0,06
<b>Vârsta</b>				
$r_s$	0,45	0,14		0,57
p	<b>0,031</b>	0,289		<b>0,007</b>
<b>Gradul de diferențiere</b>				
$r_s$	0,33	0,39	0,57	
p	0,091	0,057	<b>0,007</b>	

$r_s$  – coeficientul de corelație Spearman; p – semnificația statistică. Cu **Bold** sunt selectate cazurile cu semnificație statistică veridică ( $p<0,05$ ).

Ca și în cazul tumorilor la nivel metastatic EGFR, majoritatea tumorilor au fost evaluate cu scor CK5 negativ – 13 cazuri/81,25%. Tumorile cu expresie CK5 pozitivă au fost repartizate după scor precum: CK5 +1 – 2 cazuri/12,5% și CK5 +2 – 1 caz/6,25% (tab. 6).

Forța de asocieră dintre valorile CK5 de ambele localizări a fost evaluată cu o corelație de talie înaltă, statistic semnificativă ( $r_s=0,65$ , la un  $p<0,002$ ). Diferențe statistice dintre expresia CK5 în tumora primară și metastază nu s-au determinat ( $t= -0,81$ ,  $p<0,43$ ). La analiza detaliată a expresiei CK5 în funcție de caz și localizare sa determinat 2 cazuri/12,5% de achiziționare de către celulele maligne a expresiei CK5 în ambianța limfonodală. Aceste cazuri au fost raportate la tumori cu grad G3. Cazuri de pierdere a expresiei CK5 la metastazare nu s-au semnalat.

**Triplu negativ.** Din cele 71 cazuri de tumori NOS studiate doar 6 cazuri (8,45%) au fost considerate tumori triplu negative. În cazul tumorilor lobular invazive un caz de carcinom a prezentat profil caracteristic tumorilor NP. Criterii pentru delimitarea acestui subtip au fost expresie negativă a ER, PR și HER2.

De menționat, că tumorile triplu negative în majoritatea cazurilor (4 din 6) au prezentat valori înalte pentru Ki67.

### **Concluzii:**

1. Carcinomul ductal invaziv tip NOS poate fi în egală măsură EGFR pozitiv sau negativ.
2. EGFR este instabil pe parcursul metastazării, iar cazurile de transfer implică exclusiv pierderea acestui receptor în microambianța nodului limfatic. Cazurile instabile au un grad histologic slab de diferențiere.
3. În cazul carcinomului lobular invaziv majoritatea o constituie tumorile EGFR negative, atât la nivel primar, cât și metastatic.
4. În carcinomul lobular valorile EGFR sunt dependente de localizare, însă scorul EGFR din metastază este statistic direct proporțional la valoarea acestuia din tumora primară.
5. Nu există diferențe semnificativ statistice dintre carcinoamele invazive de tip ductal și lobular privind expresia EGFR.
6. Carcinoamele invazive de tip ductal (NOS) și lobular în majoritatea cazurilor sunt CK5 negative.
7. Citokeratina bazală CK5 este instabilă pe parcursul metastazării carcinomului ductal invaziv tip NOS, aceasta manifestându-se prin pierderea expresiei în metastază.
8. În cazul carcinomului lobular invaziv se determină doar achiziționarea de către celulele tumorale a CK5 după metastazare. Rezultatele necesită o confirmare suplimentară din partea altor cercetători pe loturi de cazuri semnificativ mai mari (>16).
9. Tumorile triplu negative reprezintă cota minoritară de carcinoame mamare. Majoritatea acestor tumori au un caracter proliferant agresiv.

Dereglarea mecanismelor apoptozei a fost studiată prin analiza expresia proteinei p53, ceea ce reprezintă un factor prognostic, predictiv pentru răspunsul tumorii la diverse terapii, cât și proteina Bcl2, ce reglează moartea celulară și apoptoza. Acesta este un indicator independent de prognostic favorabil pentru toate tipurile de cancer mamar.

În carcinomul ductal invaziv de tip NOS 26 cazuri/36.6% nu au exprimat p53. Prezența acestei proteine s-a depistat în 39 cazuri/54.9%, gradul expresiei variind precum: +1 – 8 cazuri/11,3%, +2 – 16 cazuri/22,5% și +3 – 15 cazuri/21,1%. În 6 cazuri/8,5% expresia acestei proteine nu a putut fi examinată datorită finisării blocului histologic sau decelării secțiunii de pe lamă în timpul procedurii de demascare. Majoritatea cazurilor examinate au fost apreciate cu gradul G2 și G3 de diferențiere.

Testul de corelație Spearman a pus în evidență legături statistice de sens pozitiv dintre expresia p53 din tumora primară și LNM ( $r_s=0,70$ ,  $p<0,0001$ ). La examinarea încrucișată a expresiei p53 în ambele localizări am depistat 12 cazuri/16,9% care au evoluat cu transfer de

scor, și anume: 5 cazuri/7% cu achiziționarea p53 la metastazare, 7 cazuri/9,9% cu pierderea p53 în LNM.

În cazul Bcl2, 20 tumori NOS/28,2% au fost cuantificate drept negative, iar 45 cazuri/63,4% au exprimat Bcl2 din abundență, scorurile pozitive fiind repartizate precum: +2 – 7 cazuri/9,9% și 38 cazuri/53,5% cu +3 (tabelul 8). Testul de corelare a pus în evidență legături pozitive dintre expresia Bcl2 de ambele localizări ( $r_s=0,57$ ,  $p<0,0001$ ).

Compararea expresiei BCL2 de ambele localizări a pus în evidență 18 cazuri/25,4% cu transfer de scor, dintre care 2 cazuri/2,8% au evoluat cu achiziționare de Bcl2 în LNM, iar 16 cazuri/22,5% cu pierderea acestui marker în procesul de metastazare.

Corelarea expresiei Bcl2 și p53 nu a atins valori statistice credibile ( $r_s=0,01$ ,  $p<0,48$ ).

Compararea expresiei Bcl2 cu p53 de ambele localizări a evidențiat că instabilitatea Bcl2 în majoritatea cazurilor nu se asociază transferurile de scor ale p53. Doar 3 cazuri/4,2% au prezentat transferuri simultane ale p53 și Bcl2, însă de sens opus: p53 a devenit pozitiv în LNM, iar Bcl2 negativ.

În cazul carcinomului lobular s-a depistat că majoritatea (13 cazuri/81,3%) tumorilor sunt p53 pozitive, iar repartizarea după scor a fost după cum urmează: 0 – 3 cazuri/18,8%, +1 – 3 cazuri/18,8%, +2 – 6 cazuri/37,5% și +3 – 4 cazuri/25% (tab. 8). Testul de corelare a valorilor p53 de ambele localizări a pus în evidență legături puternice, de talie pozitivă ( $r_s=0,84$ ,  $p<0,0001$ ). La compararea expresiei p53 pe fiecare caz în parte a scos în evidență 3 tumori/18,8% cu instabilitate a p53 la metastazare. De menționat că toate cazurile instabile au evoluat cu pierderea p53 în sediul LNM.

Tumorile lobulare de asemenea cu predilecție au exprimat și proteina anti-apoptotică, Bcl2, repartizarea după scor fiind: 0 – 5 cazuri/31,3%, +1 – 1 caz/6,3%, +3 – 10 cazuri/62,5%. Corelarea valorilor Bcl2 în ambele localizări a evidențiat legături proporționale, veridice statistic, ( $r_s=0,61$ ,  $p<0,01$ ). Compararea valorilor Bcl2 pentru fiecare caz aparte, a scos în evidență 4 cazuri/25,1% cu transfer de scor după metastazare. De menționat că și în acest caz metastazele au evoluat doar cu pierderea Bcl2 în LNM.

### **Concluzii:**

1. Tumorile primare examinate, de tip ductal invaziv și lobular infiltrativ sunt preponderent Bcl2, p53 pozitive și au grad scăzut de diferențiere.
2. Bcl2 nu este stabil pe parcursul metastazării tumorilor de tip NOS, predominând cazurile de pierdere a acestuia în ambianța limfonodală. Cazurile de transfer implică numai tumori cu grad scăzut și moderat de diferențiere.
3. În cazul carcinomului lobular invaziv s-a depistat exclusiv pierderea expresiei Bcl2 și p53 după metastazare.

În baza studiului efectuat cu aplicarea metodei IHC s-a definitivat structura subtipurilor moleculare în baza corelării a markerilor incluși în studiu. Clasificarea moleculară a carcinomului de glandă mamară s-a efectuat conform recomandărilor lui Goldhirsch și coaut. (2013), care elucidează următoarele entități: Luminal A, Luminal B, HER2 pozitiv, Basal-like și 5NP (cu fenotip 5 negativ):

1. **Luminal A:** ER<sup>+</sup> și/sau PR<sup>+</sup>, HER2<sup>-</sup>, CK5<sup>-</sup>, Ki67<14%.

2. **Luminal B:**

a) Luminal B/Ki67: ER<sup>+</sup> și/sau PR<sup>+</sup>, HER2<sup>-</sup>, CK5<sup>-</sup>, Ki67>14%;

b) Luminal B/HER2: ER<sup>+</sup> și/sau PR<sup>+</sup>, HER2<sup>+</sup>, CK5<sup>-</sup>, Ki67<14%;

c) Luminal B/Her2/Ki67: ER<sup>+</sup> și/sau PR<sup>+</sup>, HER2<sup>+</sup>, CK5<sup>-</sup>, Ki67>14%.

3. **HER2 pozitiv:** ER<sup>-</sup>, PR<sup>-</sup>, HER2<sup>+</sup>, CK5<sup>-</sup>.

4. **Basal-like:** ER<sup>-</sup>, PR<sup>-</sup>, HER2<sup>-</sup>, CK5<sup>+</sup>.

5. **5NP:** ER<sup>-</sup>, PR<sup>-</sup>, HER2<sup>-</sup>, CK5<sup>-</sup>.

**Carcinomul ductal invaziv.** Conform studiului efectuat, în tumorile primare ductale de glandă mamară tip NOS, cota majoră le revine tumorilor de tipul Luminal (57 cazuri – 80,3%) cu prevalența tumorilor Luminal B (40 cazuri – 56,3%) față de tumorile Luminal A (17 cazuri – 23,9%). La descifrarea subtipurilor B s-a stabilit că el este neomogen, fiind caracterizat prin: Luminal B/Ki67 – 32 cazuri (45,01%) și Luminal B/Her2/Ki67 – 8 cazuri (11,3%). Celelalte subtipuri de tumori procentual erau în descreștere și anume: Her2<sup>+</sup> - 8 cazuri (11,3%), bazal-like și 5NP respectiv câte 3 cazuri cu valoarea procentuală a câte 4,22% (tab. 9).

Tabelul 9. Incidența subtipurilor moleculare de carcinom ductal invaziv de tip NOS în tumora primară.		
Subtipul molecular/TP	n/ %	
5NP	3	4,2
Basal Like	3	4,2
Her2	8	11,3
Luminal A	17	23,9
Luminal B/Her2/Ki67	8	11,3
Luminal B/Ki67	32	45,1

La analiza comparativă a lotului cu metastaze de asemenea s-a determinat prevalența tumorilor de tip Luminal (57 cazuri – 80,3%) cu o diminuare nesemnificativă a tumorilor Luminal B (33 cazuri – 46,5%) pe contul creșterii tumorilor Luminal A (24 cazuri – 33,8%). Ca și în lotul precedent, tumorile luminal B manifestă neomogenitate: Luminal B/Ki67 – 39,4%; Luminal B/Her2/Ki67 – 5,63% și luminal B/Her2 – 1,4% (tab. 10).

Subtipul molecular/ML	n/%	
5NP	4	5,63
Basal Like	2	2,81
Her2	8	11,3
Luminal A	24	33,8
Luminal B/Her2	1	1,4
Luminal B/Her2/Ki67	4	5,6)
Luminal B/Ki67	28	39,4

La analiza comparativă a lotului tumorilor cu metastaze schimbul de subtip molecular s-a determinat în 17 cazuri (23,9%). Acesta s-a manifestat prioritar prin achiziționarea markerilor receptorilor de tip luminal și prin prevalența tipului A (9 cazuri – 12,7%), luminal B (6 cazuri – 8,4%), HER2 și 5NP câte 1 caz, respectiv câte 1,4% (tab. 11).

Subtipul molecular/TP	Subtipul molecular/ML	n/%	
5NP	5NP	3	4,2
<b>BasalLike</b>	<b>5NP</b>	<b>1</b>	<b>1,4</b>
BasalLike	BasalLike	2	2,8
Her2	Her2	7	9,8
<b>Her2</b>	<b>Luminal B/Her2/Ki67</b>	<b>1</b>	<b>1,4</b>
Luminal A	Luminal A	15	21,2
<b>Luminal A</b>	<b>Luminal B/Ki67</b>	<b>2</b>	<b>2,8</b>
<b>Luminal B/Her2/Ki67</b>	<b>Her2</b>	<b>1</b>	<b>1,4</b>
<b>Luminal B/Her2/Ki67</b>	<b>Luminal A</b>	<b>1</b>	<b>1,4</b>
<b>Luminal B/Her2/Ki67</b>	<b>Luminal B/Her2</b>	<b>1</b>	<b>1,4</b>
Luminal B/Her2/Ki67	Luminal B/Her2/Ki67	3	4,2
<b>Luminal B/Her2/Ki67</b>	<b>Luminal B/Ki67</b>	<b>2</b>	<b>2,8</b>
<b>Luminal B/Ki67</b>	<b>Luminal A</b>	<b>8</b>	<b>11,3</b>
Luminal B/Ki67	Luminal B/Ki67	24	33,8

În raport cu gradul morfologic de diferențiere s-a stabilit că majoritatea tumorilor sunt de gradul G2 și G3 de diferențiere, respectiv 49,3% și 47,9%, iar gradul G1 fiind determinat doar în 2 cazuri (2,8%) în cadrul subtipurilor tumorilor luminal B, respectiv Her2/Ki67>14% și Ki67>14%.

La analiza activității proliferative în cadrul subtipurilor moleculare s-a stabilit rata majoră de proliferare > 14% în 48 cazuri (67,7%), respectiv, în 23 cazuri (32,3%) fiind < 14%. Indicele proliferativ fiind în particular determinat în cazul subtipurilor moleculare de tip Luminal B – 56,3%.

În raport cu factorii anti-apoptotici și cei apoptotici s-a stabilit următoarea structură intranozologică: tumori P53+ au fost stabilite în 39 cazuri (54,9%) vs 26 cazuri/36,6% care nu au

expresat p53. În cazul tumorilor Bcl2, 45 cazuri/63,4% au expresat Bcl2 din abundență, celelalte 20 tumori NOS/28,2% au fost cuantificate drept negative.

Atât în cazul factorilor apoptotici, cât și celor anti-apoptotici la examinarea încrucișată a receptorilor testați de ambele localizări s-a stabilit transfer de scor în 12 cazuri/16,9% pentru tumorile p53 și anume: 5 cazuri/7% cu achiziționarea p53 după metastazare, 7 cazuri/9,9% cu pierderea p53 în LNM, iar pentru tumorile Bcl2 în 18 cazuri/25,4%, dintre care 2 cazuri/2,8% au evoluat cu achiziționare de Bcl2 în LNM, iar 16 cazuri/22,5% cu pierderea acestui marker în procesul de metastazare.

În contextul menționat, **subtipul Luminal A** prezintă tumori cu predilecție G2 (16,9%), hormon-dependente (ER<sup>+</sup>, PR<sup>+</sup>), HER2<sup>-</sup>, CK5<sup>-</sup>, EGFR<sup>+</sup>, p53<sup>-</sup>, cu expresie marcată a Bcl2<sup>+</sup>, cu o activitate proliferativă redusă, Ki67 fiind <14% în 23,9% cazuri. Instabilitatea subtipului dat a fost determinată doar în 2 cazuri prin trecerea în Luminal B/Ki67 (2,8%) cu Ki67 evaluat ca >14%. La nivelul metastazelor limfonodale tumorile luminales de tip A au prezentat următoarele caracteristici: ER<sup>+</sup>, PR<sup>+</sup>, HER2<sup>-</sup>, CK5<sup>-</sup>, EGFR<sup>+</sup>, Bcl2<sup>+</sup>, p53<sup>-</sup> în prezența unei activități proliferative slab exprimate cu indicele Ki67 <14% în 33,8%.

**Subtipul Luminal B** cuprinde tumori cu predelecție G2 și G3 (respectiv câte 25,3%), hormon-dependente (ER<sup>+</sup>, PR<sup>+</sup>), HER2<sup>+</sup>, cu expresia marcată a Bcl2<sup>+</sup> și p53<sup>+</sup> și CK5<sup>-</sup>, EGFR<sup>+</sup>. În același timp s-a determinat că acest subtip este neomogen. Astfel, în cadrul subtipului dat s-au determinat: Luminal B/Ki67 - HER2<sup>-</sup>, CK5<sup>-</sup>, Ki67>14%; Luminal B/Her2/Ki67 - HER2<sup>+</sup>, CK5<sup>-</sup>, Ki67>14% și Luminal B/Her2 - HER2<sup>+</sup>, CK5<sup>-</sup>, Ki67<14%. Tumorile Luminal B sunt însoțite în majoritatea cazurilor de un indice proliferativ înalt, Ki67 fiind mai mare de 14% în 45% cazuri. Instabilitatea subtipului dat a fost stabilită în 13 cazuri (18,3%) cu trecerea preponderent în Luminal A (8 cazuri 11,3%). La nivelul metastazelor limfonodale tumorile luminales de tip B au prezentat următoarele caracteristici: ER<sup>+</sup>, PR<sup>+</sup>, HER2<sup>+</sup>, CK5<sup>-</sup>, EGFR<sup>-</sup>, Bcl2<sup>+</sup>, p53<sup>+</sup>. Activitatea proliferativă înaltă la fel a fost stabilită și în metastazele limfonodale (Ki67 >14% atestat în 45 %).

**Subtipul Her2** prezintă tumori cu predelecție G3 (7,04%), hormon-independente (ER<sup>-</sup>, PR<sup>-</sup>), HER2<sup>+</sup>, cu o activitate proliferativă în măsură egală înaltă și mică (câte 4 cazuri de Ki67 evaluat drept >14% și <14%, (5,6%). Instabilitatea subtipului dat a fost stabilită într-un caz (1,4%) cu trecerea la Luminal B/HER2/Ki67. În baza rezultatelor obținute acest profil a fost completat cu tumori p53 și Bcl2 pozitive, preponderent CK5 și EGFR negative. La nivelul metastazelor limfonodale de carcinom HER2 pozitiv în general a fost reflectat același profil molecular, ca și în tumora primară.

**Subtipurile Triplu negative: Basal-like și 5 NP.** Tumorile triplu negative au fost stabilite în 6 cazuri (8,45%). Numărul insuficient de cazuri nu a permis evaluarea statistică a cazurilor. În raport cu metastaza limfonodală, s-a stabilit instabilitate doar într-un singur caz - de la basal-like la 5 NP,



însoțit de un grad jos de diferențiere G3, activ proliferant (Ki67 >14%) și cu pierderea agresivității în mediul limfonodal (Ki67<14%).

**Carcinomul lobular invaziv.** Ca și în lotul precedent, clasificarea subtipurilor moleculare de tumori de glandă mamară a fost în corelație cu recomandările lui Goldhirsch și coaut. (2013). Studiul efectuat a stabilit prevalența tumorilor de tipul Luminal B, cota majoră constituindu-le cele de tip Luminal B/Ki67 (43,75%) vs tumorile Luminal A (31,3%). În lotul tumorilor cu metastaze limfonodale majoritatea tumorilor au fost definite ca Luminal B/Ki67 (56,3%) vs Luminal A (18,8%). Tumorile de tip HER2 și 5 NP au constituit cota minoritară de tumori atât în lotul primar, cât și cel metastatic, cu un caz bazal-like în metastaze. Astfel, la analiza comparativă a loturilor studiate s-a stabilit prezenta instabilității formelor molecular în 25% (tab. 12).

Tabelul 12. Coraportul subtipurilor moleculare de carcinom lobular invaziv de tip NOS în tumoarea primară vs de metastaza limfonodală		
Subtip Tm	Subtip Mt	n/%
5NP	5NP	1/6,25
<b>Her2</b>	<b>BasalLike</b>	<b>1/6,25</b>
Her2	Her2	1/6,25
<b>Luminal A</b>	<b>5NP</b>	<b>1/6,25</b>
Luminal A	Luminal A	3/18,75
<b>Luminal A</b>	<b>Luminal B/Ki67</b>	<b>1/6,25</b>
<b>Luminal B/Her2/Ki67</b>	<b>Luminal B/Ki67</b>	<b>1/6,25</b>
Luminal B/Ki67	Luminal B/Ki67	7/43,75

În raport cu gradul morfologic de diferențiere s-a stabilit că majoritatea tumorilor sunt de gradul G3 și G2 de diferențiere, respectiv 50% și 31,2%, iar gradul G1 fiind determinat doar în 2 cazuri (18,8%) în cadrul subtipurilor tumorilor luminal A.

La analiza activității proliferative în cadrul subtipurilor moleculare s-a stabilit în raport egal Ki67 >14% și < 14%.

În cazul carcinomului lobular s-a depistat că majoritatea (13 cazuri/81.3%) tumorilor sunt p53 pozitive. Testul de corelare a valorilor p53 din ambele localizări a pus în evidență legături puternice, de talie pozitivă ( $r_s=0.84$ ,  $p<0.0001$ ). La compararea expresiei p53 în fiecare caz aparte a scos în evidență 3 tumori/18.8% cu instabilitatea p53 la metastazare. De menționat că toate cazurile instabile au evoluat cu pierderea p53 în sediul LNM.

Tumorile lobulare de asemenea au prezentat și proteina anti-apoptotică, Bcl2 în 68,8% cazuri. Corelarea valorilor BCL2 în ambele localizări a evidențiat legături proporționale, veridic statistic, ( $r_s=0.61$ ,  $p<0.01$ ). Compararea valorilor Bcl2 pentru fiecare caz aparte, a scos în evidență 4 cazuri/25.1% cu transfer de scor după metastazare. De menționat că și în acest caz metastazele au evoluat doar cu pierderea Bcl2 în LNM.

În sumar, ca și în cazul subtipurilor moleculare de carcinoame ductale invazive, la examinarea subtipurilor moleculare de carcinoame lobulare invazive vs markerii incluși în studiu nu s-a

determinat nici o o combinație proprie unui subtip separat, fiecare tumoare prezentând un panel imunohistochimic ca un caz personalizat.

Studiul cancerului se axează preponderent pe celulele tumorale. Dar încă în 1889 Paget a propus teoria “seminței și a solului”, care sugerează că celulele neoplazice (semința) pot iniția formarea tumorii numai într-un mediu ospitalier și susținător (sol).

Abia recent cercetătorii au început să se focalizeze nu numai asupra celulelor neoplazice, dar și asupra modificărilor semnificative în stroma adiacentă, recunoscute atât drept elemente critice pentru dezvoltarea și progresia cancerului mamar, cât și potențiale ținte terapeutice.

Astfel, Raica *et al.* au demonstrat corelația dintre mastocite și vasele limfatice în unele subtipuri moleculare de cancer mamar. Ribatti *et al.* au demonstrat că angiogeneza este mai activă în ariile infiltrate cu mastocite din nozii limfatici asociați cu micrometastaze comparativ cu cei fără.

Deoarece literatura ne oferă date contradictorii referitor la rolul mastocitelor și a macrofagelor în cancerul mamar, scopul studiului a fost studierea interrelațiilor dintre densitatea și distribuția mastocitelor și a macrofagelor în stroma intratumorală, cât și cea peritumorală în diferite subtipuri moleculare de cancer mamar.

Studiul recent vizează stabilirea legăturii dintre mastocite și macrofage și receptorii hormonal și statutul HER2 în carcinomul de glandă mamară în raport de formele moleculare.

Astefl, studiul din ultimul an a inclus un număr de 80 paciente cu diagnosticul de carcinom mamar. Toate procedurile au fost efectuate conform referirilor la principiile Declarației de la Helsinki și au fost aprobate de Comitetul de Etică al USMF Nicolae Testemițanu nr. 33/ 37 / 12.02.2018.

Identificarea macrofagelor au fost efectuată cu ajutorul markerului CD68 cu patern citoplasmatic. La analiza expresiei markerului CD68 în stroma tumorală s-a stabilit o diversitate a scorurilor și anume: scoruri maxime au fost stabilite în stroma intratumorală cu o valoare medie de 2,0 vs de stroma peritumorală (1,4). În raport de formele moleculare, cele mai înalte valori medii a macrofagelor intratumorale au fost înregistrate în subtipul molecular Luminal A (valoarea medie  $1.83 \pm 0.71$ ), iar a celor peritumorale în subtipul triplu negativ (valoarea medie  $2.1 \pm 0.92$ ). Testul de corelație Spearman a pus în evidență o corelație negativă semnificativă statistic dintre expresia CD68 în stroma intratumorală și markerul molecular Her2 ( $r_s = -0.23$ ,  $p < 0.02$ ), (tab. 13).

Tabelul 13. Analiza comparativă a vârstei pacientelor, gradului tumorii și markerilor moleculari

	Vârsta	Grad	ER	PR	HER2	CD68it	CD68pt
<b>Vârsta</b>							
rs		0,31	0,26	0,09	-0,06	0,22	-0,02
P		0,13	0,18	0,38	0,42	0,22	0,47
<b>Grad</b>							
rs	0,31		0,19	-0,30	0,00	0,40	-0,19
P	0,13		0,25	0,14	0,50	0,07	0,25
<b>ER</b>							
rs	0,26	0,19		0,39	0,32	0,18	-0,30
P	0,18	0,25		0,07	0,12	0,25	0,14
<b>PR</b>							
rs	0,09	-0,30	0,39		0,42	0,23	-0,24
P	0,38	0,14	0,07		0,06	0,20	0,20
<b>HER2</b>							
rs	-0,06	0,00	0,32	0,42		-0,25	<b>-0,53</b>
P	0,42	0,50	0,12	0,06		0,19	<b>0,02</b>
<b>CD68it</b>							
rs	0,22	0,40	0,18	0,23	-0,25		0,33
P	0,22	0,07	0,25	0,20	0,19		0,11
<b>CD68pt</b>							
rs	-0,02	-0,19	-0,30	-0,24	<b>-0,53</b>	0,33	
P	0,47	0,25	0,14	0,20	<b>0,02</b>	0,11	

Notă: Vârsta – vârsta pacientelor; Grad – gradul tumorii; ER – receptorul pentru estrogen; PR - receptorul pentru progesteron; HER2 - human epidermal growth factor receptor 2; CD68it – celule intratumorale CD68<sup>+</sup>; CD68pt – celule CD68<sup>+</sup> peritumorale ; rs – coeficientul de corelație Spearman. Valorile semnificative statistic (p<0,05) au fost marcate prin bold.

Analiza mastocitelor a fost efectuată în baza evaluării expresiei triptazei mastocitare. Mastocitele colorate în maro au fost identificate în toate preparatele, manifestând 2 pattern-uri: degranulate și granulate.

În cazul mastocitelor a fost observată o prevalență a acestora în stroma peritumorală, cu tendința de a înconjuța grupurile din celule tumorale. Analizând cele 80 de cazuri, am stabilit că valoarea medie pentru mastocitele peritumorale a constituit 12.2±12.5, valoarea maximală fiind 65 de celule, pe când valoarea medie a mastocitelor intratumorale a fost 3.5±5.5, atingând maximul de 27.6 celule.

Cele mai înalte valori ale mastocitelor, atât în stroma peri- cât și cea intratumorală, au fost determinate în subtipurile luminal B și A (tab. 14).

Tabelul 14. Valoarea medie  $\pm$  deviația standard a mastocitelor intra- și peritumorale.

Subtip molecular	MCit	MCpt
Luminal A	4,45 $\pm$ 5,65	9,95 $\pm$ 8,57
Luminal B	4,34 $\pm$ 6,33	15,66 $\pm$ 14,54
HER2 <sup>+</sup>	1,34 $\pm$ 1,85	5,22 $\pm$ 3,62
Triplu-negativ	0,88 $\pm$ 0,82	6,72 $\pm$ 6,24

Testul de corelație Spearman, în subtipul luminal A, a depistat o corelație semnificativă statistic dintre mastocitele intratumorale și expresia PR ( $r_s=0.703$ ,  $p=0.005$ ). Testul de corelație Pearson, în subtipul Luminal B a depistat de asemenea corelații pozitive dintre mastocitele intra- și peritumorale ( $r=0.446$ ,  $p=0.002$ ) și între mastocitele peritumorale și receptorii hormonali (ER:  $r=0.351$ ,  $p=0.017$  și PR:  $r=0.311$ ,  $p=0.035$ ). Mastocitele peritumorale au corelat pozitiv cu vârsta ( $r=0.382$ ,  $p=0.009$ ) și celulele tumorale HER2+ ( $r=0.680$ ,  $p=0.044$ ) în subtipul HER2+. În subtipul triplu negativ, mastocitele peri- și intratumorale au corelat pozitiv unele cu altele ( $r=0.825$ ,  $p=0.002$ ) (tab. 15).

Tabelul 15. Analiza comparativă de corelație a mastocitelor și formelor moleculare tumorale

Luminal A	HER2 <sup>+</sup>
MCit și PR ( $r_s=0.703$ , $p=0.005$ )	MCpt și celule HER2 <sup>+</sup> ( $r=0.680$ , $p=0.044$ )  MCpt și vârsta ( $r=0.382$ , $p=0.009$ )
Luminal B	Triplu negativ
MCit și MCpt ( $r=0.446$ , $p=0.002$ )  MCpt și ER ( $r=0.351$ , $p=0.017$ ) MCpt și PR ( $r=0.311$ , $p=0.035$ )	MCit și MCpt ( $r=0.825$ , $p=0.002$ )

**Rezumat:** Evaluarea imunofenotipică a subtipului molecular în tumoarea primară și metastazele limfonodale în carcinomul invaziv de glandă mamară; 15.817.04.09F; **director** – David Valeriu, dr. șt. med., conf. universitar.

**Actualitate.** Carcinomul mamar este neoplazia frecventă întâlnită la femei, înregistrând în lume peste 1 mln de cazuri noi/an și constituie circa 18% din decesele prin neoplazii, dezvoltând în 50% cazuri metastaze, preponderent în nozii limfatici. Tactica de tratament depinde de stadiul progresiei și tipul morfologic al tumorii. Întru eficientizarea tratamentului și evaluarea genezei, progresiei și riscului de recidivă, sunt determinate subtipurile moleculare a carcinomului mamar, procedeele de diagnostic fiind axate pe tumora primară. **Scopul:** Proiectul constă în studiul comparativ al subtipului molecular al tumorii primare și metastazelor sale limfonodale în carcinomul mamar invaziv de tip NST: *ductal și lobular*, cât și impactul elementelor stromale în raport de formele moleculare cu determinarea stabilității fenotipului molecular al tumorii pe parcursul metastazării. **Material și metode.** În calitate de obiect de studiu a servit materialul biologic tumora primară și metastaza limfonodală prelevat postoperator cu selectarea cazurilor diagnosticate cu carcinom mamar invaziv de tip ductal fără antecedente de chimio- sau radioterapie. Toate cazurile au fost procesate primar conform procedurilor standard, aplicarea metodelor de colorație cu hematoxină-eozină și imunohistochemice cu anticorpii: Er, Pr, Her2, Ki67, CK5, EGFR, p53, Bcl2, CD68, triptaza mastocitară. **Rezultate.** S-a stabilit că carcinoamele mamare invazive de tip ductal NOS și lobular sunt tumori hormon-dependente, prezentând gradul G2 și G3 de diferențiere. Valoarea expresiei în metastaza limfonodală este influențată de tumora primară. Valoarea PR este în funcție de gradul expresiei ER. Receptorii hormonal pentru ER și PR sunt instabili pe parcursul metastazării, iar receptorul pentru PR demonstrează o rată superioară a instabilității față de ER. Carcinomul ductal invaziv tip NOS poate fi în egală măsură EGFR pozitiv sau negativ. EGFR este instabil pe parcursul metastazării, cazurile instabile având un grad histologic slab de diferențiere. În cazul carcinomului lobular invaziv majoritatea o constituie tumorile EGFR negative, atât la nivel primar, cât și metastatic. În carcinomul lobular valorile EGFR sunt dependente de localizare, însă scorul EGFR din metastază este statistic direct proporțional la valoarea acestuia din tumora primară. Nu există diferențe semnificativ statistice dintre carcinoamele invazive de tip ductal și lobular privind expresia EGFR. Carcinoamele invazive de tip ductal (NOS) și lobular în majoritatea cazurilor sunt CK5 negative. Citokeratina bazală CK5 este instabilă pe parcursul metastazării carcinomului ductal invaziv tip NOS. Tumorile triplu negative reprezintă cota minoritară de carcinoame mamare. Majoritatea acestor tumori au un caracter proliferant agresiv. Tumorile primare examinate, de tip ductal invaziv și lobular infiltrativ sunt preponderent Bcl2, p53 pozitive și au grad scăzut de diferențiere, ambii markeri ne fiind stabili pe parcursul metastazării.

În carcinomul de glandă mamară se atestă o diferențiere selectivă a celulelor stromale intra- și peritumorale, mult mai accentuate în cazul mastocitelor cu o corelație semnificativă statistic în raport de formele moleculare.

**Concluzii.** În structura nozologică a carcinomului mamar invaziv atât în tumoarea primară, cât și în metastaza limfonodală, domină tumorile hormon-dependente grupului Luminal, cu prevalarea grupului subtipului molecular de tip Luminal B, tumorile activ proliferative fiind cele mai instabile la metastazare. Carcinomul de glandă mamară induce defecțiuni a mecanismelor apoptozei cu schimbarea fenotipului molecular al tumorii, pierzând parțial receptorii p53 cu Bcl2 înalt în ambianța limfonodală. În carcinomul de glandă mamară macrofagele prevalează în stroma intratumorală, iar mastocitele sunt localizate preponderent peritumoral, în care macrofagele CD68 sunt influențate de expresia HER 2 (corelație negativă semnificativă statistic), iar dinamica mastocitelor este influențată de expresia ER $\alpha$  și PR în subtipurile luminală și ER $\beta$  în subtipul triplu-negativ, receptorii hormoni constituind factori chemotactici pentru mastocite.

**Cuvinte-cheie:** carcinom mamar, subtipuri moleculare, metastaze limfonodale, markeri hormoni.

## Concluzii:

1. În structura nozologică a carcinomului mamar ductal invaziv atât în tumoarea primară, cât și în metastaza limfonodală, domină tumorile hormon-dependente grupului Luminal, cu prevalarea grupului subtipului molecular de tip Luminal B.
2. În procesul de metastazare are loc schimb de subtip molecular cu achiziționarea markerilor receptorilor de tip luminal, tumorile activ proliferative fiind cele mai instabile.
3. Majoritatea tumorilor prezintă gradul G2 și G3 de diferențiere histologică cu indice proliferativ diferit în raport de forma moleculară, metastaza limfonodală.
4. La analiza activității proliferative în cadrul subtipurilor moleculare s-a stabilit că majoritatea tumorilor sunt activ proliferative, activitatea proliferativă înaltă fiind în particular determinată în tumorile de tip Luminal B.
5. Subtipul Luminal A sunt preponderent tumori (hormon-dependente), p53<sup>-</sup> negative și Bcl2 înalt pozitive, instabil pe parcursul metastazării.
6. Subtipului Luminal B sunt tumori (hormon-dependente), p53<sup>+</sup> și Bcl2 înalt pozitive instabil pe parcursul metastazării.
7. Subtipul HER2 sunt tumori hormon-independente, cu predilecție slab diferențiate, completat cu expresia pozitivă a p53 și Bcl2. Acest subtip este instabil pe parcursul metastazării cu păstrarea profilului imunohistochimic (ER<sup>-</sup>, PR<sup>-</sup>), HER2<sup>+</sup>, preponderent CK5 și EGFR negative cu păstrarea activității proliferative și achiziționarea receptorilor luminali.
8. În structura nozologică a carcinomului mamar lobular invaziv atât în tumoarea primară, cât și în metastaza limfonodală, domină tumorile hormon-dependente grupului Luminal, cu prevalarea grupului subtipului molecular de tip Luminal B.
9. Subtipurile moleculare de carcinom lobular sunt instabile pe parcursul metastazării, evoluând cu pierderea receptorilor luminali, cu prezentarea gradului G2-G3 de diferențiere și pierderea expresiei p53 și Bcl2 după metastazare.
10. Ca și în cel lobular, subtipul HER2 sunt tumori hormon-independente, slab diferențiate, completate cu p53 și Bcl2 pozitive, degradat în bazal-like în metastază.
11. Carcinomul de glandă mamară induce defecțiuni a mecanismelor apoptozei cu schimbarea fenotipului molecular al tumorii, pierzând parțial receptorii p53 cu Bcl2 înalt în ambianța limfonodală.
12. În carcinomul de glandă mamară macrofagele prevalează în stroma intratumorală, iar mastocitele sunt localizate preponderent peritumoral.
13. Macrofagele CD68 pozitive din stroma intratumorală sunt influențate de expresia Her2, astfel proteina Her2 micșorează migrarea acestora în cuibul tumoral, inclusiv și

răspunsul imun (corelație negativă semnificativă statistic dintre expresia CD68 în stroma intratumorală și markerul molecular Her2 ( $r_s = -0.23$ ,  $p < 0.02$ )).

14. Dinamica mastocitelor este puternic influențată de receptorii hormonal: ER $\alpha$  și PR în subtipurile luminală și ER $\beta$  în subtipul triplu-negativ, receptorii hormonal constituind factori chemotactici pentru mastocite. Chemotaxisul și activarea mastocitelor de către receptorii hormonal creează un cerc vicios: se induce angio- și limfangiogeneza, ceea ce stimulează continuarea proliferării celulelor tumorale, acestea expresând și mai mulți receptori hormonal (date confirmate de corelațiile pozitive semnificative statistic dintre mastocite și receptorii hormonal).



Participarea în programe și proiecte internaționale (ORIZONT 2020, SCOPES, JOP, IRISIS, NATO, etc.), inclusiv propunerile prezentate/câștigate în cadrul concursurilor naționale/internaționale cu tangență la tematica cercetării proiectului realizat.

Proiect bilateral Moldo-Român: „Perfecționarea studenților și medicilor rezidenți în implementarea diagnosticului molecular al cancerului mamar în romania și republica moldova”.

**Coordonator:** Partea română: Marius Raica – director de proiect.

Partea moldovenească: Șaptefrați Lilian – director de proiect.

**Parteneri:** UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE „VICTOR BABEȘ”  
TIMIȘOARA

**Buget total:** 200000 lei

**Durata:** 2016-2017

**Obiectiv principal:** Îmbunătățirea diagnosticului cancerului mamar

**Rezultatul principal:** Inițierea unui program de training prin voluntariat pentru studenții în medicină și tinerii rezidenți în anatomie patologică, program care constă în aplicarea de către aceștia a unui protocol de detecție și diagnostic precoce precum și a unui diagnostic molecular complet al cazurilor de cancer mamar aflate deja în stadiul avansat. Inițierea unui registru național de evidență a subtipurilor moleculare de cancer mamar în țările partenere acesta reprezintă al doilea obiectiv principal pe care ni le vom propune în cadrul acestui proiect pentru pacientele din Republica Moldova incluse în studiu. Identificarea și caracterizarea cazurilor de cancer mamar triplu negative precum și impactul expresiei receptorilor de androgeni în această subclasă de cancer mamar.

## LISTA

lucrărilor publicate în cadrul proiectului de cercetare

– **Monografii (naționale)**

1. FULGA, V. *Eterogenitatea tipurilor histologice a cancerului de sân: origini, cauze și aplicare practică*. Chișinău.: Impressum, 2016, 178 p. ISBN 978-9975-3069-8-0.

– **articole din reviste naționale:**• **categoria B**

1. CARPENCO, E. Tumor associated macrophages in breast cancer. *Moldovan Medical Journal*. 2019, nr. 62(1), 24-27. ISSN 2537-6373.
2. CARPENCO, E. The key players of tumor microenvironment and their role in breast cancer. *Moldovan Medical Journal*. 2019, nr. 62(3), 67-71. ISSN 2537-6373.
3. FULGA, V. Carcinomul mamar: conceptele moleculare de structură și patogenie. *Curierul medical*. 2015, vol.58, nr.1, 60-68. ISSN 1857-0666.
4. FULGA, V.; RUDICO, L.; MAZURU, O. ș.a. Carcinomul mamar lobular invaziv: are componentă celulară omogenă? *Buletinul Academiei de Științe Medicale a Moldovei*. 2015, 1(46), 99-102. ISSN 1857-0011.
5. FULGA, V.; MAZURU, O.; RUDICO, L. ș.a. Carcinomul mamar ductal invaziv – viziune prin prisma apoptozei. *Buletinul Academiei de Științe Medicale a Moldovei*. 2015, 1(46), 103-106. ISSN 1857-0011.
6. FULGA, V. Epidemiologia chimiorezistenței în terapia cancerului mamar. *Curierul medical*. 2015; vol.58, nr.3, 54-57. ISSN 1857-0666.
7. FULGA, V.; MAZURU, O.; DAVID, V. ș.a. Stabilitatea citokeratinei bazale CK5 în procesul de metastazare a carcinomului mamar. In: *Buletinul Academiei de Științe Medicale a Moldovei*. 2016, 1(50), 180-183. ISSN 1857-0011.
8. FULGA, V.; MAZURU, V.; DAVID, V. ș.a. Activitatea proliferativă a carcinomului mamar ductal invaziv în funcție de expresia citokeratinei bazale CK5. *Buletinul Academiei de Științe Medicale a Moldovei*. 2016, 1(50), 184-187. ISSN 1857-0011.
9. FULGA, V.; MAZURU, O.; DAVID, V. ș.a. Expresia markerului pro-apoptotic p53 în dependență de activitatea proliferativă a carcinomului mamar ductal invaziv. *Buletinul Academiei de Științe Medicale a Moldovei*. 2016, 1(50), 188-191. ISSN 1857-0011.
10. FULGA, V.; DAVID, V.; RUDICO, L. ș. a. Expresia estrogen receptorului Era în dependență de tipul morfologic al carcinomului mamar. *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale*. 2017, 2(54), 232-237. ISSN 1857-0011.

11. FULGA, V.; MAZURU, V.; DAVID, V. ș.a. Carcinomul mamar ductal invaziv fără tip histologic special: posedă oare o structură celulară omogenă? *Moldovan Journal of Health Sciences*. 2015; 1(3), 27-36. ISSN 2345-1467.

– **articole în culegeri (naționale):**

1. DAVID, V.; FULGA, V.; RUDICO, L. ș.a. Expresia EGFR vs CK5 în carcinomul mamar. *Culegeri de articole științifice consacrată aniversării a 90-a de la nașterea ilustrului medic și savant Nicolae Testemițanu*. Chișinău, Medicină, 2017, p. 79-85. ISBN 978-9975-82-063-9.
2. DAVID, V.; FULGA, V.; RUDICO, L. ș.a. Expresia EGFR în funcție de activitatea proliferativă a carcinomului mamar. *Culegeri de articole științifice consacrată aniversării a 90-a de la nașterea ilustrului medic și savant Nicolae Testemițanu*. Chișinău, Medicină, 2017, p. 85-91. ISBN 978-9975-82-063-9.
3. FULGA, V.; RUDICO, L.; DAVID, V. ș.a. Evoluția markerului de proliferare Ki67 în procesul de metastazare a cancerului de sân. *Culegeri de articole științifice consacrată aniversării a 90-a de la nașterea ilustrului medic și savant Nicolae Testemițanu*. Chișinău, Medicină, 2017, p. 107-114. ISBN 978-9975-82-063-9.

– **comunicări la manifestări științifice naționale:**

1. RUDICO, L.; FULGA, V.; MAZURU, O. ș.a. Suportul factorilor moleculari în dezvoltarea glandei mamare. *Probleme actuale ale morfologiei*. Conferința Științifică Internațională dedicată celor 70 de ani de la fondarea USMF “Nicolae Testemițanu”, Chișinău, 2015, 93-96. ISBN 978-9975-57-194-4.
2. FULGA, V.; RUDICO, L.; MAZURU, V. ș.a. Carcinomul mamar invaziv – evoluția receptorului factorului de creștere epidermală în procesul metastatic. *Probleme actuale ale morfologiei*. Conferința Științifică Internațională dedicată celor 70 de ani de la fondarea USMF “Nicolae Testemițanu”, Chișinău, 2015, 41-47. ISBN 978-9975-57-194-4.
3. FULGA, V.; DAVID, V.; MAZURU, V. ș.a. Evoluția markerului HER2 în procesul metastatic al carcinomului mamar ductal invaziv. Conferința științifică “Nicolae Anestiadi - nume etern al chirurgiei basarabene”. *Arta medica*, Chișinău, 2016, Nr.3 (60), 71-72. ISSN 1810-1852.
4. FULGA, V.; DAVID, V.; MAZURU, O. ș.a. Expresia receptorilor hormoni în carcinomul mamar. Conferința științifică “Nicolae Anestiadi - nume etern al chirurgiei basarabene”. *Arta medica*, Chișinău, 2016, Nr.3 (60), 72-73. ISSN 1810-1852.
5. FULGA, V.; DAVID, V.; MAZURU, V. ș.a. Evoluția markerului BCL2 în funcție de activitatea proliferantă al carcinomului mamar ductal invaziv. Conferința științifică

“Nicolae Anestiadi - nume etern al chirurgiei basarabene”. *Arta medica*, Chişinău, 2016, nr.3 (60), 73-74. ISSN 1810-1852.

– **articole din reviste cu factor de impact:**

• *articole din reviste cu factor de impact* **1,0-2,9**

1. CARPENCO, E.; CEAUSU, R.A.; CIMPEAN, A.M.; GAJE P.N.; SAPTEFRATI, L.; FULGA, V.; DAVID V.; RAICA, M. Mast cells as an indicator and prognostic marker in molecular subtypes of breast cancer. *IN VIVO*. 2019, 33(3):743-748. ISSN: 0258-851X. (IF: 1.609).
2. FULGA, V.; RUDICO L.; BALICA A.R. ş.a. M. Differential expression of E-cadherin marker in primary breast cancer and correspondent lymph node metastasis. *Anticancer Res*. 2015, 35(2), 759-765, ISSN: 0250-7005 (print) ISSN: 1791-7530 (online). (IF: 1.872).
3. FULGA, V.; RUDICO, L.; BALICA, A.R. ş.a. Invasive ductal carcinoma of no special type and its corresponding lymph node metastasis: do they have the same immunophenotypic profile? *Pol J Pathol*. 2015; 66(1), 30-37. doi:10.5114/pjp. 2015.51150 (IF: 1.128).

– **rezumate (teze) ale comunicărilor la congrese, conferințe, simpozioane, în culegeri de materiale consacrate manifestărilor științifice internaționale**

1. FULGA, V.; RUDICO, L.; MAZURU, O. ş.a. BCL2 receptor – a controversial marker in invasive breast carcinoma. II Scientific Conference „Fundamental and clinical medicine”, Kyiv, May 20-22, 2015, p. 7.
2. FULGA, V.; MAZURU, V.; DAVID, V. ş.a. Cellular proliferation activity of the breast carcinoma of no special type during metastatic process. *Al XIII-lea Simpozion Național de Morfologie Microscopică cu participare internațională*, Craiova, 4-6 iunie, 2015, p. 61-62. ISBN 978-606-11-4705-2.
3. FULGA, V.; MAZURU, V.; DAVID, V. ş.a. Luminal B molecular subtype of breast carcinoma: does it have homogenous cell structure? *Al XIII-lea Simpozion Național de Morfologie Microscopică cu participare internațională*, Craiova, 4-6 iunie, 2015, p. 63-64. ISBN 978-606-11-4705-2.
4. FULGA, V.; MAZURU, V.; DAVID, V. ş.a. Invasive breast carcinoma of no special type: primary tumor versus lymph node metastases. *Al XIII-lea Simpozion Național de Morfologie Microscopică cu participare internațională*, Craiova, 4-6 iunie, 2015, p. 65-66. ISBN 978-606-11-4705-2.

– **lista tezelor de licență**

1. BUTNARU, A. Anul VI, gr. M1311. Profilul imunohistochimic al epiteliului ductal mamar în carcinomul mamar. Chișinău, 2019. Conducător: Fulga Veaceslav, dr. hab. șt. med., conf. universitar.
2. MIHAILOV, C. Anul VI. M1318. Limfangiogeneza vs angiogeneza tumorală. Importanța clinică și prognostică în carcinomul mamar invaziv. Chișinău, 2019. Conducător științific: Rudico Lucian, asistent universitar, cer. șt.
3. BÎLICI D. Anul IV, gr. MM1333. Chișinău, 2019. Limfangiogeneza în carcinoamele mamare. Conducător științific: Rudico Lucian, asistent universitar, cer. șt.

## Fișa de prezentare a rezultatelor proiectului de cercetare

## I. Sumarul activităților proiectului realizate

	<i>Activități planificate</i>	<i>Activități realizate și rezultate noi obținute în cadrul proiectului (150 cuvinte)</i>
I.	<p>1. Determinarea profilului hormonal (ER și PR), expresia markerului Her2/neu și a indicelui de proliferare Ki67 în carcinoamele invazive mamare de tip ductal și lobular (evaluarea numerică în tumora primară și metastazele limfonodale).</p> <p>2. Studiul comparativ al subtipurilor moleculare Luminal A, Luminal B/Her2<sup>+</sup>, Luminal B/Ki67<sup>înalt</sup>, Her2/neu, triplu negativ/basal like și 5-NP (fenotip cinci negativ) în tumora primară și metastazele limfonodale.</p> <p>3. Evaluarea rolului mecanismelor apoptotice la schimbarea fenotipului molecular al tumorii pe parcursul metastazării (p53, BCL2).</p> <p>4. Studiul stabilității legăturii dintre mastocite și</p>	<p>În calitate de obiect de studiu a servit materialul biologic (tumora primară și metastaza limfonodală prelevat postoperator de la 87 paciente cu vârsta 59.3±1.2 cu selectarea cazurilor diagnosticate cu carcinom mamar invaziv de tip ductal NST fără chimio- sau radioterapie.</p> <p>Conform studiului efectuat relevă următoarele rezultate principale:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>În structura nozologică a carcinomului mamar invaziv domină tumorile hormon-dependente grupului Luminal, cu prevalarea subtipului molecular tip Luminal B.</li> <li>În metastazare are loc schimb de subtip molecular cu achiziționarea markerilor receptorilor de tip luminal, tumorile activ proliferative fiind cele mai instabile.</li> <li>Majoritatea tumorilor prezintă gradul G2 și G3 de diferențiere histologică cu indice proliferativ diferit în raport de forma moleculară, metastaza limfonodală.</li> <li>Carcinomul de glandă mamară induce defecțiuni a mecanismelor apoptozei cu schimbarea fenotipului molecular al tumorii, pierzând parțial receptorii p53 cu Bcl2 înalt în ambianța limfonodală.</li> <li>În carcinomul de glandă mamară macrofagele prevalează în stroma intratumorală, iar mastocitele sunt localizate preponderent peritumoral, în care macrofagele CD68 sunt influențate de expresia HER 2 (corelație negativă semnificativă statistic), iar dinamica mastocitelor este influențată de expresia ER<math>\alpha</math> și PR în subtipurile luminale și ER<math>\beta</math> în subtipul</li> </ol>

macrofage și receptori hormonal, statutului HER2 în carcinomul de glandă mamară în raport de formele moleculare.	triplu-negativ, receptori hormonal constituind factori chemotactici pentru mastocite.
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------

## II. Relevanța rezultatelor științifice obținute (până la 200 de cuvinte)

În Republica Moldova, aprecierea markerului Her2/neu și receptorilor hormonal ER, PR, Ki67 se aplică pe scară redusă. Evidențierea subtipurilor moleculare nu a fost raportată. Tumorigeneza în formele moleculare a carcinomului mamar este diferită în funcție de mecanismele patogenetice implicate. Sunt cunoscute multiple căi moleculare care conduc la apariția aceluiași efect morbid, predilect asociat formelor moleculare cunoscute.

Diagnosticul carcinomului mamar are ca bază examenul histopatologic. Cele mai frecvent diagnosticate sunt tipurile histologice invaziv ductal (70-80%) și invaziv lobular (8-15%). Recent, utilizarea tehnologiilor genetice, ADN microarrays și a „semnăturii genetice” a permis o nouă clasificare a CM în funcție de status-ul receptorilor estrogenici (ER), progesteronici (PR), HER2/neu, Ki67 și distribuția pacienților în cel puțin 4 subtipuri moleculare cu implicații clinice majore: Luminal A (ER+, PR+, Her2/neu-); Luminal B (ER+ și/sau PR+, Her2/neu+ și/sau Ki67<sup>înalt</sup>); Her2/neu supraexprimat; Triplu negativ/basal like și 5-NP.

Astfel, studiul dat a scos o caracteristică descifrată a subtipurilor moleculare nu numai în tumora primară, ci și în metastazele limfonodale, mediul cărora induce o instabilitate a formei moleculare primare, impact semnificativ în aprecierea tacticii medicale ulterioare cu determinarea receptorilor cu cea mai mare rată de instabilitate pe parcursul metastazării și achiziționării markerilor receptorilor de tip luminal.

## III. Volumul total al finanțării

<i>Finanțarea planificată (mii lei)</i>	<i>Executată (mii lei)</i>
2015-2018 = 1179,0 mii lei	2015-2018 = 1178,9 mii lei
2019 = 274,8 mii lei	2019 = 274,8 mii lei

## IV. Volumul cofinanțării (mii lei)

2015-2018 = 320,4 mii lei
2019 = 96,6 mii lei

#### V. Lista colaborărilor inițiate în cadrul proiectului

Institutul Oncologic, Chișinău, Moldova; UMF „V. Babeș”, Timișoara, România; IMSP IMȘIC, Chișinău, Moldova.

#### VI. Lista evenimentelor organizate / la care s-a participat în cadrul proiectului

Conferința Științifică Internațională dedicată celor 70 de ani de la fondarea USMF “Nicolae Testemițanu”, Chișinău, 2015; II Scientific Conference „Fundamental and clinical medicine”, Kyiv, 2015; Al XIII-lea Simpozion Național de Morfologie Microscopică cu participare internațională, Craiova, 2015; Conferința științifică “Nicolae Anestiadi - nume etern al chirurgiei basarabene”, Chișinău, 2016; Culegeri de articole științifice consacrată aniversării a 90-a de la nașterea ilustrului medic și savant Nicolae Testemițanu. Chișinău, 2017; Zilele Universității de Stat de Medicină și Farmacie Nicolae Testemițanu, Chișinău, 2019.

#### VII. Lista mobilităților efectuate în cadrul proiectului

#### VIII. Informații despre infrastructura utilizată în realizarea proiectului

Sustenabilitatea proiectului este asigurată de laboratorului Morfologie, ce dispune de 49,2 m<sup>2</sup> de spațiu, inclusiv 2 încăperi dotate cu utilaj neperformant, destinat pentru îndeplinirea cercetărilor, reagenți chimici, anticorpi primari, secundari, sisteme de lucru la comandă. Pentru atingerea obiectivelor stabilite sa recurs la următoarele metode de cercetare:

- ✓ histologice (hematoxilină-eozină)
- ✓ imunohistochimice (tehnica manuală și tehnica automatizată).
- ✓ analiza statistică a datelor obținute (SPSS 13.0)

Metodele histologice și imunohistochimice efectuate în conformitate cu prevederile protocoalelor tehnice convenționale, pentru fiecare metodă în parte. În cazul investigațiilor imunohistochimice ne asumăm dreptul de a adapta protocoalele de lucru al fiecărui anticorp, utilizat în cercetare, la condițiile laboratorului. Analiza statistică a datelor sa efectuat în conformitate cu cerințele tehnice ale soft-ului SPSS 13.0.



IX. Dificultăți/impedimente apărute pe parcursul realizării proiectului

Riscul major al neîndeplinirii unor componente ale proiectului a fost asigurarea incompletă și întârziată a laboratorului cu întregul spectru de anticorpi solicitați, cu utilaj de cercetare din cadrul de fonduri fixe în lipsa lecitațiilor la începutul derulării proiectului. Livrarea de anticorpi primari care nu corespund întocmai cu specificările indicate de către solicitant (specificări imune, clonă, cod, izotop, termen de valabilitate). Prezența unui preț exagerat la procurarea anticorpilor și metodelor de vizualizare. Costul exagerat al cercetărilor care nu corespunde cu bugetul de finanțare. Lipsa unui utilaj performant de cercetare.

XII. Beneficiarul (ministere, instituții de stat sau private, întreprinderi, etc.)

X. Aplicare teoretico-didactică - Rezultatele pot servi drept material didactic de formare continuă în cadrul cursurilor de instruire postgraduală a medicilor-rezidenți și a medicilor specialiști din domeniul oncologiei clinice și morfopatologiei.

I. Aplicare clinică - Rolul predictiv al factorilor moleculari contribuabili metastazării pot fi utilizate în practica clinică cu scopul de a stabili precoce, în timp util, potențialul invaziv al tumorii aflată încă în stadiul localizat de evoluție.

III. Aplicare experimentală – rezultatele obținute în acest proiect ar servi drept bază pentru continuarea ulterioară a cercetărilor pe modele experimentale cu utilizarea de linii de animale pure, animale transgenice, linii celulare tumorale, embrioni de găină.

Director proiectului

\_\_\_\_\_

(nume, prenume, grad, titlu științific)

\_\_\_\_\_

(semnătura)

Șef

Laboratorul de morfologie

\_\_\_\_\_

(nume, prenume, grad, titlu științific)

\_\_\_\_\_

(semnătura)