

**MINISTERUL SĂNĂTĂȚII, MUNCII ȘI PROTECȚIEI SOCIALE AL  
REPUBLICII MOLDOVA  
IP UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
„NICOLAE TESTEMIȚANU”**

Cu titlu de manuscris  
C.Z.U: 618.19-006.6-033.2(043.2)

**FULGA VEACESLAV**

**PROFILUL MOLECULAR AL CARCINOAMELOR  
MAMARE INVAZIVE VERSUS METASTAZELE  
LIMFONODALE CORESPONDENTE**

**311.02 – ANATOMIE PATOLOGICĂ**

Autoreferatul tezei de doctor habilitat în științe medicale

**CHIȘINĂU, 2018**

Teza a fost elaborată la Catedra de histologie, citologie și embriologie a Instituției Publice Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova.

**Consultanți științifici:**

**Raica Marius** – dr., prof. univ., UMF „Victor Babeș”, Timișoara, România

**Șaptefrați Lilian** – dr. hab. șt. med., conf. univ.

**Referenți oficiali:**

**Căruntu Irina-Draga** – dr., prof. univ., UMF „Grigore T. Popa”, Iași, România

**Haidarlî Ion** – dr. hab. șt. med., prof. cerc.

**Zota Eremei** – dr. hab. șt. med., prof. univ., membru corespondent al AȘM

**Consiliului Științific Specializat a fost aprobat de către Consiliul de Conducere al ANACEC prin decizia nr.11 din 23.11.2018, în următoarea componență:**

Catereniuc Ilia, președinte, dr. hab. șt. med., prof. univ.

Melnic Eugen, secretar, dr. hab. șt. med., conf. univ.

Baciu Gheorghe, membru, dr. hab. șt. med., prof. univ.

Rîvneac Victor, membru, dr. hab. șt. med., prof. univ.

Sofroni Larisa, membru, dr. hab. med., prof. cerc.

Tagadiuc Olga, membru, dr. hab. șt. med., conf. univ.

Rojnoveanu Gheorghe, membru, dr. hab. șt. med., prof. univ.

Nacu Viorel, membru, dr. hab. șt. med., conf. univ.

Vișnevschi Anatolie, membru, dr. hab. șt. med., conf. univ.

Susținerea tezei va avea loc la 18 ianuarie 2019, ora 14<sup>00</sup> în ședința Consiliului științific specializat DH 311.02-03 din cadrul IP Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova (Bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, Chișinău, MD-2004).

Teza de doctor habilitat și autoreferatul pot fi consultate la biblioteca IP Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova (Bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, Chișinău, MD-2004) și pe pagina web a CNAA/ANACEC [www.cnaa.md](http://www.cnaa.md). Autoreferatul a fost expediat la 15.12.2018.

**Secretar științific al Consiliului științific specializat:**

dr. hab. șt. med., conf. univ.

\_\_\_\_\_ **Melnic Eugen**

**Consultanți științifici:**

dr., prof. univ.

\_\_\_\_\_ **Raica Marius**

dr. hab. șt. med., conf. univ.

\_\_\_\_\_ **Șaptefrați Lilian**

**Autor:**

\_\_\_\_\_ **Fulga Veaceslav**

## REPERELE CONCEPTUALE ALE LUCRĂRII

**Actualitatea temei.** Cancerul de sân este o problemă de importanță majoră în sănătatea publică mondială. Tratamentul clasic al carcinomului mamar, bazat mai mult pe statistică, în care aspectul histologic clasic al tumorii are doar o valoare pronostică, servește drept imbold pentru studiul complex al unei serii vaste de markeri celulari. Carcinomul mamar este o entitate nozologică eterogenă, caracterizată prin aberații genetice și mecanisme intra/extracelulare specifice, grupate în subtipuri moleculare intrinseci, imunohistochimic identificabile [1]. Datele din literatura de specialitate sunt contradictorii, datorită eterogenității histologice și genetice a carcinomului mamar, a originii celulare variate, a structurii moleculare a subtipurilor, care nu întocmai corespunde rezultatelor imunohistochimice. În pofida multiplelor studii, cât și rezultatelor chimioterapiei de durată, circa 30% dintre pacienții diagnosticați cu forme precoce de carcinom mamar dezvoltă recurențe în evoluția bolii, cota majoră revenind cazurilor cu metastaze limfonodale dezvoltate. Microambianța are o influență substanțială în dezvoltarea tumorii. Marea majoritate a datelor indică rolul stimulator, pro-tumoral al celulelor stromale. Este bine studiată influența celulelor stromale asupra tumorii primare și practic absentează surse ce ar evidenția rolul ambianței limfonodale în evoluția metastazelor. Rezultatele privitor la stabilitatea moleculară a tumorii în procesul de metastazare sunt controversate [2, 3]. Nu sunt date exhaustive referitor la evoluția subtipului molecular al metastazei comparativ cu tumoarea primară. Existența schimbului de profil molecular la metastazare are o valoare pronostică și predictivă majoră.

**Situația în domeniu și identificarea problemelor de cercetare.** Datele literaturii referitor la influența mediului ambiant asupra celulelor metastazate sunt puține și controversate. Unele studii aduc argumente certe în favoarea co-existenței diferitor celule canceroase cu proprii caractere genetice și epigenetice, altele pledează pentru omogenitatea tumorilor primare. Aceste date conturează ideea și necesitatea studiului comparativ al profilului molecular al metastazei, presupunând diferențe fascinante pentru morfologi, periculoase pentru pacienți [4]. În susținerea ideii de a cerceta comparativ tumoarea primară și metastazele limfonodale (LNM) sunt și studiile de profil care sugerează, că microambianța tumorală are un rol important în comportamentul neoplasmului. Celulele canceroase și stromale interacționează reciproc, deseori în sinergism, prin crearea unui mediu favorabil pentru proliferare și angiogeneză. Acești factori în totalitate sporesc invazia vasculară și pot avea un impact direct asupra prognosticului. În plus, stroma din LNM este una total diferită de cea din glanda mamară, unde populația „băștinașă”, limfocitele pot influența, imprevizibil deocamdată asupra metastazei. Drept exemplu servesc datele controversate despre limfocitele intratumorale. Având funcție de apărare, studiile de specialitate relevă o influență contrar opusă, de stimulare a progresiei tumorale [5, 6]. Contrar acestor date numărul crescut de T limfocite CD8<sup>+</sup> este asociat unui prognostic favorabil în cazul tumorilor ER negative, iar combinația limfocit CD8<sup>+</sup>- tumoare ER<sup>+</sup> este în defavoarea pacientei. Totodată, prezența în tumoare a infiltratului T citotoxic este considerat drept un factor predictiv pozitiv pentru chimioterapie [7].

Astfel, microambianța are o influență semnificativă în dezvoltarea tumorii. Marea majoritate a datelor literaturii indică rolul stimulator, pro-tumoral a celulelor stromale. Este bine studiată influența celulelor stromale asupra tumorii primare și practic absentează surse ce ar evidenția rolul ambianței limfonodale în evoluția tumorii. Mai mult și rezultatele privind stabilitatea moleculară a tumorii în procesul de metastazare sunt controversate. Nu sunt date exhaustive privind evoluția subtipului molecular al metastazei comparativ cu tumoarea primară. Existența transferului de profil molecular ar avea un impact prognostic și predictiv.

**Scopul lucrării:** Studiul profilului molecular al carcinoamelor mamare invazive de tip ductal și lobular comparativ cu metastazele limfonodale axilare ipsilaterale și evaluarea stabilității subtipului molecular în procesul de metastazare.

**Obiectivele lucrării:**

- Determinarea fenotipului molecular al tumorii în funcție de tipul și gradul histologic, statusul limfonodal.
- Evaluarea dinamicii receptorilor hormoni pentru estrogeni (ER), progesteron (PR), androgeni (AR) și a markerilor HER2 (factorul uman de creștere epidermală 2), Ki67 (marker al proliferării) în procesul de metastazare.
- Determinarea expresiei E-cadherinei la evoluția metastazelor în funcție de tipul histologic și molecular al tumorii.
- Identificarea stabilității markerilor CK5 (citokeratina bazală) și EGFR (factorul de creștere epidermală 1) la metastazare.
- Evidențierea expresiei markerilor pro- (p53) și anti-apoptotic (BCL2) în evoluția metastatică a carcinomului mamar.
- Evaluarea stabilității subtipurilor moleculare în microambianța limfonodală.

**Metodologia cercetării științifice.** Rata înaltă a incidenței și mortalității plasează cancerul de sân în topul afecțiunilor maligne. O explicație plauzibilă este absența la moment a unei descrieri detaliate privind eterogenitatea celulară a carcinomului mamar, care ar reflecta simultan profilul molecular și componența celulară. În plus, la momentul definirii scopului și obiectivelor acestui studiu nu existau date exhaustive, concludente referitor la influența microambianței limfonodale asupra profilului molecular al metastazelor de carcinom mamar. În calitate de ipoteză că metastazele ar putea fi diferite de tumoarea primară au servit evidențele clinico-patologice, care au semnalat caracterul agresiv al carcinoamelor cu infiltrat limfocitar.

Lucrarea a fost realizată la Catedra de histologie, citologie și embriologie, având în calitate de consultanți științifici: Șaptefrați Lilian, dr. hab. șt. med., conferențiar universitar (specialitatea 311.02 – Anatomie patologică) și Raica Marius, dr., profesor universitar (UMF „Victor Babeș”, Timișoara, România).

Pentru a realiza obiectivele propuse au fost supuse studiului histologic și imunohistochimic 161 carcinoame mamare invazive ductale (n=143) și lobulare (n=18) comparativ cu metastazele dezvoltate în noduri limfatici axilari, ipsilaterali. Pentru standardizarea metodelor, precum și evidențierea expresiei markerilor utilizați am folosit 18 cazuri de glanda mamară neafectată. Pentru confirmarea instabilității profilului molecular am suplinit lucrarea cu partea experimentală, care a constatat în implantarea

tumorilor pe membrana corioalantoidă a ouălor de găină embrionate. Studiul a inclus și o amplă analiză statistică.

**Noutatea și originalitatea științifică a rezultatelor obținute.** Problema științifică soluționată în teză constă în argumentarea științifică a gradului de stabilitate al profilului molecular al carcinomului mamar pe parcursul metastazării, ceea ce a condus la clarificarea tacticii de diagnostic, în vederea aplicării unui tratament personalizat. Pentru prima dată am demonstrat că receptorii hormonal pentru ER, PR și AR nu sunt stabili pe parcursul metastazării, cu precizarea că receptorul pentru PR are o rată net superioară a instabilității față de ER, fapt ce poate explica rezistența și recurențele în terapia hormonală. A fost demonstrat că receptorul HER2 nu este stabil pe parcursul metastazării în ambele tipuri de cancer studiate, preponderent fiind înregistrată pierderea acestuia după metastazare, astfel diminuând eficiența terapiei anti-HER2 în boala metastatică. Am demonstrat pentru prima dată că, citokeratina bazală CK5 este instabilă la metastazare, iar tipurile de transfer depind de tipul histologic al tumorii, fapt ce permite de a reevalua criteriile de diagnostic și tratament. Am determinat că markerul EGFR nu este constant expresat de celulele tumorale, iar cazurile de transfer implică exclusiv pierderea acestui receptor în microambianța nodului limfatic. Am constatat că activitatea proliferativă a celulelor tumorale nu este stabilă, iar transferurile de scor a Ki67 sunt în funcție de tipul histologic al tumorii: carcinomul de tip NOS la metastazare își diminuează activitatea mitotică, iar tumorile lobulare intensifică gradul de proliferare. Am stabilit că carcinoamele mamare de tip NOS și lobular sunt preponderent tumori p53 pozitive. Acest marker nu este stabil pe parcursul metastazării, iar transferurile de scor p53 mai frecvent înregistrate țin de pierderea expresiei p53 în ambianța limfonodală, indiferent de tipul histologic al tumorii. Am dovedit că markerul anti-apoptotic BCL2 nu este stabil pe parcursul metastazării, predominând cazurile de pierdere a acestuia în ambianța limfonodală. Cazurile de transfer au implicat numai tumori cu grad scăzut și moderat de diferențiere, afectând în special femeii de „după 49” ani. Am demonstrat că expresia E-cadherinei din metastază diferă de valorile acesteia din tumoarea primară, iar transferurile de scor pot evolua cu achiziție sau pierdere a acestui marker în sediul limfonodal. Am stabilit că metastaza limfonodală are un fenotip imunohistochimic particular, diferit de tumoarea primară, ceea ce creează premise pentru reevaluarea tratamentului. Am constatat că subtipurile moleculare nu sunt stabile la metastazarea tumorii, existând divergențe cauzate de tipul histologic al carcinomului. Tumorile Luminal A dezvoltate de carcinomul lobular spre deosebire de cel ductal sunt p53 pozitive. Subtipul HER2 nu este stabil pe parcursul metastazării tumorilor NOS, transferurile de subtip evaluând doar cu achiziționarea de receptori luminali, iar în cazul carcinomului lobular degradează în Basal-like. Subtipul Luminal B dezvoltat de carcinomul lobular invaziv spre deosebire de cel ductal nu expresează E-cadherina. Pentru prima dată am demonstrat experimental instabilitatea profilului molecular al tumorilor după implantare pe membrana corioalantoidă, evidențiind evoluția diferită a markerilor: ER și HER2 preponderent cu pierdere, PR stabil pozitiv, CK5 stabil negativ. Această eterogenitate a celulelor tumorale, ne-a permis să susținem necesitatea continuării studiilor în acest domeniu, în vederea stabilirii de noi subtipuri moleculare.

**Rezultatele principal noi pentru știință și practică.** Profilul molecular al carcinoamelor mamare nu este stabil pe parcursul metastazării. Expresia ER, PR, AR, HER2, CK5, EGFR, Ki67, p53, BCL2, E-cadherinei și subtipurile moleculare ale metastazelor limfonodale diferă de tumoarea primară, iar transferurile pot evolua atât cu pierdere, cât și cu achiziție de scor.

**Importanța teoretică și aplicativă a lucrării.** Rezultatele acestui studiu certifică necesitatea examenului imunohistochimic paralel, tumoarea primară – metastaza în vederea stabilirii unui diagnostic și tratament personalizat.

**Rezultatele științifice principale înaintate spre susținere.** Carcinoamele incluse în studiu în majoritatea cazurilor sunt hormon-pozitive. Receptorii hormonali nu sunt stabili pe parcursul metastazării, iar receptorul pentru PR demonstrează o rată net superioară a instabilității față de ER și AR. Transferurile de scor au loc doar la cazurile cu grad G2 și G3 de diferențiere.

1. Receptorul HER2 nu este stabil pe parcursul metastazării în ambele tipuri de cancer studiate, preponderent fiind înregistrată pierderea acestuia după metastazare în nodul limfatic.

2. Citokeratina bazală CK5 este instabilă pe parcursul metastazării carcinomului ductal invaziv tip NOS, aceasta manifestându-se atât în direcția achiziționării, cât și pierderii expresiei, ultimul tip de transfer constituind majoritatea. În cazul carcinomului lobular invaziv se determină doar achiziționarea de către celulele tumorale a CK5 după metastazare.

3. Carcinomul ductal invaziv tip NOS poate fi în egală măsură EGFR pozitiv sau negativ. În cazul carcinomului lobular invaziv majoritatea o constituie tumorile EGFR negative, atât la nivel primar, cât și metastatic. 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. Tumorile cu grad înalt de diferențiere (G1) prezintă în exclusivitate patern EGFR negativ.

4. Carcinomul ductal invaziv de tip NOS prezintă în majoritatea cazurilor activitate proliferativă marcată, iar majoritatea transferurilor țin de diminuarea activității proliferative a celulelor metastatice în microambianța limfonodală. În cazul carcinomului lobular invaziv se atestă transfer de scor doar în direcția intensificării proliferației tumorale în sediul metastatic.

5. În carcinoamele mamare ductal invaziv de tip NOS și lobular infiltrativ se atestă o prevalență a cazurilor p53 pozitive. Acest marker nu este stabil pe parcursul metastazării, evoluând fie cu pierdere sau achiziționare de fenotip p53. Transferurile de scor p53 mai frecvent înregistrate țin de pierderea expresiei p53 în ambianța limfonodală, indiferent de tipul histologic al tumorii.

6. Tumorile primare examinate, de tip ductal invaziv și lobular infiltrativ sunt preponderent BCL2 pozitive, au grad scăzut de diferențiere și afectează mai frecvent femeii din categoria de vârstă de „după 49” ani. BCL2 nu este stabil pe parcursul metastazării, predominând cazurile de pierdere a acestuia în ambianța limfonodală. Cazurile de transfer implică numai tumori cu grad scăzut și moderat de diferențiere, afectând în special femeii de „după 49” ani.

7. Expresia E-cadherinei este în funcție de tipul histologic al tumorii, ductal sau lobular invaziv. Carcinomul ductal invaziv de tip NOS prezintă în majoritatea cazurilor markerul de aderență intercelulară E-cadherina, iar pe parcursul metastazării evoluează preponderent cu pierderea acestui marker în sediul limfonodal. În cazul carcinomului lobular invaziv se atestă o ușoară prevalență a cazurilor E-cadherin negative, iar la metastazare prezintă în măsură egală transferuri de scor cu achiziție sau pierdere de fenotip caracteristic acestui marker.

8. Relațiile statistice dintre markerii celulari incluși în studiu, de localizare primară și metastatică nu sunt identice. Aceasta indică că metastaza limfonodală are un fenotip imunohistochimic particular.

9. Subtipurile moleculare sunt instabile pe parcursul metastazării, iar evoluția fiecărui subtip trebuie personalizată pentru fiecare caz aparte.

**Implementarea rezultatelor științifice.** Datele obținute redefinesc rolul mediului microambiant în cadrul progresiei tumorale. Această lucrare servește drept imbold pentru disciplinele medico-biologice de a investiga stabilitatea profilului molecular în procesul de metastazare și al altor tipuri de neoplazii. Rezultatele acestui studiu au valoare științifică și aplicativă pentru activitatea catedrelor și laboratoarelor de histologie, anatomie patologică și oncologie.

**Aprobarea rezultatelor.** Rezultatele obținute în urma investigațiilor efectuate și concepțiile de bază ale tezei au fost prezentate, comunicate și discutate în cadrul următoarelor reuniuni științifice:

- ✓ Conferințele științifice anuale ale colaboratorilor IP USMF „Nicolae Testemițanu” (Chișinău, Republica Moldova, 2013-2017);
- ✓ The ninth international conference of anticancer research (Sithonia, Grecia, 2014);
- ✓ Conferința științifico-practică a medicilor anatomo-patologi „Probleme actuale în patologie” (Chișinău, Republica Moldova, 2014);
- ✓ Al XIII-lea Simpozion Național de Morfologie Microscopică cu participare internațională (Craiova, România, 2015);
- ✓ II Scientific Conference „Fundamental and clinical medicine” (Kyiv, Ucraina, 2015);
- ✓ Euroregional Conference for PhD Students and Young Researchers in Biomedicine (Timișoara, România, 2015);
- ✓ International Scientific Conference „Actual issues of morphology” (Chișinău, Republica Moldova, 2015);
- ✓ Al XV-lea simpozion Național de Morfologie Microscopică cu Participare internațională (Oradea-Băile Felix, România, 2017);
- ✓ On-Line conference „Biological markers in fundamental and applied biology. From theory to practice” Biological Markers in Fundamental and Clinical Medicine (Brno, Cehia, 2018).

Teza a fost discutată și aprobată la ședința Catedrei de histologie, citologie și embriologie (proces verbal nr.14 din 14.06.2018), la ședința Seminarului științific de profil extern „Anatomie patologică” – UMF „Victor Babeș”, Timișoara, România (proces verbal din 28.06.2018) și la ședința Seminarului științific de profil 311. Anatomie și morfologie; 351. Medicină interdisciplinară (proces verbal nr.1 din 06.09.2018).

**Publicațiile la tema tezei.** Rezultatele acestui studiu au fost publicate în 51 lucrări științifice, dintre care o monografie în calitate de monoautor și 4 articole în reviste cu factor de impact ISI, 3 – în reviste științifice din străinătate recunoscute, 12 – în reviste naționale de categoria B, 3 – în reviste naționale de categoria C.

**Volumul și structura tezei.** Teza este expusă în limba română cu titlu de manuscris și constă din: introducere, 5 capitole, sinteza rezultatelor obținute, concluzii, recomandări practice și bibliografie. Lucrarea este expusă pe 261 pagini, conține 70 tabele, 57 figuri, 11 anexe. Indicele bibliografic include 280 surse de referință.

În capitolul „Introducere” a fost redată actualitatea temei, s-au pus în evidență întrebările ce susțin importanța efectuării studiului în cauză.

Capitolul 1 a fost dedicat particularităților histologice și moleculare ale carcinoamelor mamare invazive de tip ductal și lobular, cu evidențierea rolului pronostic și predictiv incert al diagnosticului morfologic, subtipurilor moleculare existente, originii celulare a carcinomului mamar și influența microambianței asupra celulelor tumorale.

În capitolul 2 au fost descrise amănunțit materialul de studiu și metodologia cercetării, evidențiind metodele utilizate: histologică, imunohistochimică, statistică. De asemenea, a fost descrisă și partea experimentală, implantarea tumorilor pe membrana corioalantoidă.

Capitolul 3 a fost dedicat dinamicii markerilor imunohistochimici (ER, PR, AR, HER2, CK5, EGFR, E-cadherinei, Ki67, p53, BCL2) în normă și în funcție de tipul, gradul histologic al tumorii, statusul limfonodal și vârsta pacientelor. Capitolul a fost finalizat printr-o analiză comparativă amplă a expresiei receptorilor incluși în studiu, până și după metastazare.

În capitolul 4 au fost caracterizate subtipurile moleculare constituite în baza recomandărilor de la St Gallen, 2013. Au fost puse în evidență structura, eterogenitatea și stabilitatea subtipurilor în dependență de tipul, gradul histologic al tumorii, statusul limfonodal și vârsta pacientelor. Pentru certificarea instabilității profilului molecular, acest capitol a fost finalizat cu rezultatele studiului experimental „Stabilitatea profilului molecular al carcinomului mamar după implantare pe membrana corioalantoidă a oului embrionat”.

În sinteza rezultatelor obținute au fost confruntate rezultatele obținute din studiul curent cu datele existente în literatură. Au fost evidențiate și analizate aspectele anatomice, genetice, citologice, moleculare care ar sta la baza instabilității profilului molecular al carcinomului mamar.

**Cuvinte-cheie:** carcinom mamar, markeri hormonal, HER2, CK5, EGFR, p53, BCL2, E-cadherin, subtipuri moleculare, metastaze limfonodale



## CONȚINUTUL TEZEI

### 1. PARTICULARITĂȚILE HISTOLOGICE ȘI MOLECULARE ALE CARCINOAMELOR MAMARE INVAZIVE DE TIP DUCTAL ȘI LOBULAR

În cadrul acestui capitol am determinat, că cancerul de sân este o problemă de importanță majoră în sănătatea publică mondială. Tratamentul clasic al carcinomului mamar, bazat mai mult pe statistică, în care aspectul histologic clasic al tumorii are doar o valoare pronostică și nu una predictivă, servește drept imbold pentru studiul complex al unei serii vaste de markeri celulari. Datele din literatură sunt contradictorii, datorită eterogenității histologice și genetice a carcinomului mamar, a originii celulare variate, a structurii moleculare a subtipurilor care nu întocmai corespunde rezultatelor imunohistochimice. Un alt factor este și numărului mic de markeri aprobați pentru diagnostic. Deși unele scheme de tratament au fost publicate drept eficiente, nu există încă potențial teoretico-practic suficient pentru realizarea terapiei individualizate. În pofida multiplelor studii, cât și rezultatelor chimioterapiei de durată, circa 30% din pacienți diagnosticați cu forme precoce de carcinom mamar dezvoltă recurențe în evoluția bolii, cota majoră revenind cazurilor cu metastaze limfonodale dezvoltate. Rezistența la tratament este multifactorială, deseori imprevizibilă, cel mai probabil datorat multiplelor subtipuri de carcinom mamar. Rezultatele privitor la stabilitatea moleculară a tumorii în procesul de metastazare sunt controversate [2, 3]. Nu sunt date exhaustive referitor la evoluția subtipului molecular al metastazei comparativ cu tumoarea primară. Existența schimbului de profil molecular la metastazare are o valoare pronostică și predictivă majoră. În plus, microambianța are o influență substanțială în dezvoltarea tumorii. Marea majoritate a datelor indică rolul stimulator, pro-tumoral al celulelor stromale. Este bine studiată influența celulelor stromale asupra tumorii primare și practic absentează surse ce ar evidenția rolul ambianței limfonodale în evoluția metastazelor.

### 2. MATERIAL ȘI METODE DE CERCETARE

Materialul biologic supus studiului a inclus tumoarea primară și metastazele limfonodale axilare de carcinom mamar invaziv ductal (n=143) și lobular (n=18) de la 161 paciente cu vârsta între 33-86 ani, fără chimio- și/sau radioterapie premergătoare. Control a servit materialul tisular (glandă mamară și noduri limfatici axilari) recoltat de la 18 femei decedate accidental. Studiul în cauză este unul morfologic, retrospectiv, descriptiv bazat pe o metodă histologică (HE) și 11 metode imunohistochimice (markeri pentru ER, PR, AR, Ki67, HER2, EGFR, CK5, E-cadherină, p53, BCL2, AE1/AE3). Rezultatele studiului descriptiv au fost verificate prin implantare de tumori mamare pe membrana corioalantoidă a oului de găină embrionat, fortificate prin evaluări imunohistochimice a receptorilor pentru ER, PR, HER2, CK5 și Ki67 (Fig.2.1). Expresiile markerilor au fost cuantificate în baza recomandărilor OMS (2003), a Societății Americane a Oncologilor Cliniciști (2013) și Asociației Americane pentru Cercetarea Cancerului (2013). S-au utilizat metodele de cuantificare și scorificare propuse de Allred și coaut. (1998), Suciș și coaut. (2014), Qureshi și coaut. (2006), Callagy și coaut. (2006), Yamashita și coaut. (2004), Azoulay și coaut. (2005) și ghidul

Dako pentru EGFR ([http://www.dako.com/08052\\_egfr\\_pharmdx\\_interpretation\\_manual.pdf](http://www.dako.com/08052_egfr_pharmdx_interpretation_manual.pdf)) [8-15]. Materialul a fost sistematizat în baza de date MS Access 2007 și analizat statistic cu WinStat 2012.1, ceea ce a permis realizarea obiectivelor propuse.

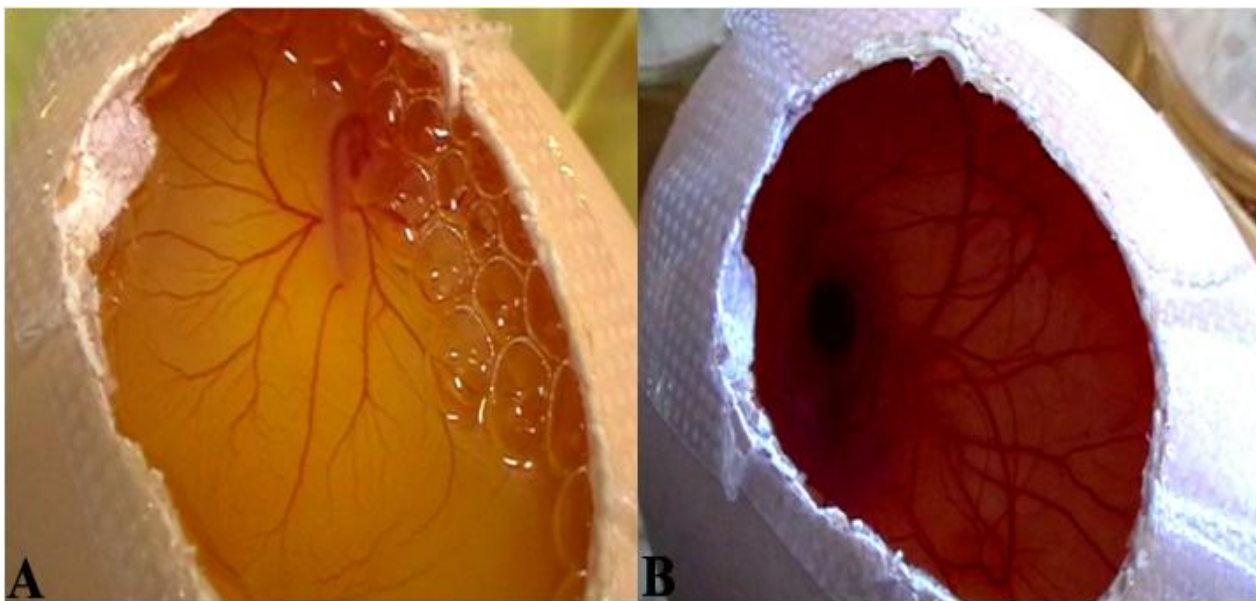


Fig.2.1. **A** – embrion de găină în ziua a 4-a de incubare; **B** – embrion de găină în ziua a 10-a de incubare.

### **3. DINAMICA MARKERILOR IMUNOHISTOCHIMICI ÎN NORMĂ ȘI ÎN FUNCȚIE DE TIPUL, GRADUL HISTOLOGIC AL TUMORII, STATUSUL LIMFONODAL ȘI VÂRSTA PACIENTELOR**

#### **3.1. Expresia markerilor utilizați în studiu în glanda mamară neafectată.**

Receptorii pentru steroizi (estrogeni, progesteron și androgeni) au fost exprasați preponderent de epitelocitele luminale, sub formă de grupuri celulare solitare hormon- pozitive de până la 10 celule, precum și în fâșii continue cu populații de peste 10 celule imunomarcate (Fig.3.1). Paternul solitar a fost mai frecvent determinat în cazul markerilor pentru PR și AR, iar pentru ER caracteristic iau fost prezentările în grup și fâșii. Expresia a doi markeri, receptorul membranar HER2 și proteina nucleară p53 nu s-a manifestat în toate cazurile studiate, indiferent de nivelul de diferențiere a epiteliului mamar [1].

Prezența EGFR sau HER1 a fost depistată la diferite nivele de diferențiere a epiteliului mamar, totuși cu predilecție și intensitate sporită atestată la nivel bazal (Fig.3.2).

Citokeratina CK5 cu predilecție a fost expresată de celulele bazale. Totuși prezența acesteia s-a determinat și în celulele luminale în toate cazurile examinate (Fig.3.3).

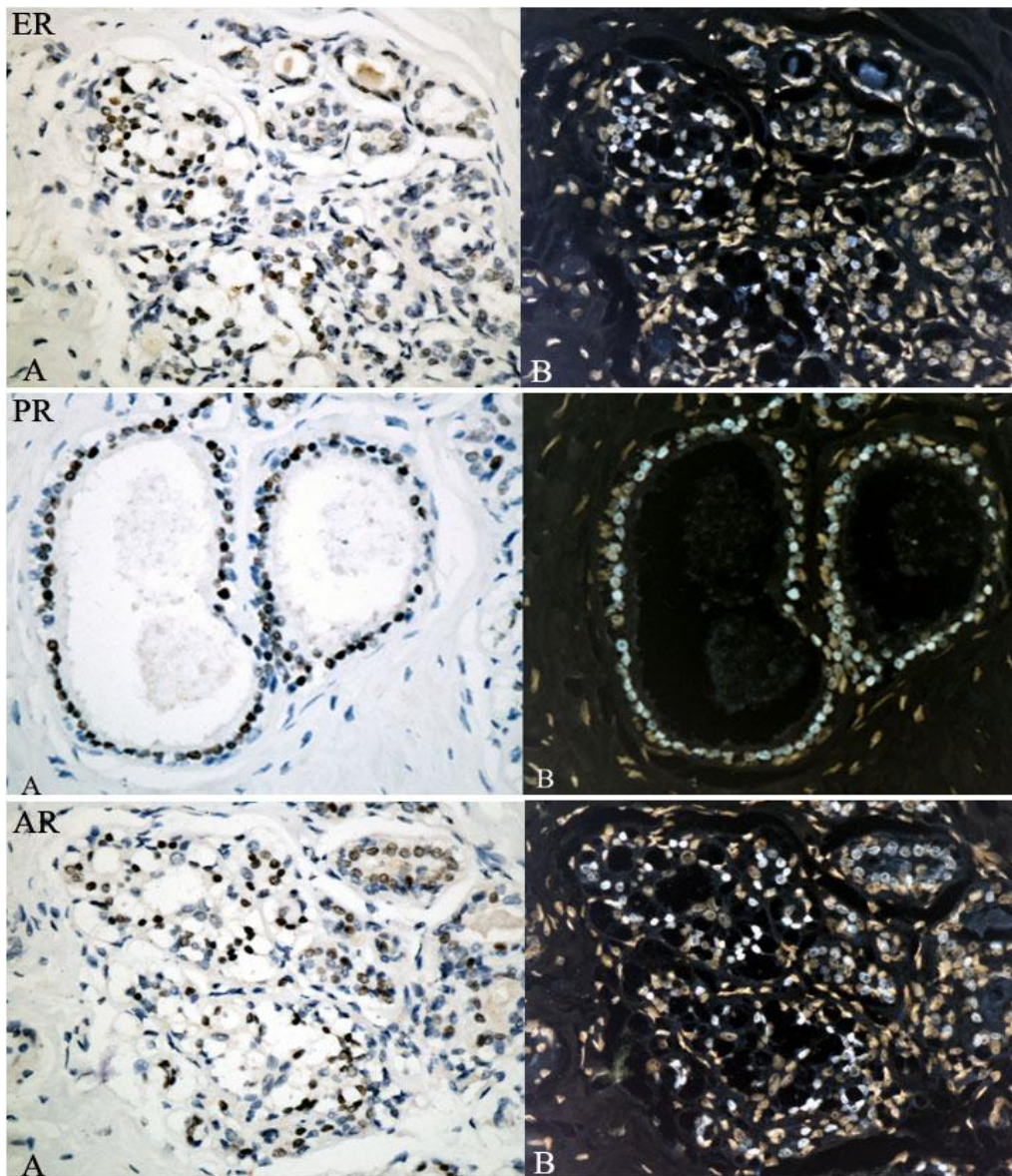


Fig.3.1. Expresia receptorilor pentru ER, PR, AR în TDLU și ducturile interlobulare în glanda mamară sănătoasă a femeii de 62 ani. Secțiune contracolorată cu hematoxilină *Lille* (A), suplimentată cu imaginea corespondentă inversată (B), x40.

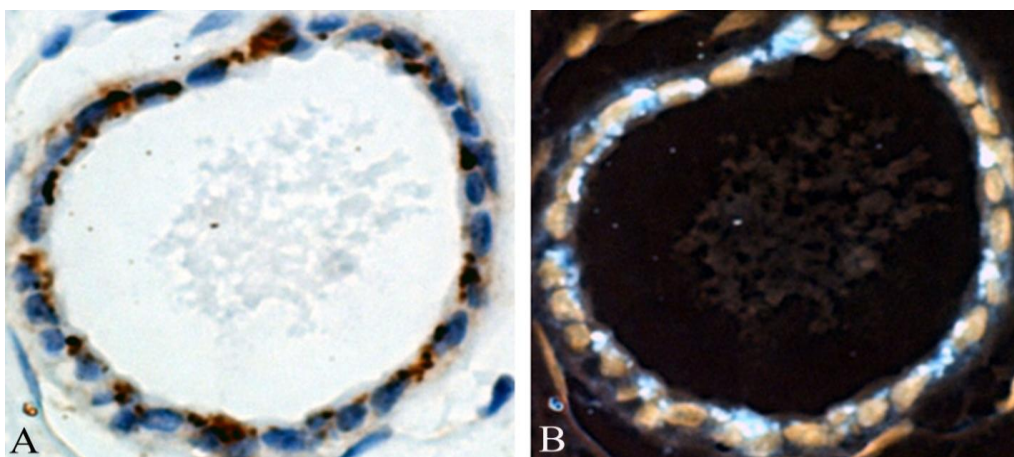


Fig.3.2. Expresia EGFR într-un duct lobular, la femeie de 66 ani. Secțiune contracolorată cu hematoxilină *Lille* (A), suplimentată cu imaginea corespondentă inversată (B), x100.



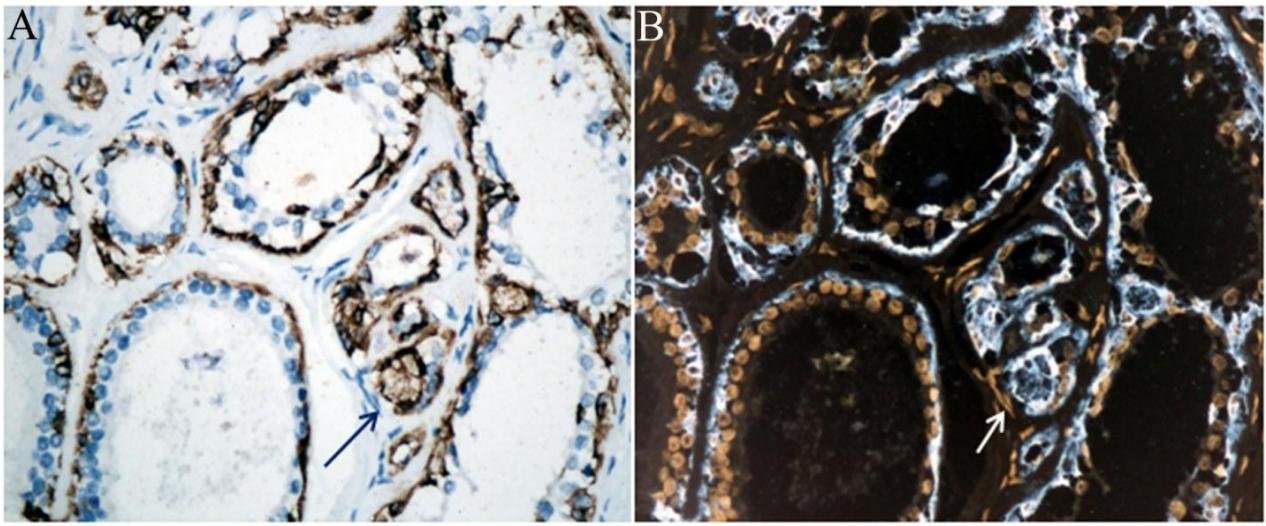


Fig.3.3. Expresia citokeratinei bazale CK5 în ducturi și TDLU (marcat cu săgeată). Secțiune realizată pe glandă mamară sănătoasă la femeie de 62 ani, contracolorată cu hematoxilină *Lille* (A), suplimentată cu imaginea corespondentă inversată (B), x40.

Proteina Ki67 a definit epitelocitele glandei mamare neafectate drept rar proliferante. Expresia acestui marker s-a determinat sub formă de celule rare, solitare la nivel de duct sau TDLU, aleatoriu cu sediu bazal sau luminal. În studiul dat expresia BCL2 s-a manifestat sub formă de grupuri sporadice sau fâșii continue, cu predilecție de sediu luminal. Celulele mioepiteliale nu au prezentat acest marker. Unicele celule stromale BCL2 pozitive au fost apreciate morfologic drept limfocite (Fig.3.4).

E-cadherina a fost determinată din abundență în epitelocitele luminal, deși pe alocuri s-au pus în evidență și celule bazale/mioepiteliale solitare (Fig. 3.5).

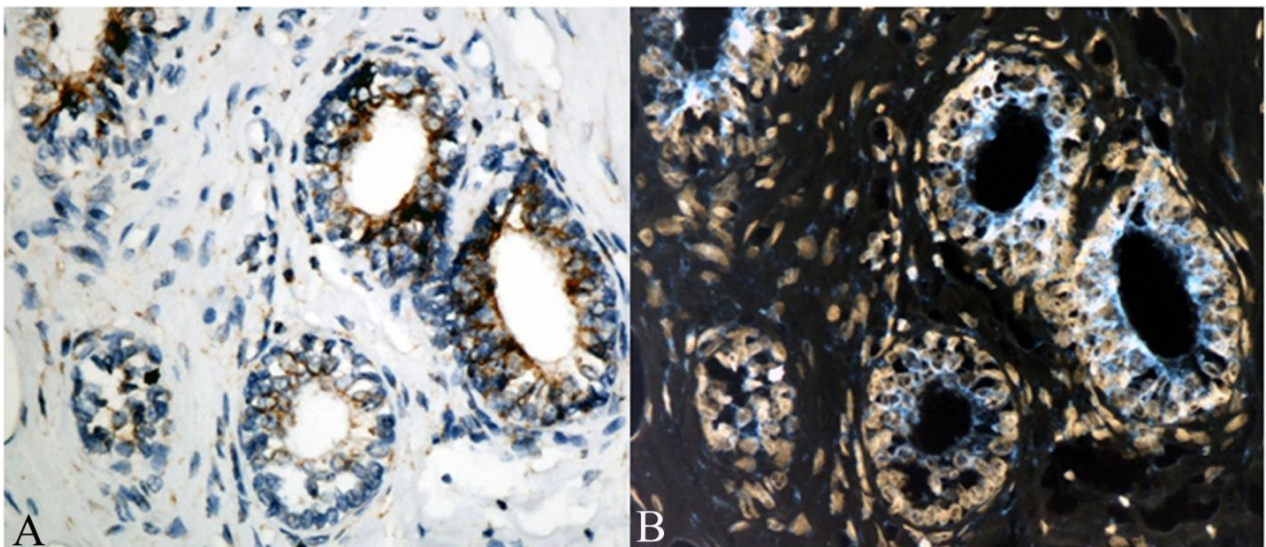


Fig.3.4. Expresia BCL2 în porțiunea terminală a glandei mamare la femeie de 60 ani. Secțiune contracolorată cu hematoxilină *Lille* (A), suplimentată cu imaginea corespondentă inversată (B), x40.



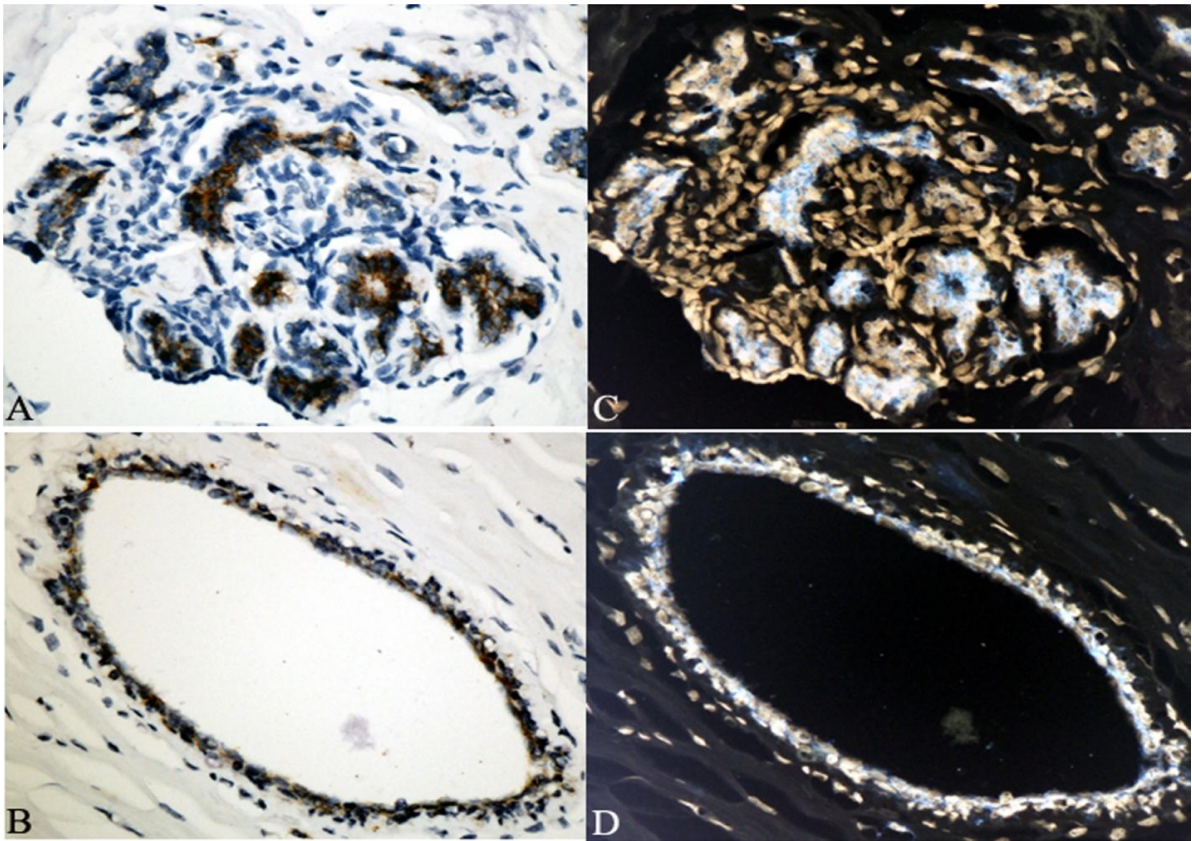


Fig.3.5. Expresia E-cadherinei la nivel de TDLU (A, C) și duct galactofor (B, D) în glanda mamară neafectată a femeii de 29 ani. Secțiuni contracolorate cu hematoxilină *Lille* (A, B), suplimentate cu imaginile corespondente inversate (C, D), x40.

### 3.2. Dinamica receptorilor pentru ER și PR

#### *Carcinomul ductal invaziv de tip NOS. Expresia ER și PR în tumoarea primară.*

Microscopic aceste tumori au fost prezentate prin structuri cu caracteristici maligne, de origine epitelială, dispuse sub formă de cordoane, plaje sincițiale, fie prezentând un caracter difuz infiltrativ (Fig.3.6).

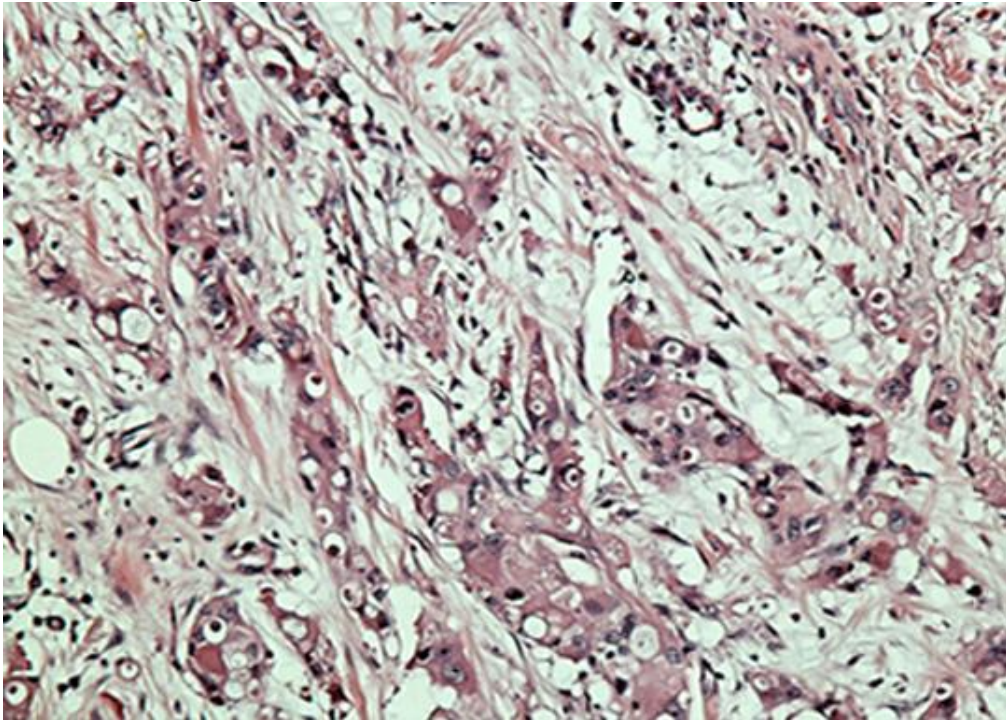


Fig.3.6. Carcinom ductal invaziv de tip NST, G3 prelevat de la o pacientă de 66 ani: aspect morfologic sub formă de cordoane și plaje sincițiale. HE, x200



Tabloul histologic a variat în funcție de proliferarea componentei epiteliale și infiltrarea componentei stromale. Aspectul invaziv a fost apreciat prin absența membranei bazale și celulelor mioepiteliale (Fig.3.7).

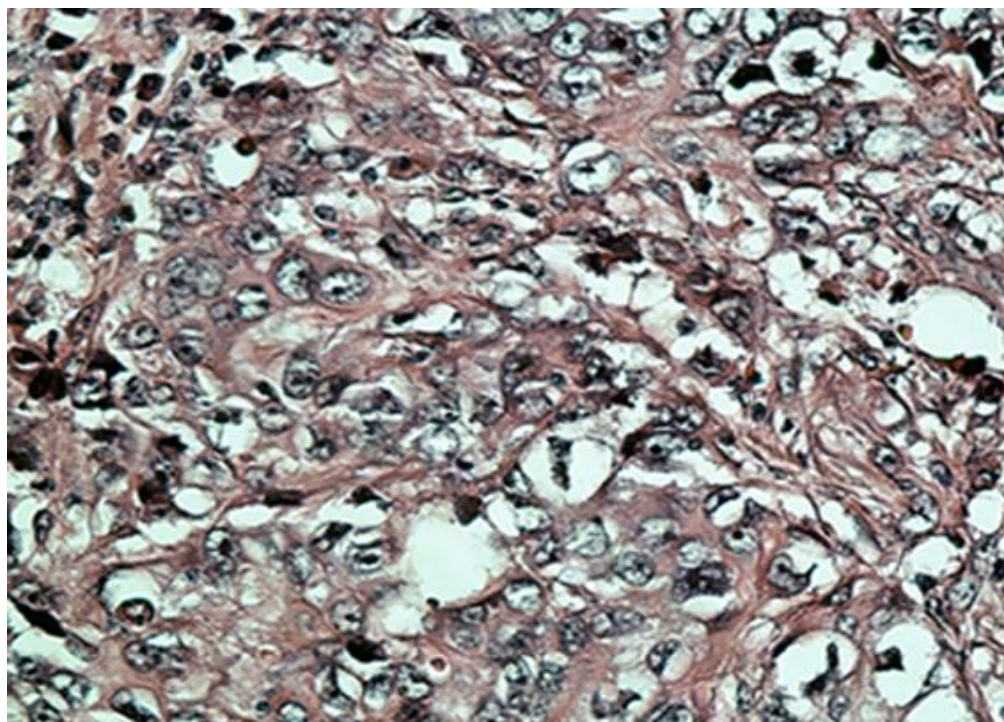


Fig.3.7. Carcinom ductal invaziv de tip NST, G3 prelevat de la o pacientă de 71 ani. De notat caracterul difuz de creștere, cu infiltrația stromei adiacente, lipsa celulelor mioepiteliale și membranei bazale, absența structurii clasice ductal-lobulare. HE, x400

Caracterul celulelor tumorale a fost dependent de caz, prezentând variații de activitate mitotică, cu pleomorfism nuclear și celular atenuat sau marcat. Cazurile de carcinom mixt (ductal – lobular), pleomorf și cu particularități melanotice nu au fost luate în calcul. În raport cu gradul de diferențiere, 6 cazuri/4,2% (din 143) au fost cuantificate cu scor G1, 90 cazuri/62,9% cu G2 și 47 cazuri/32,9% cu G3. Stroma intratumorală atât după aspect, cât și compoziția celulară a variat în limite largi: de la dens conjunctivă, cu aspect hialin, cu cantitate variabilă de collagen și matrice extracelulară până la lax, mixoidă. Unele carcinoame au avut stromă uniform distribuită, altele s-au prezentat cu centre tumorale fibrotice și puține celule, acestea fiind concentrate la periferia focarelor de fibroză. De asemenea, am depistat focare de necroză, în special în cazul tumorilor cu pattern de creștere solid. Rareori am pus în evidență focare de necroză extinsă, cu formare de pseudochisturi. O caracteristică histologică intra- și/sau peritumorală frecvent întâlnită a fost reacția limfoplasmocitară, care a variat în limite largi, de la minimă la marcantă (Fig.3.8).

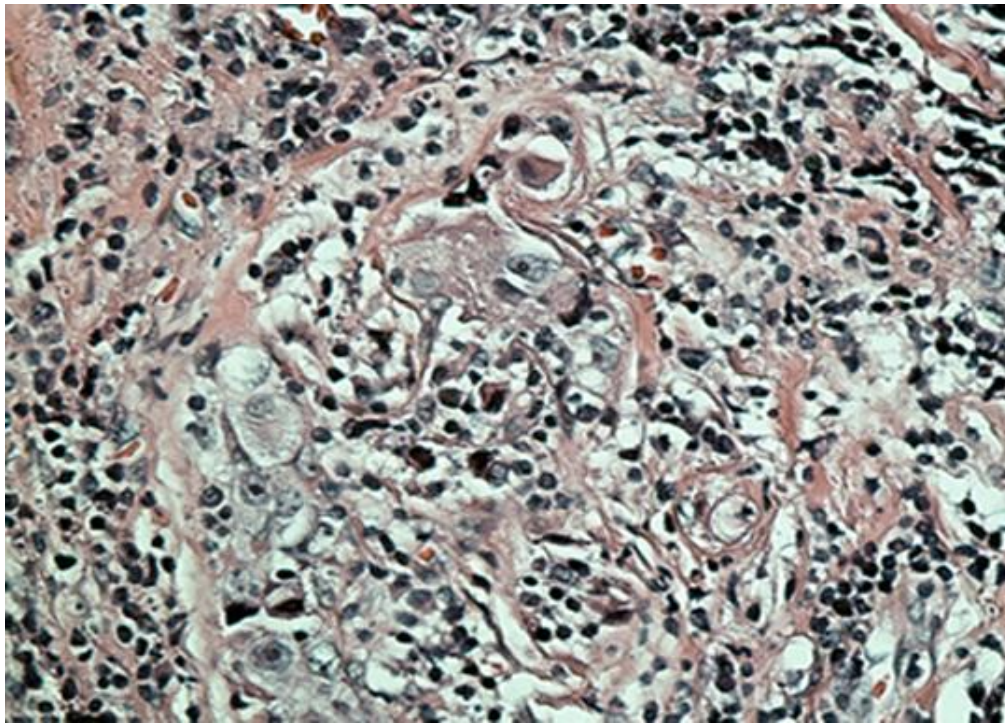


Fig.3.8. Carcinom ductal invaziv, G3 de la o pacientă de 50 ani. De notat reacția limfoplasmocitară exprimată. HE, x400.

Receptorul pentru estrogeni (ER) a fost cuantificat drept negativ în 25 cazuri/17,5%. Restul cazurilor ER pozitive (118/82,5%) le-au fost atribuite următoarele scoruri Allred: +1 – 6 cazuri/5,1%, +2 – 15 cazuri/12,7%, +3 – 97 cazuri/82,2%. Receptorul pentru progesteron (PR) a fost considerat negativ în 35 cazuri/24,5%. Cele 108 cazuri/75,5% PR pozitive au fost repartizate după scorul Allred, precum urmează: +1 – 11 cazuri/10,2%, +2 – 19 cazuri/17,6%, +3 – 78 cazuri/72,2%. Efectuând o analiză sumară a expresiei ER și PR am determinat, că în 26 cazuri/18,2% expresia acestor receptori este radical una diferită. Astfel, în 8 cazuri/5,6% de tumori ER negative, receptorul pentru PR a fost cuantificat drept pozitiv și invers, în 18 cazuri/12,6% de carcinom ER pozitiv celulele tumorale nu au prezentat receptorul pentru PR.

**Expresia ER și PR în metastazele limfonodale.** Comparând valorile Allred pentru ER din tumoarea primară vs metastază am determinat că în 7 cazuri/7,4% expresia ER se schimbă în urma metastazării, și anume: 1 caz/1,1% din negativ în pozitiv și în 6 cazuri/6,3% din pozitiv în negativ. Schimbul expresiei s-a determinat în ambele grupe de vârstă analizate, implicând doar tumori cu grad G2 și G3 de diferențiere. Studiul statistic a determinat valori semnificativ credibile de diferență dintre expresia ER de cele 2 localizări, indicele t-Student fiind egal cu 3,27 la un  $p < 0,002$ . Totodată, am determinat că expresia ER în metastază este puternic influențată de valoarea sa în tumoarea primară (test de regresie liniară:  $R=0,85$ ,  $R^2=0,73$ ). Prin compararea valorilor pentru PR de ambele localizări am determinat, că acesta s-a schimbat radical în 16 cazuri/16,8%, și anume în 6 cazuri/6,3% din negativ în pozitiv și în 10 cazuri/10,5% din pozitiv în negativ. Identic cu ER, transferurile de scor pentru PR au fost înregistrate doar la tumori cu grad G2 și G3 de diferențiere, fiind înregistrate în ambele grupe de vârstă [16-18]. Prin compararea valorilor expresiei receptorilor hormonal ER, PR de ambele localizări am determinat că din cele 7 cazuri/7,4% cu transfer de valoare pentru ER în 4 din ele PR a fost stabil, și invers, instabil în 3 cazuri în urma metastazării. În urma analizei



comparative cu valoarea ER a variațiilor de transfer a PR pentru 16 cazuri/16,8%, menționate mai sus, am determinat că în 14 din ele expresia ER a fost stabilă după metastazare și doar în două din ele a devenit negativă în metastaza limfonodală (Fig.3.9).

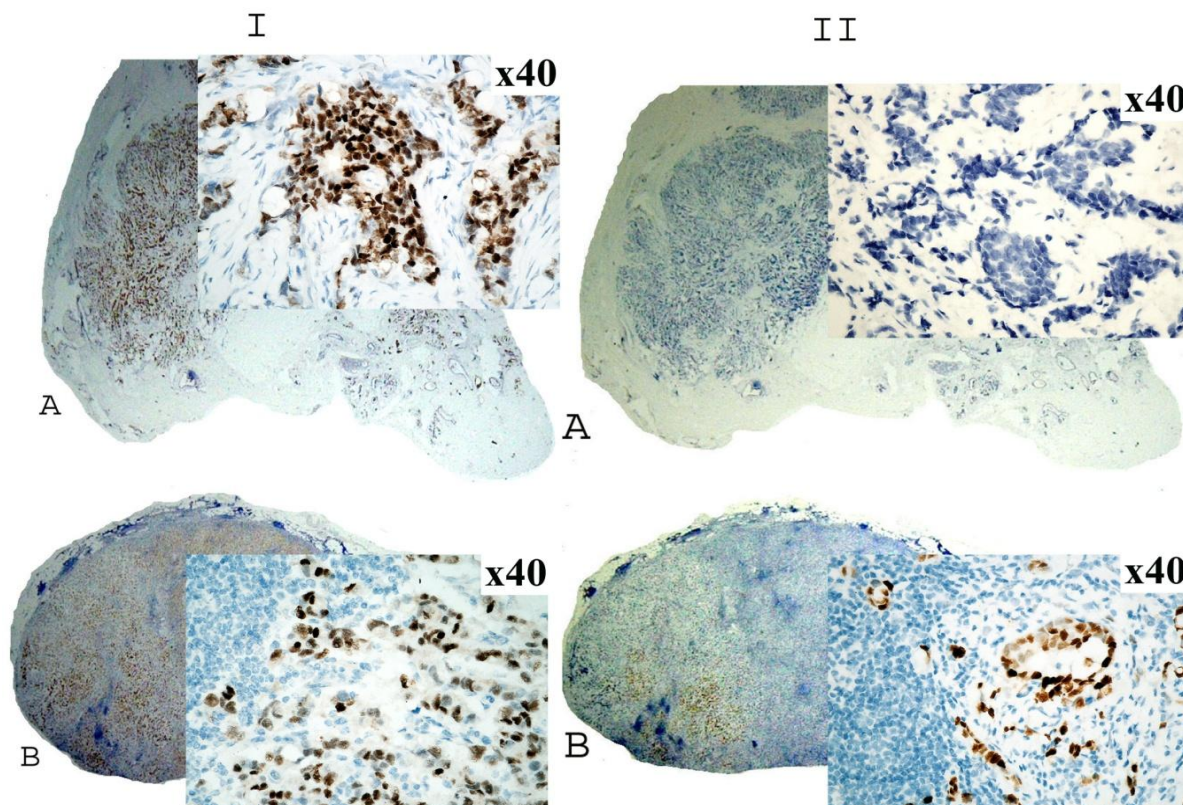


Fig.3.9. Carcinom ductal invaziv, G3, pacientă de 52 ani. Tumoarea primară (A) și metastaza limfonodală (B) colorate simultan pe aceeași lamă pentru ER (I) și PR (II), contracolorare hematoxilină Lille. De notat, că ER a rămas stabil (I), iar PR a devenit intens pozitiv în urma metastazării (II, B).

**Carcinomul lobular invaziv. Expresia ER și PR în tumoarea primară.** Histologic aceste tumori au fost reprezentate de celule solitare dispersate sau aranjate într-o singură linie în stroma intens fibrozată (Fig.3.10). Aceste cordoane lineare deseori au fost localizate în jurul ductelor normale. Celulele tumorale au prezentat nucleu rotund-oval, rareori cu aspect denticulat, cu puțină citoplasmă în jurul lor. Pentru studiu au fost selectate cazurile clasice și nu au fost incluse tumorile cu patern alveolar, solid, pleomorf și tubular.

Receptorul pentru ER în tumoarea primară a avut o expresie negativă în 4 cazuri/22,2% și pozitivă în 14 cazuri/77,8%, cu următoarea repartizare după scorul Allred: +2 – în 3 cazuri/16,7%, +3 – 11 cazuri/61,1%. De menționat că scorul +1 nu a fost atribuit nici unui caz. Unicul caz cu vârsta sub 49 ani, a fost evaluat cu scorul +2. Aproximativ aceeași repartizare după scorul expresiei a fost determinat și în cazul receptorului pentru progesteron: scor 0 – 5 cazuri/27,8%, scor +2 – 4 cazuri/22,2%, scor +3 – 9 cazuri/50%. Prin compararea valorilor expresiei markerilor ER și PR, am constatat un singur caz (5,6%) de diferență majoră, în care ER pozitiv a fost asociat cu PR negativ. Acesta a fost evaluat cu grad G3 de diferențiere, fiind catalogat la grupul de vârstă de „după 49”. Totodată testul de regresie a susținut o asociere puternică, statistic semnificativă dintre valorile ER și PR ( $R=0,87$ ,  $R^2=0,76$ ), suplimentar susținut prin testul t-Student ( $t=1,46$ ,  $p<0,163$ ).



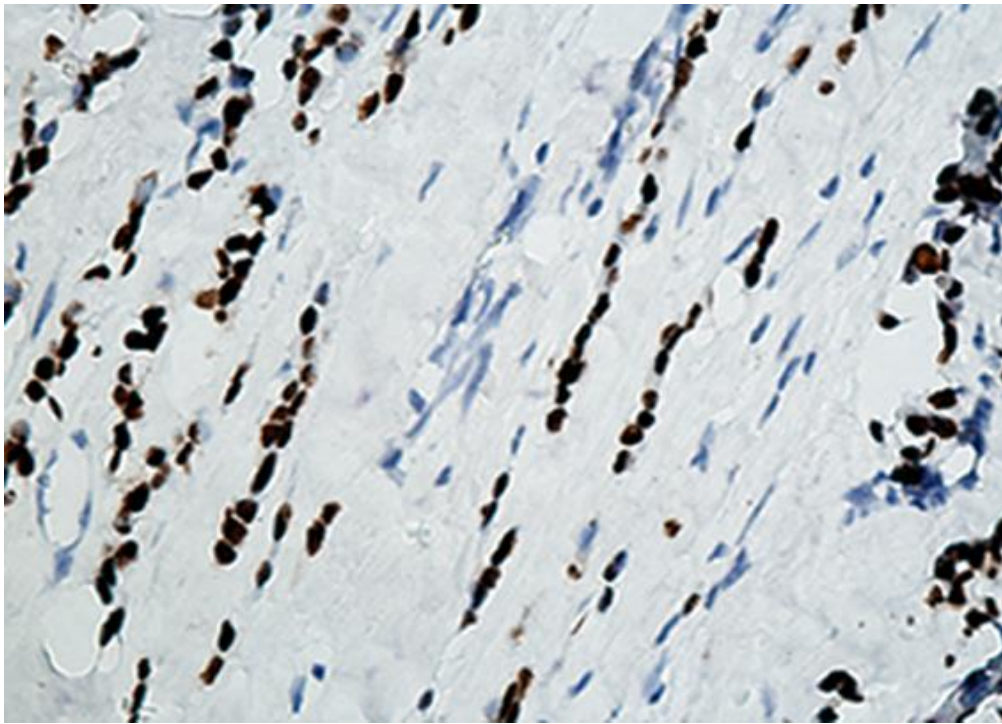


Fig.3.10. Carcinom lobular invaziv, G3, prelevat de la o pacientă de 67 ani. Celulele tumorale au fost marcate la receptorul pentru estrogen (contracolorare cu hematoxină *Lille*, x400). De notat stroma intens fibrozată și cordoanele liniare, în „șir indian” de celule tumorale.

**Expresia receptorilor ER și PR după metastazare.** Receptorul ER a fost determinat în 13 cazuri/72,2% de tumori metastazate. Evaluând expresia din metastază în raport cu valoarea ER din tumoarea primară am determinat un singur caz de transfer (5,6%), și anume de la +2 la negativ în nodul limfatic. Acest caz a fost raportat cu grad G1 de diferențiere și vârstă „după 49”. Repartizarea cazurilor după expresia receptorului PR în metastază a fost următoarea: 7 cazuri (38,9%) PR negativ și 11 cazuri (61,1%) PR pozitiv. La compararea expresiei PR de localizare primară și metastatică am determinat 2 cazuri (11,1%) de transfer al expresiei din pozitiv în negativ. Prin evaluarea comparativă a cazurilor de transfer ER și PR am determinat, că un caz de transfer de expresie a ER din pozitiv în negativ a fost susținut de schimbări similare a PR, iar al doilea caz de transfer al PR din pozitiv în negativ a evaluat cu un ER stabil pozitiv [19].

### 3.3. Stabilitatea receptorului HER2 în procesul metastatic

**Carcinomul ductal invaziv de tip NOS. Tumoarea primară.** Carcinomul ductal invaziv nu expresează receptorul HER2 în majoritatea cazurilor (116 cazuri/81,1%). Cazurile cu expresie pozitivă (27 cazuri/18,9%) au fost repartizate după cum urmează: +2 – 11 cazuri/7,7% și +3 – 16 cazuri/11,2%. În urma analizei de corelație am determinat, că odată cu înaintarea în vârstă scade riscul de a face tumoare HER2 pozitivă ( $r_s = -0,2$ ,  $p < 0,009$ ).

**Metastaza limfonodală.** Din 143 tumori primare descrise anterior, studiului comparativ au fost supuse 96 cazuri, dintre care 80 cazuri/83,3% au fost considerate HER2 negative și repartizate după scor precum: 0 – 75 cazuri/78,1% și +1 – 5 cazuri/5,2%. Cazurile HER2 pozitive au fost distribuite cu scor +2 – 7 cazuri/7,3% și +3

– 9 cazuri/9,4%. Similar sediului primar în ambele cazuri, pozitive și negative au predominat pacientele din grupa de vârstă de „după 49”. Prin studierea comparativă a expresiei HER2 de ambele localizări am determinat că acest receptor este instabil la metastazare, iar direcția de transfer al expresiei este în majoritatea cazurilor de la pozitiv în negativ: total 7 cazuri/7,3% de transfer, din care 6 cazuri/6,3% în direcția pierderii expresiei și un caz/1% de achiziție [16, 18].

**Carcinomul lobular invaziv. Tumoarea primară.** Din cele 18 cazuri diagnosticate cu carcinom lobular invaziv, 15 cazuri/83,3% au fost considerate HER2 negative, iar repartizarea după scor a fost următoarea: HER2 „0”- 14 cazuri/77,7% și HER2 „+1” – 1 caz/5,6%. Cazurile HER2<sup>+</sup> au fost minoritare, fiind înregistrate scoruri doar de HER2 „+2” – 3 cazuri/16,7% [19].

**Metastaza limfonodală.** În sediul limfonodal celulele tumorale au fost considerate în majoritatea cazurilor HER2<sup>-</sup> (17 cazuri/94,4%). Unei singuri tumori/5,6% i-a fost atribuit scorul HER2 „+2”, care a corespuns gradului histologic G2 și vârsta „după 49”. La evaluarea valorilor HER2 de ambele localizări am determinat că acestea corelează rezonabil și statistic semnificativ ( $r_s=0,50$  la un  $p<0,017$ ;  $t=0$ ,  $p=1$ ). Prin compararea expresiei HER2 până și după metastazare, am depistat 2 cazuri/11,1% de transfer de la scor pozitiv la negativ, ambele din categoria de vârstă „după 49” ani.

### 3.4. Evoluția markerilor bazali CK5 și EGFR

**Evoluția citokeratinei bazale CK5. Carcinomul mamar ductal invaziv de tip NOS. Tumoarea primară.** Expresia citokeratinei bazale CK5 a fost studiată pe un lot de 135 tumori. Carcinomul ductal invaziv în majoritatea cazurilor a fost evaluat drept CK5 negativ – 119 cazuri/88,1%. Cazurile pozitive au fost repartizate după scor în felul următor: +1 – 9 cazuri/6,6%, +2 – 4 cazuri/3% și +3 – 3 cazuri/2,2% [18, 20-24].

**Metastaza limfonodală.** Studiului comparativ au fost supuse 92 cazuri, din care metastazele au fost considerate CK5 negative în 83 cazuri/90,2%. Cazurile pozitive, 9/9,8% au fost repartizate după scor precum urmează: +1 – 4 cazuri/4,3%, +2 – cazuri/2,2% și +3 – 3,3%. Eseul statistic a evidențiat că expresia CK5 în metastază este în funcție de valoarea CK5 în tumoarea primară, indicele de corelație indicând valori rezonabile, semnificativ statistice ( $r_s=0,62$  la un  $p<0,0001$ ). La compararea valorilor de expresie a CK5 de ambele localizări nu am primit diferențe semnificativ statistice ( $t=1,30$  la un  $p<0,20$ ). La analiza expresiei CK5 de ambele localizări am determinat 8 cazuri/8,8% de transfer de scor, majoritatea (6 cazuri/6,6%) evoluând cu pierderea expresiei CK5 la metastazare (Fig.3.11). Din acestea, majoritatea (6 cazuri/6,6%) au evoluat cu pierderea expresiei CK5 după metastazare.

**Carcinomul mamar lobular invaziv. Tumoarea primară.** Acest tip de tumori a fost caracterizat prin expresie majoritar negativă a citokeratinei bazale CK5. Din 18 cazuri analizate, 16 cazuri/88,9% au fost evaluate cu scor „0” și doar 2 cazuri/11,1% cu scor +2.



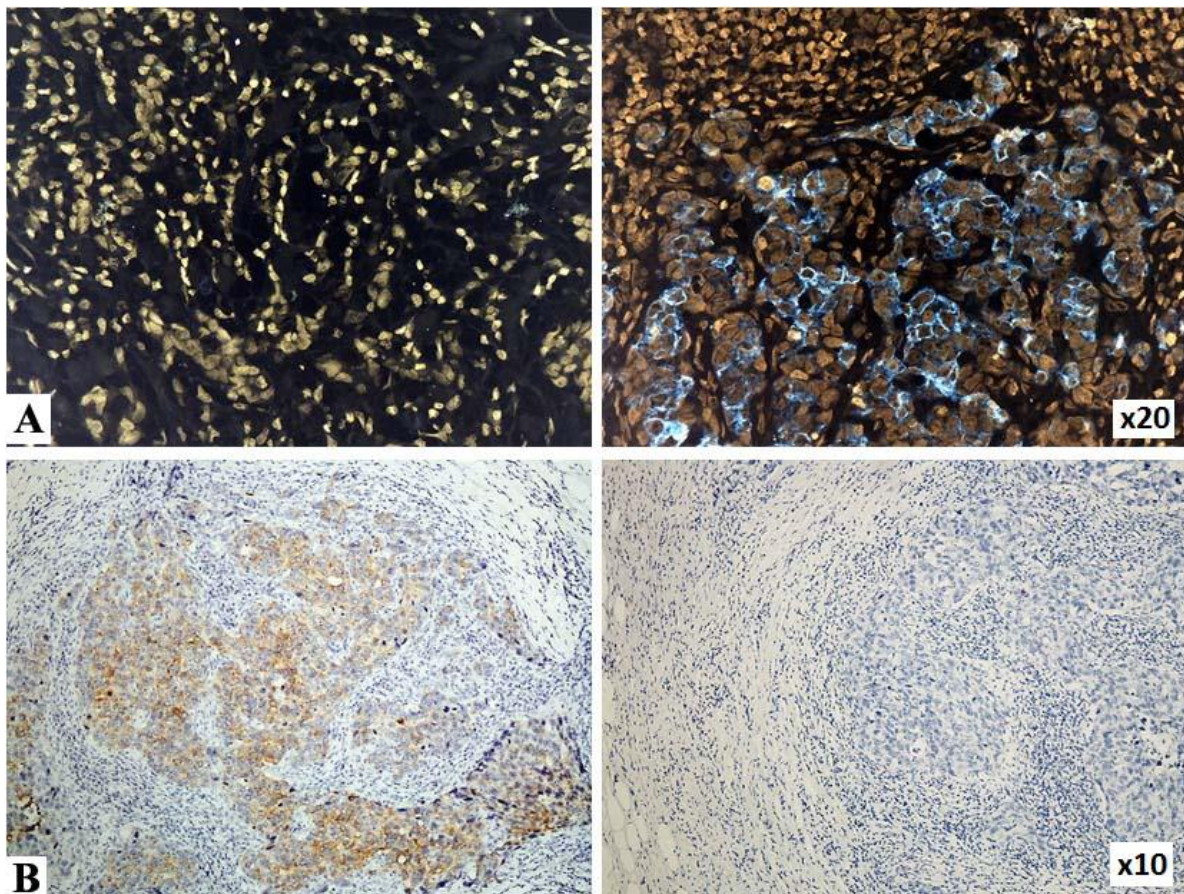


Fig.3.11. Carcinoame ductal invazive: expresia comparativă a citokeratinei bazale CK5 în tumoarea primară vs metastaza limfonodală. De notat, că direcția de transfer al expresiei este în majoritatea cazurilor de la pozitiv în negativ (B, imagine inversată NIS-elements), rareori invers (A, contracolorare cu hematoxilină Lille, x40).

**Metastaza limfonodală.** În sediul limfonodal tumorile de asemenea au manifestat în majoritate un fenotip CK5 negativ – 14 cazuri/77,8%. Tumorile cu expresie CK5 pozitivă au fost repartizate după scor precum: CK5 +1 – 2 cazuri/11,1% și CK5 +2 – 2 cazuri/11,1%. Forța de asociere 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 tumoarea 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 am determinat 2 cazuri/11,1% de achiziționare de către celulele maligne a expresiei CK5 în ambianța limfonodală. Aceste cazuri au fost raportate la tumori cu grad G2 și G3. Cazuri de pierdere a expresiei CK5 la metastazare nu s-au semnalat.

### ***Evoluția receptorului factorului de creștere epidermală EGFR***

**Carcinomul mamar ductal invaziv de tip NOS. Tumoarea primară.** În acest studiu au fost examinate 65 de tumori, dintre care 36 cazuri/55,4% au fost evaluate ca EGFR negative. Cazurile pozitive au fost repartizate după scor precum urmează: scor +1 – 10 cazuri/15,4%, +2 – 15 cazuri/23,1% și +3 – 4 cazuri/6,2%.

**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%. Testul t-Student nu a identificat diferențe statistice veridice dintre valoarea EGFR din tumoarea primară vs metastază ( $t=-1,96$ ,  $p<0,06$ ). La compararea



valorilor EGFR de ambele localizări am determinat 6 cazuri/15,8% cu transfer de scor. De menționat, că toate aceste transferuri au ținut de pierderea paternului pozitiv în microambianța limfonodală și au fost repartizate egal după categoriile de vârstă (Fig.3.12) [20, 25].

**Carcinomul mamar lobular invaziv. Tumoarea primară.** În acest studiu au fost incluse 18 cazuri, din care majoritatea au constituit-o tumorile EGFR negative (13 cazuri/72,2%), iar cazurile cu expresie pozitivă au fost grupate după scor precum: +1 – 1 caz/5,6%, +2 – 2 cazuri/11,1% și +3 – 2 cazuri/11,1%.

Eseul statistic de corelație a determinat o asociere pozitivă, de talie rezonabilă a scorului EGFR cu vârsta pacienților ( $r_s=0,45$ ,  $p<0,031$ ). Încă o corelație de aceeași semnificație a fost determinată la asocierea vârstei și gradului de diferențiere ( $r_s=0,57$ ,  $p<0,007$ ).

**Metastaza limfonodală.** Majoritatea tumorilor la nivel metastatic au fost evaluate cu scor EGFR zero – 15 cazuri/83,3%. La compararea valorilor EGFR de ambele localizări am determinat că scorurile EGFR sunt statistic diferite ( $t=2,12$ , la un  $p<0,05$ ). Însă testul de corelație a evidențiat o asociere pozitivă, puternică dintre valorile EGFR din tumoarea primară și metastază. Mai mult, testul de regresie a subliniat că valoarea EGFR din metastază este direct proporțională cu scorul EGFR din tumoarea primară.

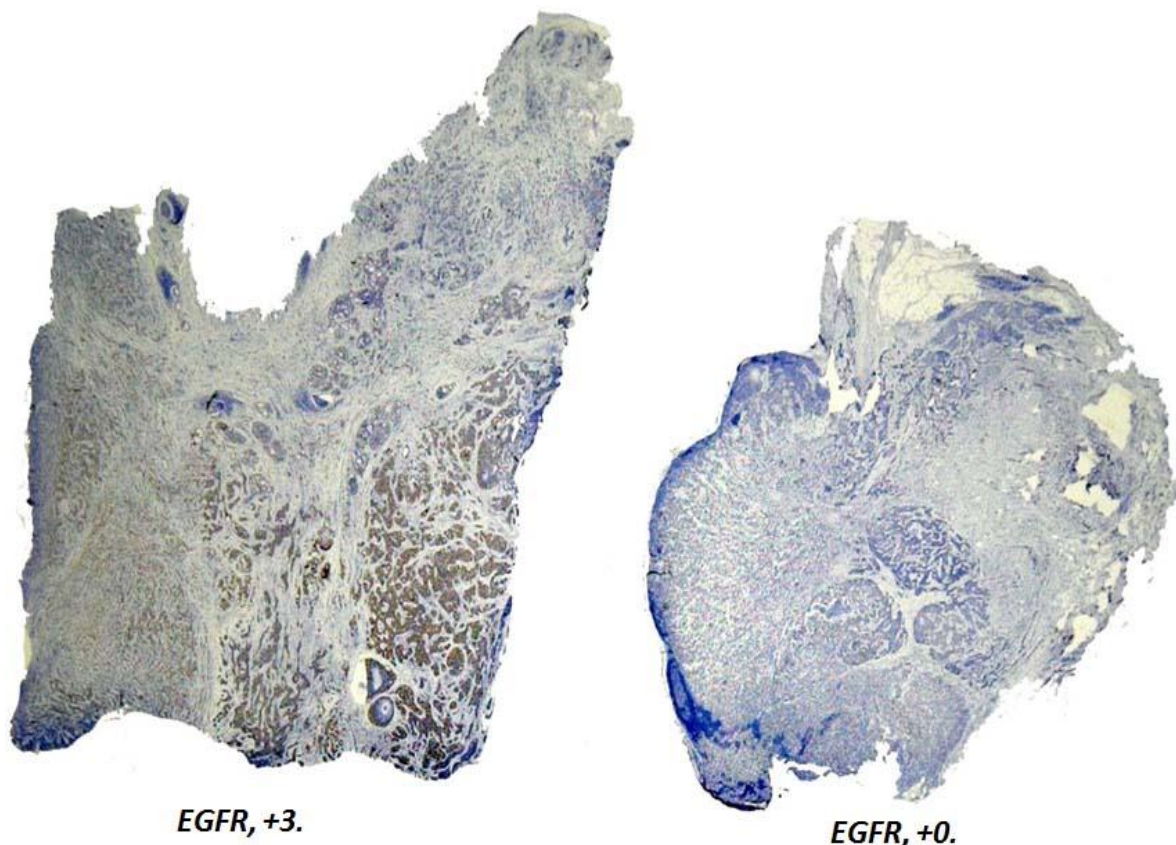


Fig.3.12. Carcinom ductal invaziv: expresia comparativă a EGFR în tumoarea primară vs metastaza limfonodală (contracolorare cu hematoxină Lille, x7). De notat, că focarul primar este EGFR intens pozitiv (+3), iar metastaza EGFR negativă (+0).

### 3.5. Evoluția markerului nuclear de proliferare Ki67

**Carcinomul mamar ductal invaziv de tip NOS. Tumoarea primară.** În studiu au fost incluse 110 cazuri de carcinom ductal invaziv tip NOS. Au predominat tumori cu grad moderat de diferențiere (64 cazuri/58,2%), urmate de G3 (40 cazuri/36,4%) și G1 (6 cazuri/5,4%). Valoarea medie a Ki67 și eroarea standard per total au fost evaluate la  $21,3\pm 1,9$ , iar mediana la 14,7. Expresia acestui marker a corelat pozitiv și statistic

semnificativ cu gradul de diferențiere ( $r_s=0,27$ ,  $p<0,002$ ). Totodată gradul histologic a corelat pozitiv și cu vârsta ( $r_s=0,22$ ,  $p<0,01$ ). În studiul dat cazurile cu proliferare marcată (mai mare de 14%) au constituit 54,5% (60 cazuri), față de cele cu proliferare redusă cu 45,5% (50 cazuri). Dat fiind faptul, că expresia Ki67 a corelat pozitiv și statistic semnificativ cu gradul de diferențiere a permis să concluzionez că, odată cu creșterea activității proliferative a celulelor tumorale scade și gradul histologic al tumorii. Însă trebuie de menționat, că în subgrupul cu proliferare marcată au fost înregistrate 2 cazuri/1,8% de tumori înalt diferențiate și invers, în subgrupul cu intensitate proliferativă redusă majoritatea cazurilor au constituit-o tumorile slab diferențiate (G2 și G3) [3, 16, 18, 23, 26].

**Metastaza limfonodală.** Studiului comparativ au fost supuse 88 cazuri. La compararea valorilor Ki67 de localizare primară și metastatică nu am determinat diferențe statistic semnificative ( $t=1,23$ ,  $p<0,22$ ). Totodată și analiza forței de asociere a valorilor Ki67 de ambele localizări nu a prezentat valori veridice de corelație ( $r_s=0,06$ ,  $p<0,33$ ). Studiul comparativ a valorii Ki67 din tumoarea primară vs metastază ne-a permis să concluzionăm, că acest marker nu este exprimat la fel și la nivelul nodului limfatic. Astfel am stabilit 20 cazuri/22,8% de transfer al valorii Ki67. Transferurile au ținut în majoritate de diminuarea activității proliferante a celulelor metastatice (15 cazuri/17,1%). Restul, 5 cazuri/5,7% s-au manifestat prin proliferare sporită a metastazei față de tumoarea primară.

**Carcinomul mamar lobular invaziv. Tumoarea primară.** Expresia markerului nuclear Ki67 în tumoarea primară a variat în limite largi, de la zero la 72% celule tumorale Ki67 pozitive, valoarea medie a constituit  $23,8\pm 5,2$ , iar mediana 18,8. La aplicarea pragului de 14% am stabilit 2 grupe, numeric egale referitor la expresia Ki67: 9 cazuri/50% cu proliferare marcată și 9 cazuri/50% cu proliferare redusă. Analiza statistică de corelație a determinat o forță de asociere pozitivă, de talie rezonabilă dintre expresia Ki67 și gradul de diferențiere ( $r_s=0,57$ ,  $p<0,007$ ).

**Metastaza limfonodală.** Evoluția receptorului Ki67 după metastazare a fost examinată pe fiecare caz în parte. Astfel am stabilit, că doar într-un singur caz din 18, valoarea markerului nuclear din metastază a fost diferită de cea din tumoarea primară. Transferul expresiei s-a manifestat prin intensificarea proliferării tumorale în sediul limfonodal (25%) comparativ cu tumoarea primară (3,7%).

### 3.6. Dinamica markerilor apoptotici p53 și BCL2

**Evoluția markerului pro-apoptotic p53. Carcinomul mamar ductal invaziv de tip NOS. Tumoarea primară.** Expresia markerului pro-apoptotic p53 a fost studiată pe un lot de 97 tumori mamare. Receptorul p53 a fost evaluat cu scor negativ în 43 cazuri/44,3%. Cazurile pozitive au fost repartizate după scor precum urmează: +1 – 13 cazuri/13,4%, +2 – 23 cazuri/23,7% și +3 în 18 cazuri/18,6%. Gradul de diferențiere nu a demonstrat o careva afinitate față de expresia p53. Astfel, am înregistrat tumori cu toate 3 grade de diferențiere atât în grupul cu expresie p53 negativă, cât și grupul p53 pozitiv [26-30].

**Metastaza limfonodală.** Studiului comparativ tumoarea primară-metastază au fost supuse 87 cazuri. La acest nivel numărul de cazuri p53 negative a fost puțin în creștere comparativ cu tumoarea primară, fiind înregistrat în 41 cazuri/47,1%. Faptul că valoarea

expresiei p53 din metastază diferă de localizarea primară a fost susținut de testul t-Student, unde  $t=1,95$  la un  $p<0,050$ . Totodată studiul statistic a demonstrat, că valoarea expresiei p53 în metastaza limfonodală este în funcție de valoarea acestuia în tumoarea primară, coeficientul de corelație Spearman demonstrând o asociere de talie înaltă, statistic semnificativă ( $r_s=0,76$  la  $p<0,0001$ ).

La examinarea detaliată a expresiei p53 de ambele localizări pe fiecare caz în parte am stabilit că acest receptor nu este stabil pe parcursul metastazării. Astfel, au fost stabilite 12 cazuri/13,79% în care expresia p53 limfonodală a fost una diferită de cea din tumoarea primară. Achiziționare de receptor în urma metastazării s-a înregistrat în 3 cazuri/3,45%. În restul cazurilor (9 cazuri/10,34%) s-a determinat pierderea expresiei p53 după metastazare, implicând în egală măsură toate 3 scoruri ale expresiei pozitive (+1 – +3) (Fig.3.13).

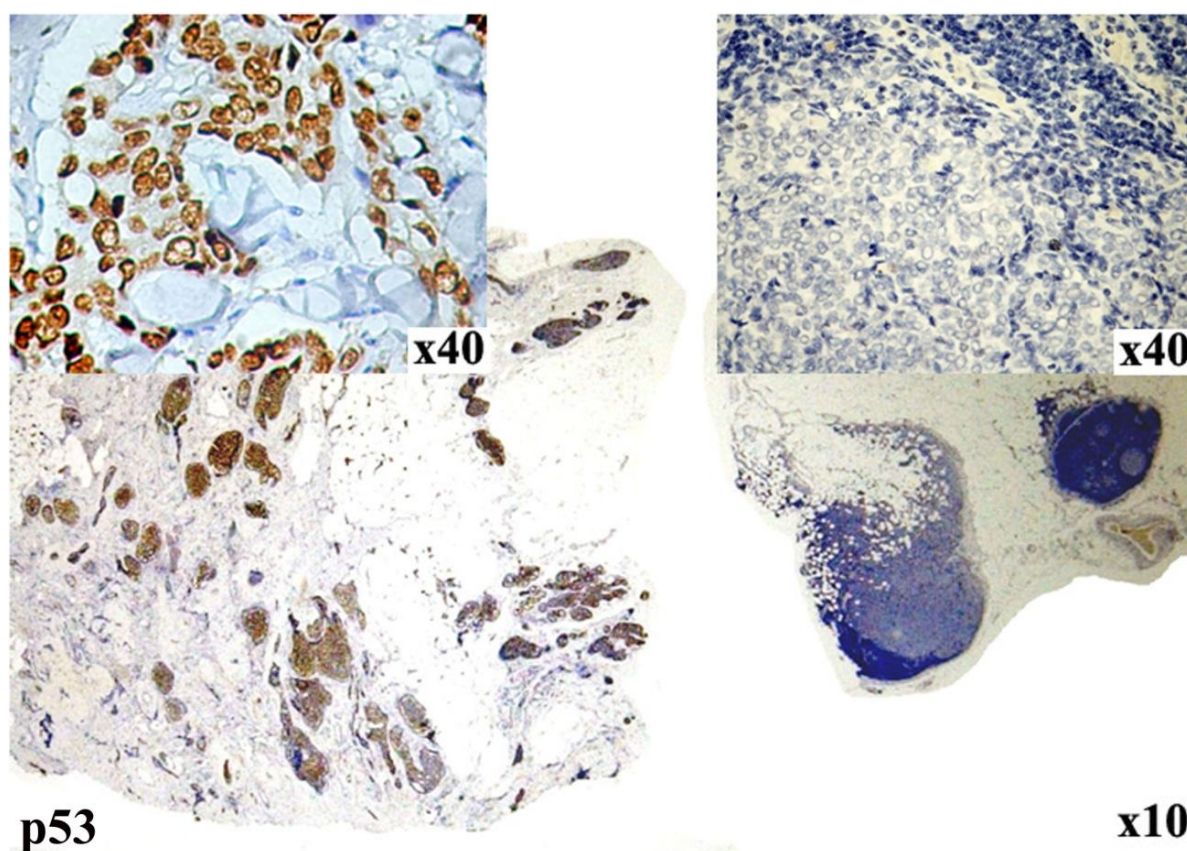


Fig.3.13. Carcinom ductal invaziv de tip NOS: evoluția markerului pro-apoptotic p53 în procesul de metastazare. În majoritatea cazurilor cu transfer de scor al p53 (9 cazuri/10,34%) s-a determinat pierderea expresiei acestuia după metastazare.

**Carcinomul mamar lobular invaziv. Tumoarea primară.** Receptorul p53 nu a fost depistat în cazul a 5 tumori/27,8%. Cazurile pozitive (13 cazuri/72,2%) au fost repartizate după scorul p53 în felul următor: scor +1 – 3 cazuri/16,7%, +2 – 6 cazuri/33,3% și +3 în 4 cazuri/22,2%.

Eseul statistic de corelare nu a evidențiat asocieri statistic semnificative dintre valoarea expresiei p53 cu gradul de diferențiere al tumorii și vârsta pacientelor. Gradul histologic însă a corelat pozitiv, la un nivel rezonabil ( $r_s=0,57$ ,  $p<0,007$ ) cu vârsta pacientelor.



**Metastaza limfonodală.** La acest nivel am determinat o ușoară creștere a numărului de cazuri p53 negative (7 cazuri/38,9%) comparativ cu tumoarea primară. Eseul statistic t-Student nu a evidențiat diferențe semnificativ statistice dintre expresia p53 de ambele localizări ( $t=0,82$  la un  $p<0,42$ ). Mai mult, valoarea expresiei p53 din metastază a corelat înalt pozitiv cu scorul p53 din tumoarea primară ( $r_s=0,76$ ,  $p<0,0001$ ). La compararea expresiei de ambele localizări pe fiecare caz în parte, am determinat că receptorul p53 nu este stabil pe parcursul metastazării. Cazurile p53 instabile au implicat doar tumori cu grad scăzut și moderat de diferențiere. Evoluția acestui receptor în timpul metastazării s-a manifestat atât prin pierderea expresiei, cât și prin achiziție de fenotip p53. De menționat însă, că cazurile cu transfer de scor din pozitiv în negativ (3 cazuri/16,68%) au predominat față de cazurile cu achiziție de p53 după metastazare (1 caz/5,56%).

### ***Evoluția markerului anti-apoptotic BCL2***

**Carcinomul mamar ductal invaziv de tip NOS. Tumoarea primară.** În acest studiu au fost examinate 93 tumori, prelevate majoritar de la paciente din grupul de vârstă „după 49” – 67 cazuri/72% și minoritar, „până la 49” cu 26 cazuri/28%. Studiul imunohistochimic a determinat că carcinomul ductal invaziv este în majoritatea cazurilor BCL2 pozitiv – 71 cazuri/76,3%, și anume cu expresie +3 (58 cazuri/62,4%). Cazurile BCL2 negative au fost evaluate preponderent cu „0” – 17 cazuri/18,3%, urmate de +1 cu 5 cazuri/5,4% [30-32].

**Metastaza limfonodală.** Evoluția BCL2 a fost comparată pe un lot de 87 tumori, dintre care 41 cazuri/47,1% au fost considerate BCL2 negative și 46 cazuri/52,9% BCL2 pozitive. La compararea valorilor BCL2 din tumoarea primară și metastază am determinat că expresia este una diferită, în funcție de localizare, iar testul t-Student a atins valori semnificativ statistice ( $t=4,86$  la un  $p<0,00001$ ). Diferențele de expresie primară-metastatică s-au datorat existenței a 23 cazuri/26,3% de transfer de scor, dintre care 2 cazuri/2,2% au prezentat achiziționare de receptor după metastazare, iar 21 cazuri/41,1% sau soldat cu pierderea expresiei BCL2 în ambianța limfonodală. Cazurile de BCL2 achiziționare au implicat doar tumori de grad G3 la paciente de „după 49” ani. Cazurile cu pierderea expresiei BCL2 după metastazare au fost înregistrate la tumori cu grad G2 și G3, dintre care în 6 cazuri/6,9% au implicat paciente cu vârsta de „până la 49” ani.

**Carcinomul mamar lobular invaziv. Tumoarea primară.** În studiul dat am determinat că în carcinomul lobular invaziv predomină cazurile cu expresie BCL2 pozitivă (11 cazuri/61,1%) față de cele BCL2 negative (7 cazuri/38,9%). În relație cu gradul de diferențiere am constatat că majoritatea tumorilor sunt G2 și G3, cu excepția a 2 cazuri/11,1% BCL2 negative, cu grad G1 și vârsta pacientei de „după 49” ani. Eseul statistic de corelare însă nu a stabilit asocieri de forță semnificativă, coeficientul Pearson fiind egalat cu  $r=0,20$  și  $p<0,219$  la corelarea expresiei BCL2 cu gradul de diferențiere și  $r=0,06$  la  $p<0,410$  în cazul BCL2 vs vârsta pacientelor. Unica corelație statistic semnificativă s-a stabilit la asocierea gradului de diferențiere și vârstei pacientelor ( $r=0,48$ ,  $p<0,022$ ).

**Metastaza limfonodală.** La nivelul metastazei limfonodale au predominat cazurile BCL2 negative – 11 cazuri/61,1%, repartizate după gradul de diferențiere al tumorii primare

precum urmează: G3 – 6 cazuri/33,3%, G2 – 3 cazuri/16,7% și G1 – 2 cazuri/11,1%. La compararea valorilor de expresie a BCL2 testul t-Student nu a determinat diferențe semnificativ statistice, dependente de localizare ( $t=2,01$  la un  $p<0,06$ ). Trebuie de menționat însă, că la compararea valorilor BCL2 de ambele localizări am determinat 4 cazuri/22,3% de transfer de scor după metastazare. Acestea exclusiv au ținut de pierderea receptorului în micromediul limfonodal după metastazarea tumorilor cu grad G2 și G3.

### **3.7. Stabilitatea E-cadherinei în evoluția procesului metastatic**

**Carcinomul mamar ductal invaziv de tip NOS. Tumoarea primară.** Markerul de adeziune intercelulară E-cadherina a fost studiat pe un lot de 138 tumori, colectate de la paciente cu vârsta cuprinsă între 33-86 ani. În funcție de categoria de vârstă am determinat, că majoritatea o constituie pacientele de „după 49” ani – 100 cazuri/72,5%, față de cele de „până la 49” ani, cu 38 cazuri/27,5%. Valoarea markerului E-cadherina a fost una majoritar pozitivă (134 cazuri/97,1%), iar expresia acestuia a fost înregistrată la tumori de orice grad de diferențiere și paciente de ambele categorii de vârstă. De menționat, că în cohorta tumorilor E-cadherin pozitive au predominat cazurile cu scor „+3” – 121 cazuri/87,7%, față de cele „+2” – 13 cazuri/9,4% [33, 34].

**Metastaza limfonodală.** Studiului comparativ au fost supuse 94 tumori. Metastazele limfonodale, precum și tumorile primare au manifestat preponderent fenotip E-cadherin pozitiv în 86 cazuri/91,5%. Studiul comparativ tumoră primară-metastază a evidențiat o dublă creștere a cazurilor E-cadherin negative în sediul limfonodal (8 cazuri/8,5%), în special datorită cazurilor cu expresie de limită „+1” a acestui marker. Analiza detaliată a expresiei E-cadherinei pe fiecare caz în parte a pus în evidență 9 cazuri/9,57% cu transfer de scor după metastazare. Cazurile E-cadherin instabile au implicat doar tumori cu grad G2 și G3 de diferențiere și paciente de ambele categorii de vârstă. Din cele 9 cazuri/9,57% înregistrate cu transfer de scor, 8 cazuri/8,51% au evoluat cu pierderea expresiei E-cadherinei după metastazare, și o singură tumoare, G3 a manifestat achiziționare de fenotip E-cadherin pozitiv în sediul limfonodal.

**Carcinomul mamar lobular invaziv. Tumoarea primară.** Studiul imunohistochimic a evidențiat că tumorile lobular invazive manifestă o ușoară prevalență a cazurilor cu expresie negativă a E-cadherinei (10 cazuri/50,6%), față de cele pozitive (8 cazuri/44,4%). De remarcat faptul, că cazurile E-cadherin negative au fost exclusiv tumori cu grad moderat și scăzut de diferențiere, iar cele 2 cazuri/11,1% cu scor G1 au expresat E-cadherina din abundență [35]. Eseul statistic de corelare a evidențiat o asociere de talie rezonabilă, statistic semnificativă, însă inversă dintre expresia E-cadherinei cu vârsta ( $r_s = -0,44$ , la  $p < 0,033$ ) și gradul de diferențiere ( $r_s = -0,52$ , la  $p < 0,013$ ). Relația dintre aceste variabile a fost confirmată și prin testul de regresie lineară.

**Metastaza limfonodală.** Incidența cazurilor după expresia E-cadherinei a fost similară cu cea din tumoarea primară: 10 cazuri/55,6% E-cadherin negative și 8 cazuri/44,4% E-cadherin pozitive, fapt confirmat și prin testul t-Student ( $t=1,17$ ,  $p < 0,26$ ). La o analiză amănunțită a fiecărui caz în parte am determinat, că E-cadherina nu este stabilă în procesul metastatic. Astfel am evidențiat 2 cazuri/11,1% cu transfer de scor,



atât în direcția achiziționării E-cadherinei (1 caz/5,6%) după metastazare, cât și pierderii acestui marker în sediul limfonodal (1 caz/5,6%).

### **3.8. Evoluția receptorului pentru AR în microambianța limfonodală**

**Carcinomul ductal invaziv de tip NOS. Expresia în tumoarea primară.** În acest studiu au fost incluse 15 paciente cu vârsta cuprinsă între 33-79 ani. Conform grupei de vârstă acestea au fost repartizate în: „până la 49” ani – 4 paciente/26,7% și 11 paciente/73,3% „după 49” ani. Receptorul pentru androgeni a fost evaluat cu scor pozitiv în 14 cazuri/93,3%. Aceste cazuri au fost repartizate după scorul Allred în felul următor: 1 caz/6,7% cu scor „+1”, 2 cazuri/13,3% cu scor „+2” și 11 cazuri/73,3% cu scor Allred „+3”. Doar o singură tumoare (6,7%), cu grad G3, dezvoltată la pacientă de „după 49” ani nu a prezentat receptorul pentru AR.

**Metastaza limfonodală.** La compararea expresiei AR în dependență de localizare nu am determinat diferențe statistic semnificative, t-testul prezentând valori de  $t=0$  la  $p=1$ . Mai mult, testul de corelare a finalizat cu rezultat statistic veridic în favoarea dependenței pozitive, de talie rezonabilă a expresiei AR din metastază de valoarea AR din tumoarea primară ( $r_s=0,49$ ,  $p<0,044$ ). Legătura de tip cauză-efect dintre aceste 2 variabile a fost susținută și de testul de regresie. Evoluția receptorului pentru AR în procesul metastatic a fost evaluată prin compararea scorului Allred al tumorii de ambele localizări. Astfel am determinat, că expresia acestui receptor nu este stabilă după metastazare, înregistrând transfer de scor în 3 cazuri/23,1%. Evoluția acestui receptor a decurs atât cu achiziționare de fenotip AR pozitiv (1caz/7,7%), atât și prin pierderea acestui receptor de celula tumorală în ambianța limfonodală (2 cazuri/15,4%).

### **3.9. Analiza comparativă a expresiei receptorilor incluși în studiu: interrelațiile dintre toți markerii utilizați în funcție de tipul și gradul histologic al tumorii, vârsta pacientelor**

**Carcinomul ductal invaziv de tip NOS.** În cadrul acestui studiu am determinat, că relațiile statistice dintre markerii celulari incluși în studiu, de localizare primară și metastatică nu sunt identice. Aceasta presupune că metastaza limfonodală are un fenotip imunohistochimic particular. Cauzele posibile țin fie de influența ambianței limfonodale, fie de evoluția metastatică rapidă a unei colonii de celule tumorale, „invizibile” imunohistochimic în tumoarea primară [1, 17, 36]. În cazul receptorului ER de ambele localizări sunt comune relațiile statistice cu PR, HER2, CK5, BCL2 de ambele nivele, p53 și AR metastatice. Corelația expresiei progesteronului, PRtm și PRmt a coincis la asociere cu ER și BCL2 de ambele localizări, HER2tm, CK5tm, ARtm, Ki67mt și p53mt. Receptorul pentru factorul uman de creștere epidermală 2, de localizare primară și metastatică a prezentat similaritate la corelare cu ER, CK5 și BCL2 de ambele nivele, precum și cu PRtm, Ki67mt. Asocierile statistice al citokeratinei bazale CK5, de localizare primară și metastatică au coincis în relație cu BCL2tm, cu ER, HER2 și Ki67 de ambele nivele. Indicele de proliferare Ki67 de ambele localizări a prezentat relații statistice similare cu CK5 și p53, atât de nivel primar cât și limfonodal, precum și cu E-cadherina, și receptorul pentru androgeni de ordin metastatic. Markerul anti-apoptotic BCL2 din tumoarea primară a prezentat similaritate statistică cu omologul din metastază la asociere cu ER, PR și HER2 de

ambele localizări, precum și cu CK5tm. Interrelațiile statistice ale markerului pro-apoptotic p53 de ambele localizări au coincis la corelare cu Ki67 de ambele nivele, PR și EGFR de nivel limfonodal. Asocierile statistice a EGFR și E-cadherinei sunt în funcție de localizare. Expresia acestor markeri la nivel primar nu a coincis cu valoarea expresiei receptorilor omologi de nivel metastatic. Corelațiile statistice ale AR din tumoarea primară au coincis cu cele manifestate de markerul pentru AR de localizare limfonodală față de ER și E-cadherina primare, precum și cu PR, Ki67 de ordin metastatic.

**Carcinomul lobular invaziv.** Corelațiile expresiei ER de localizare primară și metastatică au coincis la asociere cu PR de ambele localizări, Ki67, BCL2 și EGFR din tumoarea primară. Valoarea expresiei PR de ambele localizări a prezentat corelații asemănătoare în raport cu ER de ambele nivele și BCL2 de localizare primară. Asocierile statistice ale markerilor HER2, BCL2 și CK5 din tumoarea primară, nu coincid cu interrelațiile statistice ale HER2, BCL2 și CK5 din metastază. Ki67 de ambele nivele corelează simultan cu EGFR de ambele localizări, cu ER și PR doar de localizare primară. Markerul pro-apoptotic p53, din tumoarea primară și metastază au manifestat rezultate statistice similare la comparare cu EGFR și E-cadherina de nivel limfonodal. Expresia EGFR de ambele localizări au coincis statistic la asociere cu Ki67 de ambele nivele, precum și cu PR, BCL2 de localizare metastatică. Unica coincidență statistică a expresiei E-cadherinei de ambele localizări s-a determinat la asociere cu valoarea p53 de ordin metastatic.

#### **4. CARACTERISTICA SUBTIPURILOR MOLECULARE**

**4.1. Incidența și dinamica subtipurilor prin prisma recomandărilor St Gallen, 2013. Carcinomul ductal invaziv de tip NOS.** În cadrul acestui studiu am determinat că în structura moleculară a carcinomului mamar de tip NOS prevalează combinațiile proprii grupului Luminal, hormon-dependent [36]. Odată cu creșterea gradului de diferențiere a subtipurilor molecular, tumorile pierd un șir de markeri precum HER2, Ki67, CK5, p53, EGFR și tind să expreseze ER, PR, BCL2. Tumorile Luminal A sunt hormon-dependente (ER, PR), HER2, CK5, p53, EGFR negative, cu o expresie marcată a BCL2 și E-cadherinei. Deși în subtipul Luminal A se atestă asocierea pozitivă, paradoxală a ER și p53 cu Ki67, aceste tumori sunt cu predilecție slab proliferative. După metastazare carcinomul Luminal A tinde să mențină expresia ER, PR, Ki67, BCL2, p53, EGFR și E-cadherina. Oricum, subtipul Luminal A este instabil pe parcursul metastazării. Tumorile Luminal B exprimă ER, PR, AR, BCL2, p53, E-cadherina și sunt activ proliferante, comparativ cu cele Luminal A. Subtipul Luminal B spre deosebire de Luminal A exprimă p53. Tumorile Luminal B tind să mențină după metastazare expresia ER, PR, HER2, Ki67, CK5, BCL2, p53 și EGFR. În structura tumorilor Luminal B predomină subtipul Luminal B/Ki67. Proliferarea activă a tumorilor Luminal B susține și prevalența numerică a subtipurilor Luminal B/HER2/Ki67 față de Luminal B/HER2. Subtipul Luminal B este instabil la metastazare, în majoritatea cazurilor evoluând într-un subtip mai diferențiat, Luminal A. Tumorile activ proliferante sunt cele mai instabile la metastazare. Trebuie de menționat că expresia CK5 de rând cu ER, PR, HER2 servește drept o dovadă a posibilității de diversificare a subtipurilor moleculare existente. Tumorile HER2 pozitive tind să piardă receptorul BCL2 odată cu înaintarea în vârstă.

Expresia HER2 corelează cu diminuarea gradului de proliferare Ki67 și expresia CK5, totodată sporind șansele de achiziție de către celulele tumorale a markerului p53. Însă corelarea pozitivă a CK5 cu Ki67 în cadrul acestui subtip pledează pentru ipoteza eterogenității celulare în cadrul aceluiași subtip de tumori. În cazul tumorilor HER2 pozitive expresia markerului anti-apoptotic BCL2 corelează paradoxal pozitiv cu prezența receptorului pro-apoptotic, p53. Metastazele carcinomului HER2 păstrează același profil molecular, cu excepția că devin mai agresive. Subtipul HER2 nu este stabil pe parcursul metastazării, transferurile de subtip evaluând doar cu achiziționarea de receptori luminali.

**Carcinomul mamar de tip lobular invaziv.** În cadrul acestui studiu am determinat că subtipurile moleculare dezvoltate de carcinomul lobular sunt instabile pe parcursul metastazării, preponderent evoluând cu pierderea receptorilor luminali [19]. Tumorile Luminal A dezvoltate de carcinomul lobular spre deosebire de cel ductal sunt p53 pozitive, iar prezența CK5 de rând cu receptorii hormonali indică că carcinomul lobular tot dezvoltă subtip BasoLuminal. Subtipul HER2 nu este stabil. În cazul tumorilor lobulare acesta degradează în Basal-like. Subtipul Luminal B dezvoltat de carcinomul lobular invaziv spre deosebire de cel ductal nu expresează E-cadherina.

**4.2. Stabilitatea profilului molecular al carcinomului mamar după implantare pe membrana corioalantoidă a oului embrionat.** În prima zi după implantare fragmentele de țesut histopatologic aplicate pe membrana corioalantoidă aveau un contur clar delimitat, culoare alb-gălbuie, cu suprafață netedă (Fig.4.1).

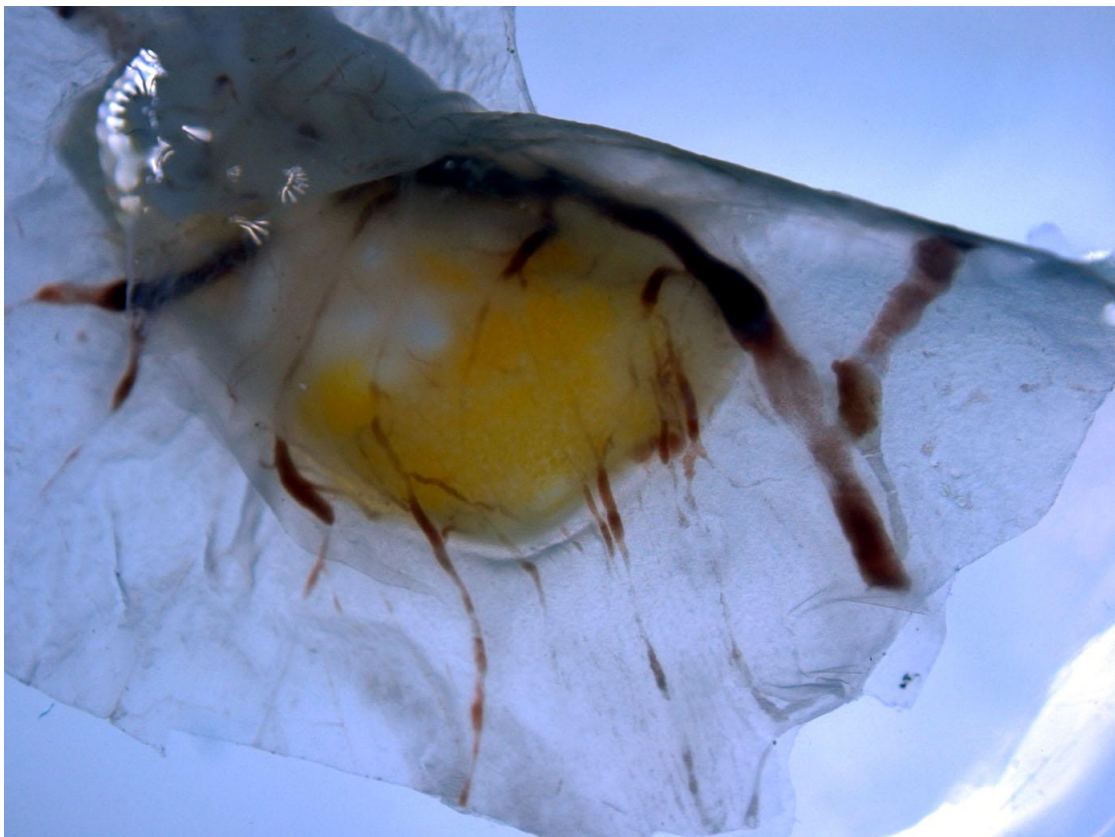


Fig.4.1. Implant de carcinom mamar pe membrana corioalantoidă, ziua a 4-a (x2). Țesutul aplicat de culoare galbenă, bombat, cu multiple vase nou formate, convergente din membrană în implant.



În ziua 3-4-a după implantare suprafața implantului devenea bombată, rugoasă, de culoare neschimbată. La acest termen de asemenea se determinau vase nou formate, convergente spre implant. Proveniența acestor vase din membrana corioalantoidă a fost dovedită histologic prin prezența eritrocitelor nucleate, caracteristice păsărilor (Fig.4.2). La ziua a 3-4-a în grosimea membranei corioalantoide deja se observa invazia celulelor tumorale. Aranjamentul acestor celule a fost eterogen, după caz prezentând fie celule solitare, cordoane sau grupuri. Originea epitelială a acestor celule a fost confirmată prin colorare cu pan-citokeratina AE1/AE3 (Fig.4.3).

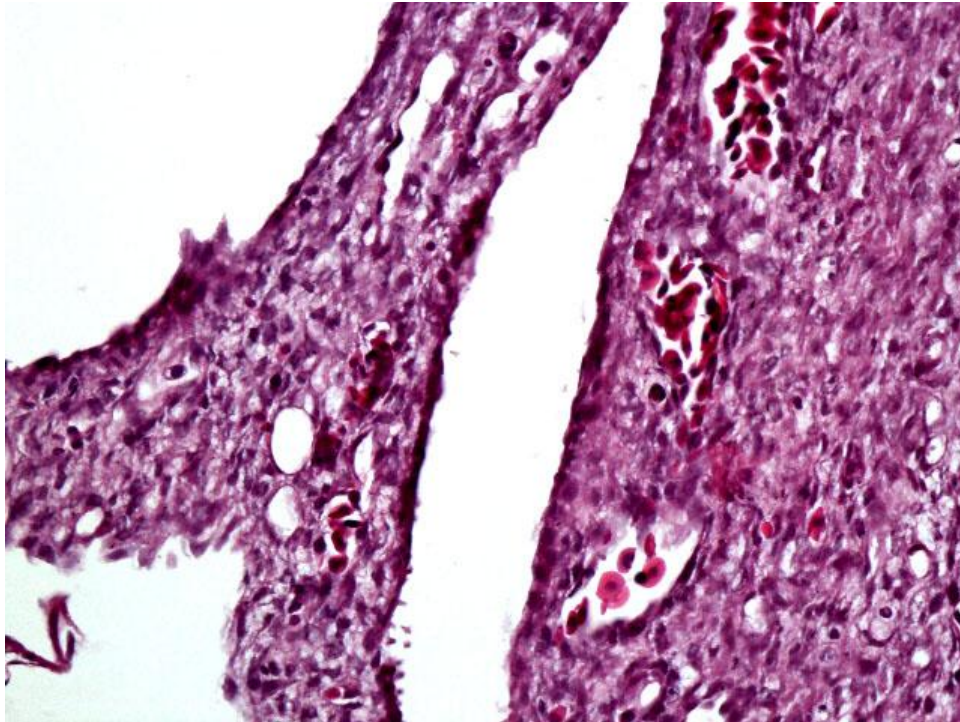


Fig.4.2. Vase neoformate în implant de tumoare mamară pe membrane corioalantoidă. Apartenența acestor vase gazdei este certificată de prezența eritrocitelor nucleate. HE, x400.

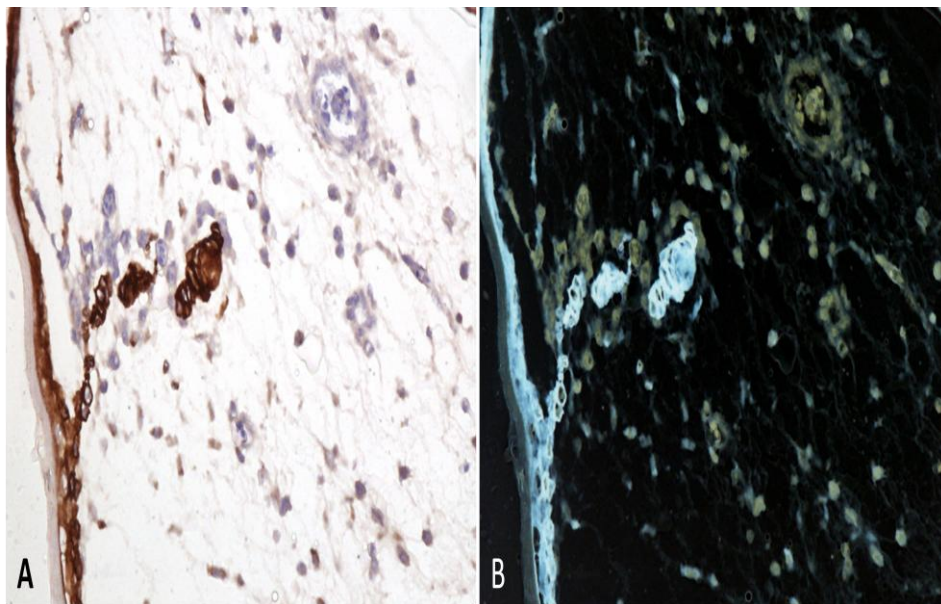


Fig.4.3. Implant de carcinom mamar pe membrana corioalantoidă, ziua a 4-a post-implant. Colorație pan-citokeratină AE1/AE3 (A) și imaginea sa inversată (x400). Imaginea confirmă invazia tumorii în membrană, cu dispunerea celulelor tumorale solitar, sub formă de cordoane și grupuri.

Examinarea microscopică a specimenelor a permis să concludem, că celulele invadate prezentau particularități morfologice și imunohistochimice deosebite față de țesutul de origine. Și anume, forma celulelor solitare varia de la rotund-oval, la aspect stelat, ceea ce mima structural celulele stromale ale membranei corioalantoide (Fig.4.4). În schimb, celulele tumorale care preferau aranjament în cordoane sau grupuri, mima după aspectul histologic carcinomul scuamocelular. În toate aceste cazuri proveniența tumorală a celulelor a fost confirmată prin colorare cu AE1/AE3. Imunohistochimic am determinat că intensitatea exprimării AE1/AE3 în celulele invadate a variat de la slab în celulele solitare la pronunțat în celulele aranjate în grupuri sau cordoane. Analiza expresiei markerilor din tumoarea primară vs celulele diseminate în implant a pus în evidență preponderența cazurilor cu pierderea ER (19 cazuri/86,4%) în membrana corioalantoidă, urmate în 2 cazuri/9,1% cu ER stabil pozitiv și un caz cu ER stabil negativ. Un comportament deosebit față de ER a fost detectat în cazul receptorului PR: acesta majoritar (13 cazuri/59,1%) a fost evaluat stabil pozitiv, urmat în 7 cazuri/31,8% de pierdere a PR după implantare și 2 cazuri/9,1% cu PR stabil negativ.

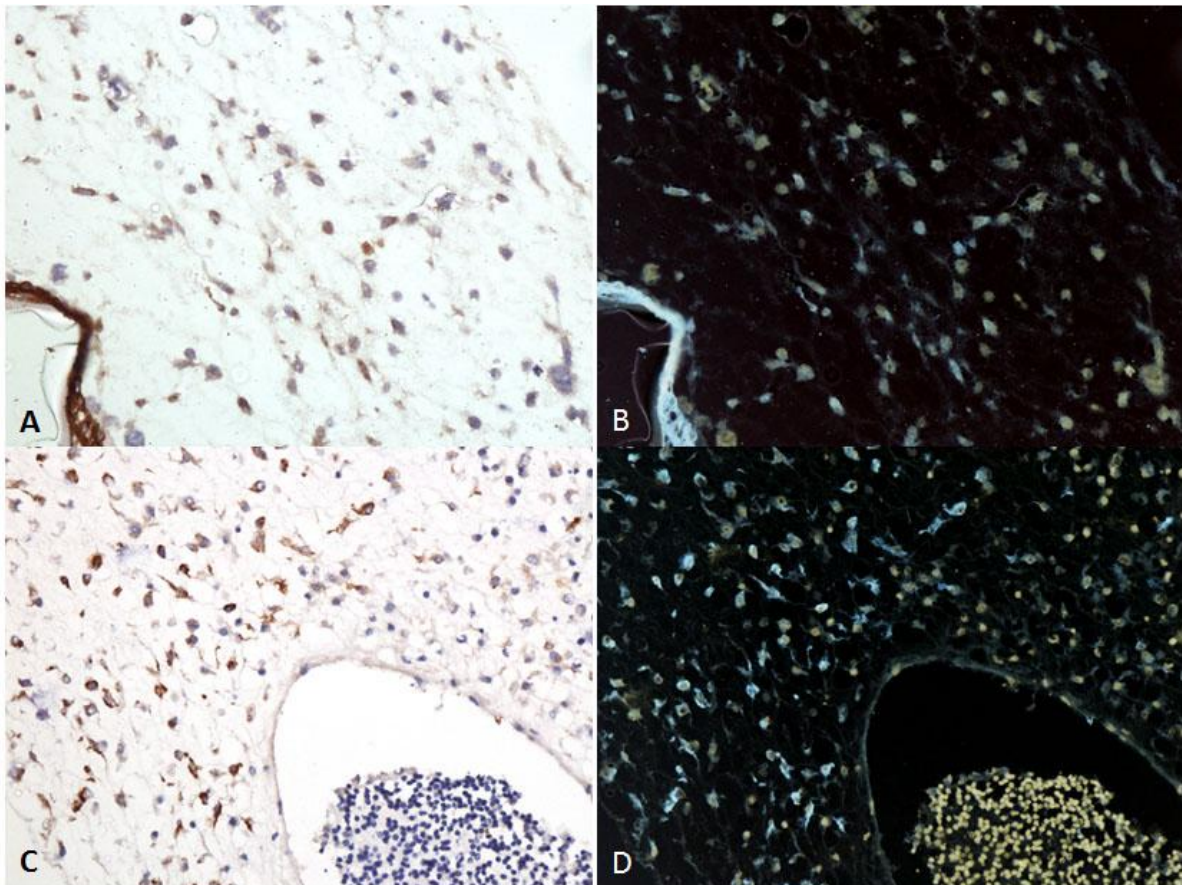


Fig.4.4. Carcinom mamar ductal invaziv, implant pe membrana corioalantoidă, ziua a 5-a. Celulele tumorale au fost puse în evidență cu pan-citokeratina AE1/AE3 (A, C, x400).

Intensitatea diferită de exprimare de către celulele tumorale a pan-citokeratinei se determina mai bine în imaginile inversate, variind de la slab în celulele solitare, la pronunțat la cele aranjate în cordoane (B, D).

În situația markerului HER2, implantarea tumorii pe membrana corioalantoidă a condus în majoritatea cazurilor la pierderea acestui receptor în noua ambianță (15



cazuri/68,2%), urmată în descreștere de cazurile HER2 stabil negative (5 cazuri/22,7%) și HER2 stabil pozitive (2 cazuri/9,1%). Citokeratina bazală CK5 s-a dovedit a fi cea mai predictivă în evoluție, prezentând expresie negativă până și după implantare în toate 22 cazuri. În urma comparării subtipului molecular al tumorii primare vs metastaza limfonodală am determinat 2 cazuri de transfer de la Luminal B/Ki67 la Luminal B/HER2/Ki67. Restul cazurilor nu au prezentat date concludente unui transfer de subtip. La compararea expresiei ER, PR, HER2 și CK5 din tumoarea primară cu celulele tumorale diseminate în implant am determinat schimbarea subtipului în 90,9% (20 cazuri), și anume în 12 cazuri (54,4%) celulele invadate au dezvoltat un fenotip mai diferențiat, caracteristic subtipului Luminal A, în 7 cazuri (31,8%) au prezentat caracteristici proprii subtipului 5NP și într-un caz (5,4%) s-a delimitat fenotipul HER2, deși tumoarea primară și metastaza au fost specificate ca Luminal B/HER2. Doar 2 cazuri, Luminal A și Luminal B/HER2 nu au suferit un transfer de subtip. Ținem să menționăm, că în studiu nu au fost cuantificate toate cazurile cu implant de metastază limfonodală. Această decizie a avut la bază mai mulți factori, și anume: 1. toți embrionii cu astfel de implante decedau în primele zile după implantare (maximal la a 3 zi); 2. prezența infiltratului limfocitar și/sau focarele de necroză masive au pus la îndoială veridicitatea rezultatelor imunohistochimice stabilite (Fig.4.5).

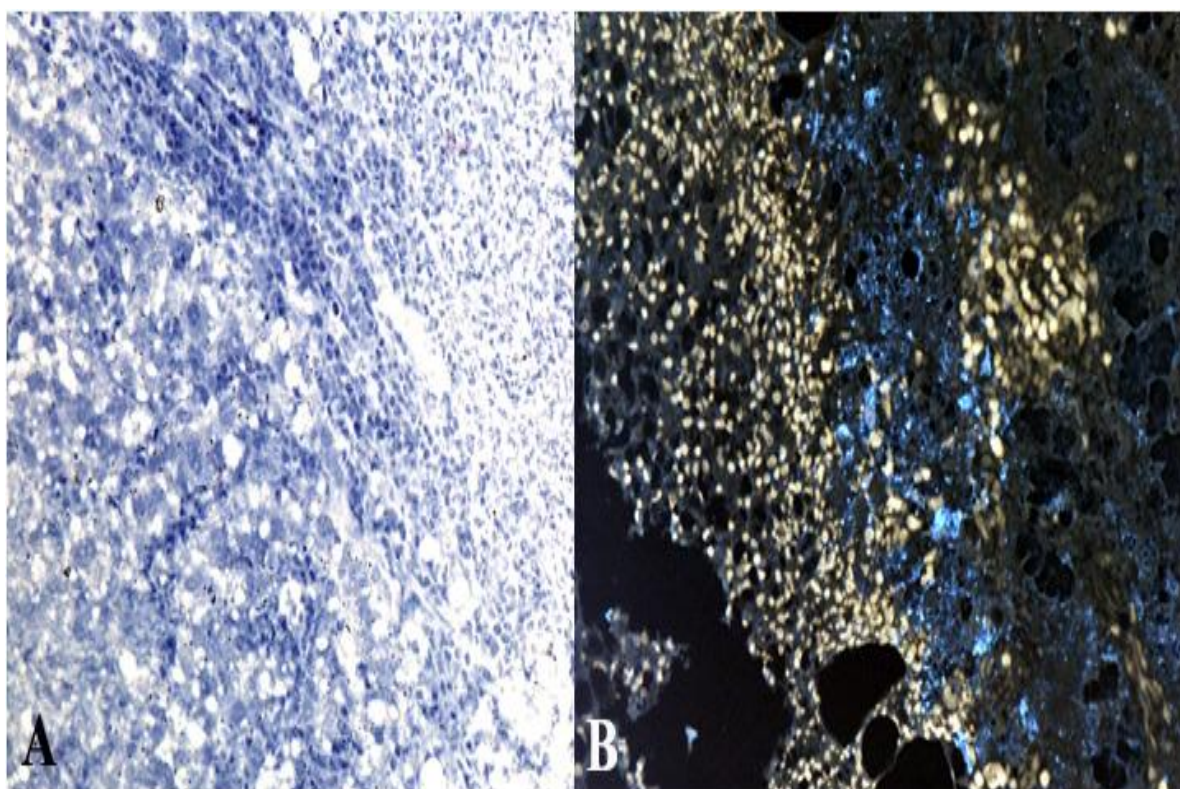


Fig.4.5. Implant de metastază limfonodală a unui carcinom mamar ductal invaziv de tip NOS, G3, HER2 pozitiv pe membrana corioalantoidă, ziua a 3-a (x40). În imaginea **A** se determină o masă de celule distruse, înconjurată de o bordură limfocitară densă. În imaginea **B**, prin inversare la hotar cu masa limfocitară se determină celule solitare, fragmente celulare DAB-pozitive care însă nu reflectă pattern-ul de colorare caracteristic markerului HER2.

## CONCLUZII GENERALE

1. Microambianța are o influență substanțială, imprevizibilă, stimulatorie sau inhibitorie în dezvoltarea tumorii. Schimbul profilului molecular la metastazare are valoare pronostică și predictivă – toate acestea argumentează necesitatea studiilor în domeniu (capitolul 1).
2. În glanda mamară neafectată celulele epitelului glandular prezintă o anumită garnitură de receptori în dependență de stadiul de diferențiere. Expresia receptorilor indică nivelul de origine al tumorii (capitolul 3.1).
3. Majoritatea tumorilor mamare derivă din celulele grupului Luminal de diferențiere. Toți markerii studiați (ER, PR, AR, HER2, CK5, EGFR, BCL2, p53, Ki67, E-cadherina) nu sunt stabili pe parcursul metastazării, ceea ce necesită revizuirea principiilor tratamentului personalizat (capitolele 3.2 – 3.9).
4. Transferurile de scor la metastazare a CK5, Ki67 și E-cadherinei sunt în funcție de tipul histologic al tumorii. Aceste date pot fi utilizate în calitate de criterii de diagnostic diferențial dintre tipurile ductale și lobulare de carcinoame invazive (capitolele 3.4, 3.5, 3.7).
5. Epiteliul glandular mamar antrenat în oncogeneză este predispus de a genera defecțiuni a mecanismelor apoptotice. Markerii apoptotici, BCL2 și p53 nu sunt stabili pe parcursul metastazării, iar transferurile de scor mai frecvent țin de pierderea expresiei în ambianța limfonodală (capitolul 3.6).
6. Relațiile statistice între markerii studiați a celulelor cu localizare primară și metastatică nu sunt identice. Aceasta indică că metastaza limfonodală are un fenotip imunohistochimic particular, ceea ce pledează pentru examinarea imunohistochimică concomitentă, obligatorie și a metastazei (capitolul 3.9).
7. În structura moleculară a carcinomului mamar invaziv numeric prevalează subtipurile Luminale. Toate subtipurile examinate sunt instabile la metastazare, iar întâietatea transferurilor o au tumorile activ proliferante (capitolul 4.1).
8. Instabilitatea fenotipului celular al carcinomului mamar a fost dovedită în majoritatea cazurilor de implant a celulelor tumorale în membrana corioalantoidă. Markerii analizați au evoluție diferită după implantare: ER și HER2 preponderent cu pierdere, PR stabil pozitiv, iar CK5 stabil negativ. Aceste date susțin necesitatea de a revedea schemele de tratament existente, cu includerea în algoritmul de diagnostic și a profilului molecular al metastazei (capitolul 4.2).

## RECOMANDĂRI

1. Propunem determinarea profilului molecular al metastazei limfonodale prin metode imunohistochimice, concomitent cu evaluarea tumorii primare. Întru evitarea unor erori tehnice recomandăm procesarea tumorii și metastazei într-un singur bloc, într-o singură secțiune.
2. De utilizat preferențial Ki67 în locul gradului de diferențiere drept marker al agresivității tumorale.
3. Determinarea E-cadherinei în calitate de marker specific al tumorilor lobulare nu are valoare diagnostică, grație existenței fenotipurilor E-cadherin pozitive și E-cadherin negative în ambele tipuri de tumori studiate, ductal și lobular invazive.
4. De rând cu subtipul molecular al tumorii trebuie de indicat și markerii în baza cărora acesta a fost definit. Astfel expresia CK5 de rând cu HER2 și/sau receptorii hormonalți ar evidenția necesitatea suplinirii schemelor terapeutice în conformitate cu recomandările existente pentru tumorile Triplu negative.
5. CK5 mai bine (80%) definește tumorile Triplu negative în comparație cu EGFR, a cărui incidență este de 50%.

## BIBLIOGRAFIE

1. Fulga V. Eterogenitatea tipurilor histologice a cancerului de sân: origini, cauze și aplicare practică. Chișinău.: Impresum, 2016, 178 p. ISBN 978-9975-3069-8-0.
2. Adamczyk A. et al. Expression of ER/PR/HER2, basal markers and adhesion molecules in primary breast cancer and in lymph nodes metastases: a comparative immunohistochemical analysis. In: Pol J Pathol. 2012, vol. 63, nr.4, p. 228-234.
3. Fulga V., Rudico L., Balica A-R. et al. Invasive ductal carcinoma of no special type and its corresponding lymph node metastasis: do they have the same immunophenotypic profile? In: Pol J Pathol. 2015, 66 (1), 30-37. PMID 26017877, ISSN 1233-9687.
4. Korsching E. Cytogenetic alterations and cytokeratin expression patterns in breast cancer: integrating a new model of breast differentiation into cytogenetic pathways of breast carcinogenesis. In: Lab Invest. 2002, vol. 82, nr. 11, p. 1525-33.
5. Helal T.E., Ibrahim E.A., Alloub A.I. Immunohistochemical analysis of tumor-infiltrating lymphocytes in breast carcinoma: relation to prognostic variables. Indian. In: J Pathol Microbiol. 2013, vol. 56, nr. 2, p. 89-93.
6. Muenst S. et al. The presence of programmed death 1 (PD-1)-positive tumor-infiltrating lymphocytes is associated with poor prognosis in human breast cancer. In: Breast Cancer Res Treat. 2013, vol. 139, nr. 3, p. 667-76.
7. Soliman H. Immunotherapy strategies in the treatment of breast cancer. In: Cancer Control. 2013, vol. 20, nr. 1, p. 17-21.
8. Allred D.C. et al. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. In: Mod Pathol. 1998, vol. 11, nr.2, p. 155-168.
9. Azoulay S. et al. KIT is highly expressed in adenoid cystic carcinoma of the breast, a basal-like carcinoma associated with a favorable outcome. In: Mod Pathol. 2005, vol.18, nr.12, p. 1623-31.
10. Callagy G.M. et al. Bcl-2 is a prognostic marker in breast cancer independently of the Nottingham Prognostic Index In: Clin Cancer Res, 2006, vol. 12, nr. 8, p. 2468–2475.
11. Ellis P. et al. WHO Classification of Tumours Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs, 2003, Lyon Press, Lyon.
12. Goldhirsch A. et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer. In: Ann Oncol. 2013, vol. 24, nr. 9, p. 2206-23.
13. Qureshi H.S. et al. E-Cadherin Status in Breast Cancer Correlates With Histologic Type but Does Not Correlate With Established Prognostic Parameters. In: Am J Clin Pathol. 2006, vol. 25, nr. 3, p. 377-85.
14. Suciuc C. et al. Semi-automated evaluation of Ki-67 index in invasive ductal carcinoma of the breast. In: Oncol Lett. 2014, vol. 7, nr. 1, p. 107-114.



15. Yamashita H. et al. Coexistence of HER2 over-expression and p53 protein accumulation is a strong prognostic molecular marker in breast cancer. In: *Breast Cancer Res.* 2004, vol. 6, nr. 1, p. R24-30.
16. Raica M., Cîmpean A.M., Ceausu R.A., Fulga V. et al. Hormone receptors and HER2 expression in primary breast carcinoma and corresponding lymph node metastasis: do we need both? In: *Anticancer Res.* 2014, 34(3), 1435-40. PMID 24596391, ISSN 0250-7005 (print) ISSN 1791-7530 (online).
17. Fulga V., David V., Rudico L. et al. Expresia estrogen receptorului ER $\alpha$  în dependență de tipul morfologic al carcinomului mamar. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale.* 2017, 2(54), p. 232-237. ISSN 1857-0011.
18. Fulga V. Expresia markerilor surogat ER, PR, Her2, CK5 și Ki67 în carcinomul mamar invaziv de tip NOS și metastazele limfonodale corespondente. În: *Moldovan Journal of Health Sciences. Revista de Științe ale Sănătății din Moldova.* 2014, nr.1, p. 5-14. ISSN 2345-1467.
19. Fulga V., Rudico L., Mazuru O. et al. Carcinomul mamar lobular invaziv: are componentă celulară omogenă? În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale.* 2015, 1(46), p. 99-102. ISSN 1857-0011.
20. David V., Fulga V., Rudico L. et al. Expresia EGFR vs CK5 în carcinomul mamar. În: *Culegere de articole științifice consacrată aniversării a 90-a de la nașterea ilustrului medic și savant Nicolae Testemițanu. Chișinău,* 2017, p. 79-84. ISBN 978-9975-82-063-9.
21. Fulga V., Mazuru O., David V. et al. Expression of CK5 basal cytokeratin in primary breast carcinoma. În: *Curierul medical.* 2015, 58(5), p. 19-23. ISSN 1857-0666.
22. Fulga V., Mazuru O., David V. et al. Stabilitatea citokeratinei bazale CK5 în procesul de metastazare a carcinomului mamar. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale.* 2016, 1(50), p. 180-183. ISSN 1857-0011.
23. Fulga V., Mazuru O., David V. et al. Activitatea proliferativă a carcinomului mamar ductal invaziv în funcție de expresia citokeratinei bazale CK5. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale.* 2016, 1(50), p. 184-187. ISSN 1857-0011.
24. Fulga V., Balica A-R., Cimpean A-M. et al. Expression of CK5 basal cytokeratin during metastatic development of breast carcinoma. In: *Research and Clinical Medicine.* 2016, 1(1), p. 15-21. ISSN 2360-1124, <http://www.resclinmed.eu/>.
25. David V., Fulga V., Rudico L. et al. Expresia EGFR în funcție de activitatea proliferativă a carcinomului mamar. În: *Culegere de articole științifice consacrată aniversării a 90-a de la nașterea ilustrului medic și savant Nicolae Testemițanu. Chișinău,* 2017, p. 85-90. ISBN 978-9975-82-063-9.
26. Fulga V., Mazuru O., David V. et al. Expresia markerului pro-apoptotic p53 în dependență de activitatea proliferativă a carcinomului mamar ductal invaziv. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale.* 2016, 1(50), p. 188-191. ISSN 1857-0011.
27. Fulga V., Rudico L., David V. et al. Evoluția markerului de proliferare Ki67 în procesul de metastazare a cancerului de sân. În: *Culegere de articole științifice consacrată aniversării a*

- 90-a de la nașterea ilustrului medic și savant Nicolae Testemițanu. Chișinău, 2017, p. 107-113. ISBN 978-9975-82-063-9.
28. Fulga V. p53 is unstable during metastatic development of the human breast cancer: a comparison between the primary tumor and lymph node metastasis. In: Research and Clinical Medicine. 2017, 1(2), 6-10. ISSN 2360-1124, <http://www.resclinmed.eu/>.
29. Fulga V., Mazuru O., Rudico L. et al. Carcinomul mamar ductal invaziv – viziune prin prisma apoptozei. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale. 2015, 1(46), p. 103-106. ISSN 1857-0011.
30. Fulga V. Expression of p53 in human breast cancer. In: Biological Markers in Fundamental and Applied Biology. Brno, Cehia, 2018, 1(4), p. 52-55. ISSN 2570-5911 (print). ISSN 2570-5903 (online). doi: 10.29256/v.01.04.2017.escbm18
31. Fulga V. BCL2 and p53: apoptosis markers of breast cancer in human. In: Biological Markers in Fundamental and Applied Biology. Brno, Cehia, 2018, 1(4), p. 5-6, ISSN 2570-5911 (print). ISSN 2570-5903 (online). doi: 10.29256/v.01.04.2017.escbm0.
32. Fulga V., Ceausu A-R., Cimpean A-M. et al. B-cell lymphoma-2 receptor in human primary breast and its lymph node metastases: more than a surrogate marker. The Moldovan Medical Journal. 2017, 60(1), p. 3-10. ISSN 2537-6373 (print), 2537-6381 (online), [www.moldmedjournal.md](http://www.moldmedjournal.md).
33. Fulga V. B-cell lymphoma-2 receptor expression in human breast cancer. In: Biological Markers in Fundamental and Applied Biology. Brno, Cehia, 2018, 1(3), p. 32-35. ISSN 2570-5911 (print), ISSN 2570-5903 (online). doi: 10.29256/01.03.2017.escbm11.
34. Fulga V., Rudico L., Balica A-R. et al. Differential expression of E-cadherin marker in primary breast cancer and correspondent lymph node metastasis. In: Anticancer Res. 2015, 35 (2), 759-765. PMID 25667455, ISSN 0250-7005 (print) ISSN 1791-7530 (online).
35. Fulga V. Evoluția E-cadherinei în procesul de metastazare al carcinomului mamar ductal invaziv de tip NOS. In: Al XV-lea simpozion Național de Morfologie Microscopică cu Participare internațională. Oradea-Băile Felix, Romania, 2017, p. 32-34.
36. Fulga V. Expresia E-cadherinei în funcție de gradul de diferențiere al carcinomului mamar lobular invaziv. In: Al XV-lea simpozion Național de Morfologie Microscopică cu Participare internațională, Oradea-Băile Felix, Romania, 2017, p. 27-29.
37. Fulga V., Mazuru V., David V. et al. Carcinomul mamar ductal invaziv fără tip histologic special: posedă oare o structură celulară omogenă? În: Moldovan Journal of Health Sciences. Revista de Științe ale Sănătății din Moldova. 2015, 1(3), p. 27-36. ISSN 2345-1467.
38. Fulga V., Mazuru V., David V. et al. Carcinomul mamar ductal invaziv fără tip histologic special: posedă oare o structură celulară omogenă? În: Moldovan Journal of Health Sciences. Revista de Științe ale Sănătății din Moldova. 2015, 1(3), p. 27-36. ISSN 2345-1467.

## Lista lucrărilor publicate la tema tezei

- **Monografii monoautor**

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 în reviste științifice internaționale cotate ISI-Thomson și SCOPUS**

2. Bujor I.S., Cioca A., Ceaușu R.A., **Fulga V.** et al. Evaluation of vascular proliferation in molecular subtypes of breast cancer. In: *In Vivo*. 2018, 32(1), 79-83. PMID: 29275302, ISSN 0258-851X (print), ISSN 1791-7549 (online). (**IF 0.832**).
3. **Fulga V.**, Rudico L., Balica A-R. et al. Invasive ductal carcinoma of no special type and its corresponding lymph node metastasis: do they have the same immunophenotypic profile? In: *Pol J Pathol*. 2015, 66 (1), 30-37. PMID 26017877, ISSN 1233-9687. (**IF 1.128**).
4. **Fulga V.**, Rudico L., Balica A-R. et al. Differential expression of E-cadherin marker in primary breast cancer and correspondent lymph node metastasis. In: *Anticancer Res*. 2015, 35 (2), 759-765. PMID 25667455, ISSN 0250-7005 (print) ISSN 1791-7530 (online). (**IF 1.872**).
5. Raica M., Cîmpean A.M., Ceausu R.A., **Fulga V.** et al. Hormone receptors and HER2 expression in primary breast carcinoma and corresponding lymph node metastasis: do we need both? In: *Anticancer Res*. 2014, 34(3), 1435-40. PMID 24596391, ISSN 0250-7005 (print) ISSN 1791-7530 (online). (**IF 1.872**).

- **Articole în reviste științifice din străinătate recunoscute**

6. Bujor I.S., Cioca A.R., Ceaușu R.A., **Fulga V.** The prognostic utility of Prox-1 expression in molecular subtypes of breast carcinomas In: *Medicine in evolution*. 2017, volume XXIII, nr. 3, p. 263-270. ISSN 2065-376X, <http://medicineinevolution.umft.ro/2017/rev32017final.pdf>.
7. **Fulga V.** p53 is unstable during metastatic development of the human breast cancer: a comparison between the primary tumor and lymph node metastasis. In: *Research and Clinical Medicine*. 2017, 1(2), 6-10. ISSN 2360-1124, <http://www.resclinmed.eu/>.
8. **Fulga V.**, Balica A-R., Cimpean A-M. et al. Expression of CK5 basal cytokeratin during metastatic development of breast carcinoma. In: *Research and Clinical Medicine*. 2016, 1(1), p. 15-21. ISSN 2360-1124, <http://www.resclinmed.eu/>.

- **Articole în revistele științifice din Registrul Național al revistelor de profil, cu indicarea categoriei:**

- **categoria B**

9. **Fulga V.**, Ceausu A-R, Cimpean A-M. et al. B-cell lymphoma-2 receptor in human primary breast and its lymph node metastases: more than a surrogate marker. *The Moldovan Medical Journal*. 2017, 60(1), p. 3-10. ISSN 2537-6373 (print), 2537-6381 (online), [www.moldmedjournal.md](http://www.moldmedjournal.md).
10. **Fulga V.**, David V., Rudico L. et al. Expresia estrogen receptorului ER $\alpha$  în dependență de tipul morfologic al carcinomului mamar. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale*. 2017, 2(54), p. 232-237. ISSN 1857-0011.
11. Rudico L., David V., **Fulga V.** et al. Relevanța D2-40 în determinarea invaziei limfatice vasculare. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale*. 2017, 2(54), p. 220-225. ISSN 1857-0011.
12. **Fulga V.**, Mazuru O., David V. et al. Expresia markerului pro-apoptotic p53 în dependență de activitatea proliferativă a carcinomului mamar ductal invaziv. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale*. 2016, 1(50), p. 188-191. ISSN 1857-0011.

13. **Fulga V.**, Mazuru O., David V. et al. Activitatea proliferativă a carcinomului mamar ductal invaziv în funcție de expresia citokeratinei bazale CK5. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale. 2016, 1(50), p. 184-187. ISSN 1857-0011.
14. **Fulga V.**, Mazuru O., David V. et al. Stabilitatea citokeratinei bazale CK5 în procesul de metastazare a carcinomului mamar. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale. 2016, 1(50), p. 180-183. ISSN 1857-0011.
15. **Fulga V.**, Mazuru O., David V. et al. Expression of CK5 basal cytokeratin in primary breast carcinoma. În: Curierul medical. 2015, 58(5), p. 19-23. ISSN 1857-0666.
16. **Fulga V.** Epidemiologia chimiorezistenței în terapia cancerului mamar. În: Curierul medical. 2015, 58(3), p. 54-57. ISSN 1857-0666.
17. **Fulga V.**, Mazuru O., Rudico L. et al. Carcinomul mamar ductal invaziv – viziune prin prisma apoptozei. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale. 2015, 1(46), p. 103-106. ISSN 1857-0011.
18. **Fulga V.**, Rudico L., Mazuru O. et al. Carcinomul mamar lobular invaziv: are componență celulară omogenă? În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale. 2015, 1(46), p. 99-102. ISSN 1857-0011.
19. Rudico L., **Fulga V.**, Mazuru V. et al. Podoplanina – factor molecular diagnostic și predictive în carcinoamele mamare invazive și în alte neoplazii umane solide. În: Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale. 2015, 1(46), p. 30-33. ISSN 1857-0011.
20. **Fulga V.** Carcinomul mamar: conceptele moleculare de structură și patogenie. În: Curierul medical. 2015, 58(1), p. 60-68. ISSN 1857-0666.
21. **Fulga V.** Tratatamentul personalizat în carcinomul mamar. În: Curierul medical. 2014, 57(5), p. 73-76. ISSN 1857-0666.

- **categoria C**

22. **Fulga V.**, David V., Mazuru V. et al. Evoluția markerului BCL2 în funcție de activitatea proliferantă al carcinomului mamar ductal invaziv. În: Arta Medica. 2016, 3(60), p.73-74. ISSN 1810-1852.
23. **Fulga V.**, David V., Mazuru O. et al. Expresia receptorilor hormonală în carcinomul mamar. În: Arta Medica. 2016, 3(60), p. 72-73. ISSN 1810-1852.
24. **Fulga V.**, David V., Mazuru V. et al. Evoluția markerului HER2 în procesul metastatic al carcinomului mamar ductal invaziv. În: Arta Medica. 2016, 3(60), p. 71-72. ISSN 1810-1852.

• **Articole în reviste aflate în proces de acreditare**

25. **Fulga V.**, Mazuru V., David V. et al. Carcinomul mamar ductal invaziv fără tip histologic special: posedă oare o structură celulară omogenă? În: Moldovan Journal of Health Sciences. Revista de Științe ale Sănătății din Moldova. 2015, 1(3), p. 27-36. ISSN 2345-1467.
26. **Fulga V.** Expresia markerilor surogat ER, PR, Her2, CK5 și Ki67 în carcinomul mamar invaziv de tip NOS și metastazele limfonodale corespondente. În: Moldovan Journal of Health Sciences. Revista de Științe ale Sănătății din Moldova. 2014, nr.1, p. 5-14. ISSN 2345-1467.

• **Articole în culegeri științifice internaționale**

27. **Fulga V.** Expression of p53 in human breast cancer. In: Biological Markers in Fundamental and Applied Biology. Brno, Cehia, 2018, 1(4), p. 52-55. ISSN 2570-5911 (print). ISSN 2570-5903 (online). doi: 10.29256/v.01.04.2017.escbm18.

28. **Fulga V.** BCL2 and p53: apoptosis markers of breast cancer in human. In: Biological Markers in Fundamental and Applied Biology. Brno, Cehia, 2018, 1(4), p. 5-6, ISSN 2570-5911 (print). ISSN 2570-5903 (online). doi: 10.29256/v.01.04.2017.escbm01.
  29. **Fulga V.** B-cell lymphoma-2 receptor expression in human breast cancer. In: Biological Markers in Fundamental and Applied Biology. Brno, Cehia, 2018, 1(3), p. 32-35. ISSN 2570-5911 (print), ISSN 2570-5903 (online). doi: 10.29256/01.03.2017.escbm11.
  30. Rudico L., **Fulga V.**, Mazuru O. et al. Role of WNT-signaling pathway in embryonic development of mammary gland. В: Науковий Висник. Київ, Україна, 2015, 217/1, p. 244-248. ISSN 2222-8608.
  31. **Fulga V.**, Mazuru O., David V. et al. Recent achievements in molecular diagnosis of the breast carcinoma. В: Науковий Висник. Київ, Україна, 2015, 217/1, p. 224-234. ISSN 2222-8608. УДК 619:616–07:616–006.6:611.69.
  32. **Fulga V.**, Mazuru O., David V. et al. Impact of conventional morphological diagnosis upon the prognosis and the therapy of invasive breast carcinoma. В: Науковий Висник. Київ, Україна, 2015, 217/1, p. 217-224. ISSN 2222-8608.
- **Articole în culegeri științifice naționale**
  - 33. Rudico L., David V., **Fulga V.** et al. Limfangiogeneza tumorală versus gradul histologic de diferențiere în carcinomul mamar. În: Culegere de articole științifice consacrată aniversării a 90-a de la nașterea ilustrului medic și savant Nicolae Testemițanu. Chișinău, 2017, p. 275-278. ISBN 978-9975-82-063-9.
  - 34. **Fulga V.**, Rudico L., David V. et al. Evoluția markerului de proliferare Ki67 în procesul de metastazare a cancerului de sân. În: Culegere de articole științifice consacrată aniversării a 90-a de la nașterea ilustrului medic și savant Nicolae Testemițanu. Chișinău, 2017, p. 107-113. ISBN 978-9975-82-063-9.
  - 35. David V., **Fulga V.**, Rudico L. et al. Expresia EGFR în funcție de activitatea proliferativă a carcinomului mamar. În: Culegere de articole științifice consacrată aniversării a 90-a de la nașterea ilustrului medic și savant Nicolae Testemițanu. Chișinău, 2017, p. 85-90. ISBN 978-9975-82-063-9.
  - 36. David V., **Fulga V.**, Rudico L. et al. Expresia EGFR vs CK5 în carcinomul mamar. În: Culegere de articole științifice consacrată aniversării a 90-a de la nașterea ilustrului medic și savant Nicolae Testemițanu. Chișinău, 2017, p. 79-84. ISBN 978-9975-82-063-9.
- **Articole în materialele congreselor, conferințelor, simpoziunelor științifice naționale cu participare internațională**
  - 37. **Fulga V.**, Rudico L., Mazuru V. et al. Carcinomul mamar invaziv – evoluția receptorului factorului de creștere epidermală în procesul metastatic. În: Conferința Științifică Internațională dedicată celor 70 de ani de la fondarea USMF “Nicolae Testemițanu”. Probleme actuale ale morfologiei. Chișinău, 2015, p. 41-47. ISSN 978-9975-57-194-4.
  - 38. Rudico L., **Fulga V.**, Mazuru O. et al. Suportul factorilor moleculari în dezvoltarea glandei mamare. În: Probleme actuale ale morfologiei. Conferința Științifică Internațională dedicată celor 70 de ani de la fondarea USMF “Nicolae Testemițanu”. Chișinău, 2015, p. 93-96. ISSN 978-9975-57-194-4.
- **Teze în materialele congreselor, conferințelor, simpoziunelor științifice internaționale (peste hotare)**
  - 39. **Fulga V.** Evoluția E-cadherinei în procesul de metastazare al carcinomului mamar ductal invaziv de tip NOS. In: Al XV-lea simpozion Național de Morfologie Microscopică cu Participare internațională. Oradea-Băile Felix, Romania, 2017, p. 32-34.

40. **Fulga V.** Expresia E-cadherinei în funcție de prezența citokeratinei bazale CK5 în carcinomul mamar ductal invaziv. In: Al XV-lea simpozion Național de Morfologie Microscopică cu Participare internațională. Oradea-Băile Felix, Romania, 2017, p. 30-31.
  41. **Fulga V.** Expresia E-cadherinei în funcție de gradul de diferențiere al carcinomului mamar lobular invaziv. In: Al XV-lea simpozion Național de Morfologie Microscopică cu Participare internațională, Oradea-Băile Felix, Romania, 2017, p. 27-29.
  42. Rudico L., **Fulga V.**, Mazuru O. et al. Lymphatic microvascular density in different molecular subtypes of invasive breast carcinoma. In: II Scientific Conference „Fundamental and clinical medicine”. Kyiv, Ukraine, 2015, p. 9-10.
  43. **Fulga V.**, Rudico L., Mazuru V. et al.. E-cadherin expression – does it is stable through tumor progression?. In: II Scientific Conference „Fundamental and clinical medicine”. Kyiv, Ukraine, 2015, p. 8-9.
  44. **Fulga V.**, Rudico L., Mazuru O., David V., Mazuru V. Saptefrati L. BCL2 receptor – a controversial marker in invasive breast carcinoma. In: II Scientific Conference „Fundamental and clinical medicine”. Kyiv, Ukraine, 2015, p. 7.
  45. **Fulga V.**, Mazuru V., David V. et al. Invasive breast carcinoma of no special type: primary tumor versus lymph node metastases. În: Al XIII-lea Simpozion Național de Morfologie Microscopică cu Participare Internațională. 2015, Craiova, Romania, p.65-66. ISBN 978-606-11-4705-2.
  46. **Fulga V.**, Mazuru V., David V. et al. Luminal B molecular subtype of breast carcinoma: does it have homogenous cell structure? În: Al XIII-lea Simpozion Național de Morfologie Microscopică cu Participare Internațională. Craiova, Romania, 2015, p.63-64. ISBN 978-606-11-4705-2.
  47. **Fulga V.**, Mazuru V., David V. et al. Cellular proliferation activity of the breast carcinoma of no special type during metastatic process. În: Al XIII-lea Simpozion Național de Morfologie Microscopică cu Participare Internațională. Craiova, Romania, 2015, p.61-62. ISBN 978-606-11-4705-2.
  48. Rudico L., **Fulga V.** Features of tumor-derived lymphangiogenesis in different molecular subtypes of primary breast carcinoma. In: Euroregional Conference for PhD Students and Young Researchers in Biomedicine. Timisoara, Romania, 2015, p. 25. ISBN 978-606-8456-23-2.
  49. Raica M., Cimpean A-M., **Fulga V.** Primary breast cancer and corresponding axillary lymph node metastases: do they have the same molecular profile? In: Abstracts of the ninth international conference of anticancer research. Anticancer Res. Sithonia, Greece, 2014, 34, p. 6126.
- **Teze în materialele congreselor, conferințelor, simpozioanelor științifice naționale**
50. **Fulga V.** Expresia receptorilor pentru estrogen și progesteron în carcinomul mamar ductal invaziv. În: Conferința științifică anuală a colaboratorilor și studenților: culegere de rezumate științifice. IP USMF „Nicolae Testemițanu”. 2014, Chișinău, p. 50.
  51. **Fulga V.** Incidența subtipurilor moleculare în carcinomul mamar ductal invaziv. În: Conferința științifică anuală a colaboratorilor și studenților: culegere de rezumate științifice. IP USMF „Nicolae Testemițanu”. Chișinău, 2014, p. 51.

## ADNOTARE

Fulga Veaceslav

### “Profilul molecular al carcinoamelor mamare invazive versus metastazele limfonodale corespondente”

Teză de doctor habilitat în științe medicale, Chișinău, 2018

**Structura tezei:** introducere, 5 capitole, concluzii generale, recomandări, 280 surse bibliografice, 133 pagini de text de bază, 57 figuri, 70 tabele, 11 anexe. Rezultatele acestui studiu au fost reflectate în 51 lucrări științifice, inclusiv o monografie.

**Cuvinte-cheie:** carcinom mamar, markeri hormonal, HER2, CK5, EGFR, p53, BCL2, E-cadherin, subtipuri moleculare, metastaze limfonodale.

**Domeniul de studiu:** anatomie patologică.

**Scopul lucrării:** Studiul profilului molecular al carcinoamelor mamare invazive de tip ductal și lobular comparativ cu metastazele limfonodale axilare ipsilaterale, și evaluarea stabilității subtipurii moleculare în procesul de metastazare.

**Obiectivele lucrării:** Determinarea fenotipului molecular al tumorii în funcție de tipul și gradul histologic, statusul limfonodal, precum și evaluarea dinamicii receptorilor ER, PR, AR, HER2, CK5, EGFR, p53, BCL2 și E-cadherin în procesul de metastazare al carcinomului mamar.

**Noutatea și originalitatea științifică:** Pentru prima dată s-a demonstrat instabilitatea markerilor ER, PR, AR, HER2, CK5, EGFR, p53, BCL2 și E-cadherin în procesul de metastazare a carcinoamelor mamare ductal invaziv de tip NOS și lobular infiltrativ. Am stabilit în premieră că metastaza limfonodală are un fenotip imunohistochimic particular, diferit de tumoarea primară, ceea ce creează premise pentru reevaluarea concepțiilor contemporane de tratament.

**Importanța teoretică și aplicativă a lucrării:** Rezultatele acestui studiu pledează pentru examinarea imunohistochimică concomitentă a tumorii primare și metastazei în vederea stabilirii unui diagnostic și tratament personalizat.

**Implementarea rezultatelor științifice:** Rezultatele acestui studiu au fost aprobate ca valoare științifică și aplicativă pentru activitatea catedrelor și laboratoarelor de histologie, anatomie patologică și oncologie.

## РЕЗЮМЕ

Фулга Вячеслав

### “Молекулярный профиль инвазивных форм рака молочной железы в сравнение с соответствующими метастазами лимфоузлов”

Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук,  
Кишинев, 2018

**Структура диссертации:** Введение, 5 глав, общие выводы, рекомендации, 280 библиографических источников, 133 страниц основного текста, 57 рисунков, 70 таблиц, 11 приложений. Результаты исследования опубликованы в 51 научных работ, в том числе одна монография.

**Ключевые слова:** рак молочной железы, гормональные маркеры, HER2, CK5, EGFR, p53, BCL2, E-cadherin, молекулярные подвиды, метастазы лимфоузлов.

**Область исследования:** патологическая анатомия.

**Цель исследования:** Изучение молекулярного профиля проточного и долькового раков молочной железы в сравнение с ипсилатеральными метастазами подмышечных лимфоузлов, а также оценка стабильности молекулярного подвида в процессе метастазирования.

**Задачи исследования:** Определение молекулярного фенотипа опухоли в зависимости от вида и степени злокачественности, состояния лимфоузлов, а также оценка динамики рецепторов ER, PR, AR, HER2, CK5, EGFR, p53, BCL2 и E-cadherin в процессе метастазирования рака молочной железы.

**Новизна и оригинальность исследования.** Впервые была доказана нестабильность маркеров ER, PR, AR, HER2, CK5, EGFR, p53, BCL2 и E-cadherin в процессе метастазирования проточного и долькового раков молочной железы. Было доказано, что метастазы лимфоузлов обладают особенным иммуногистохимическим фенотипом, отличающимся от первичной опухоли, тем самым способствуя необходимости переоценки современных концепций лечения.

**Практическая значимость:** Результаты данного исследования подчеркивают необходимость сопутствующего иммуногистохимического анализа первичной опухоли и метастазов в виду персонализирования диагностики и лечения.

**Внедрение результатов:** Полученные результаты оценены как научно-практически значимые и могут быть внедрены в деятельность гистологических, патологоанатомических, онкологических кафедр и лабораторий.



## ANNOTATION

Fulga Veaceslav

**“The molecular profile of invasive breast carcinomas versus correspondent lymph node metastases”**

**Thesis of Doctor of Medical Science, Chisinau, 2018**

**Thesis structure:** Introduction, 5 chapters, general conclusions, recommendations, bibliography of 280 titles, 133 pages of main text, 57 figures, 70 tables, 11 annexes. Obtained results are published in 51 scientific papers, including one monograph.

**Keywords:** mammary carcinoma, hormonal markers, HER2, CK5, EGFR, p53, BCL2, E-cadherin, molecular subtypes, lymph node metastases.

**Field of study:** Pathology.

**Purpose of study:** Evaluation of molecular profile of ductal and lobular invasive mammary carcinomas in comparison with ipsilateral lymph node metastases, as well evaluation of molecular subtypes' stability during metastatic process.

**Objectives:** Tumor's molecular phenotype assessment in relation to histological grade and type, lymph nodes involvement, as well evaluation of ER, PR, AR, HER2, CK5, EGFR, p53, BCL2 and E-cadherin stability during metastatic development of breast carcinoma.

**Scientific innovation:** For the first time was demonstrated the instability of ER, PR, AR, HER2, CK5, EGFR, p53, BCL2 and E-cadherin markers during metastatic development of ductal type NOS and lobular invasive carcinomas. We set it up for the first time that lymph node metastasis has a particular immunohistochemical phenotype, distinct from primary tumor, which arguments the revaluation necessity of modern concepts of treatment.

**Theoretical significance and applied value of the work:** The results of present work support the necessity of simultaneous immunohistochemical examination of primary tumor and metastasis, in reason of a personalized diagnostic and treatment evaluation.

**Implementation of scientific results:** The obtained results were approved to have a scientific and practical value for histological, pathological, oncological departments' and laboratories' activity.

**FULGA VEACESLAV**

**PROFILUL MOLECULAR AL CARCINOAMELOR MAMARE INVAZIVE  
VERSUS METASTAZELE LIMFONODALE CORESPONDENTE**

**311.02 – Anatomie patologică**

Autoreferatul tezei de doctor habilitat în științe medicale

---

Aprobat spre tipar: 12.12.2018

Hârtie ofset. Tipar ofset.

Coli de tipar: 2,5

Formatul hârtiei 60x80 1/16

Tiraj 50 ex.

Comanda nr. 201

---

Tipografia – PRINT-CARO SRL  
m. Chisinau, str. Astronom N. Donici, 14