

KORELACIJA EKSPRESIJE P53 TUMOR SUPRESOR GENA SA MAKROSKOPSKOM MANIFESTACIJOM I NAČINOM RASTA KOLOREKTALNIH KARCINOMA

Dušica Petrović¹, Vesna Stanković², Miloš Milosavljević¹ i Vladimir Bulatović¹

Karcinom debelog creva jedan je od najčešćih malignih tumora i drugi po redu uzročnik smrti od karcinoma u razvijenim zemljama.

Cilj istraživanja bio je ispitivanje ekspresije p53 kod kolorektalnog karcinoma kao i komparacija nivoa ekspresije p53 sa makroskopskim izgledom i načinom rasta tumora, zatim detekcija i identifikacija nivoa ekspresije p53 kao značajnog prognostičkog faktora daljeg toka, ishoda bolesti i podatka za izbor adekvatne terapije.

Istraživanje je urađeno kao prospektivna, kliničko-eksperimentalna studija. Korišćen je postoperativni materijal dobijen resekcijom kolorektalnog karcinoma od 63 bolesnika oba pola.

Dobijeni rezultati su pokazali da se najveći broj tumora, 36/63, tj. 57.1%, manifestovao u vidu infiltrativne forme, 9/63, tj. 14.3% kao ulcerišuća forma, a 18/63, tj. 28.6% tumora imalo je polipoidni – egzofitičan izgled.

Rezultati su pokazali da je tri tumora infiltrativne forme bilo p53 negativno a 17 ih je bilo p53 pozitivno. Kod tumora ulcerišuće forme 8 je bilo p53 negativno, a 16 je bilo pozitivnih p53 tumora. Kod tumora vegetativne forme, četiri je bilo p53 negativno, a 15 tumora bilo je p53 pozitivno.

pozitivan p53 status bio je u 52,4% tumora. Ekspresija p53 izostala je u 47,6% tumora i ne korelira sa patohistološkim karakteristikama tumora. Nivo ekspresije p53 nema dijagnostički, prediktivni i prognostički potencijal, dok je neosporna njegova važnost u razumevanju onkogeneze. *Acta Medica Medianae 2011;50(3):22-26.*

Ključne reči: kolorektalni karcinom, p53, korelacija, makroskopski izgled, način rasta

Centar za patološko - anatomsku dijagnostiku, Klinički centar
Kragujevac, Srbija¹
Univerzitet u Kragujevcu, Medicinski fakultet, Kragujevac, Srbija²

Contact: Dušica Petrović
Centar za patološko-anatomsku dijagnostiku
Klinički centar Kragujevac
Zmaj Jovina 30, 34000 Kragujevac, Srbija
E-mail: dusica@euro-net.org

Uvod

Karcinom debelog creva jedan je od najčešćih malignih tumora i drugi po redu uzročnik smrti od karcinoma u razvijenim zemljama (1).

Procesi deobe, diferencijacije i smrti ćelije strogo su kontrolisani, a poremećaj u regulaciji bilo kog od njih uzrokuje nastanak klonalnih ćelija koji se autohtono, nesvršishodno razmnožava i produkuje tumorsku masu. Nastanak tumora je kompleksan proces u koji su uključeni mnogobrojni genetski i molekularni mehanizmi. Kancerogeneza je posledica akumulacije poremećaja u građi i funkciji gena koji regulišu mehanizme proliferacije ćelije, reparacije DNK molekula ili programirane smrti ćelija. Ti geni su: onkogeni, tumor supresor geni, geni koji su matrica za sintezu enzima reparatornog sistema, kao i geni koji kontrolišu apoptozu (2).

Osnovna uloga tumor supresor gena je zaustavljanje ćelijskog ciklusa, a u cilju reparacije grešaka u građi DNA molekula (3). Mutacija i inaktivacija tumor supresor gena rezultuje nekontrolisanom ćelijskom deobom i blokadom programirane ćelijske smrti - apoptoze. Nasleđuju se recesivno i njihova ekspresija nastaje nakon inaktivacije oba alela.

Gen p53 je najčešći mutirani gen u tumorima, lokalizovan je na 17 hromozomu, kodira p53 transkriptivni faktor koji reguliše ćelijski ciklus aktivacijom transkripcije gena koji isti zaustavljaju u G1 fazi ćelijskog ciklusa (kada je genom oštećen) i aktivira apoptozu pod određenim uslovima (4,5,6). Geni koje aktivira transkriptivni faktor p53 su WAF1 (kontroliše ćelijski ciklus), MDM2 (inhibira ekspresiju p53), GADD45 (kontroliše popravku DNA), Bax (kontroliše apoptozu) ciklin G, a oni koje inhibira su myc i bcl-2.

Osnovne funkcije p53 su učesće u reparaciji DNA molekula (ispravljanje grešaka u toku duplikacije genetskog materijala), kao i kontrolisanje ćelijskog ciklusa, proliferacije i diferencijacije. Takođe, kada dođe do akumulacije genetskih grešaka, p53 omogućava apoptozu, zbog čega je poznat pod nazivom "čuvar ćelijskog genoma".

Podaci koji su dobijeni kao rezultat različitih kliničkih i bazičnih studija sugerišu da oštećenje

ili mutacija p53 dovodi do genetske amplifikacije p53 i gubitka kontrole ćelijskog ciklusa i apoptoze. Nivo ovih promena odražavao je stepen nepovoljne prognoze kod obolelih, samim tim što su tumori sa hiperekspresijom p53 pokazali rezistenciju na radijaciju i većinu hemioterapeutika (7).

Cilj ovog istraživanja bio je utvrđivanje moguće povezanosti morfoloških parametara i nivoa ekspresije p53 i utvrđivanje mogućeg prognostičkog značaja te korelacije. U skladu sa osnovnim ciljem postavljeni su sledeći konkretni zadaci:

1. Ispitivanje ekspresije p53 na operativnom materijalu - reseciranom segmentu bolesnika sa kolorektalnim karcinomom.
2. Povezanost ekspresije p53 i makroskopske manifestacije tumora i načina rasta tumora.
3. Detekcija i identifikacija nivoa ekspresiranosti p53 tumor supresor gena kao značajnog prognostičkog faktora daljeg toka i ishoda bolesti i podatka za izbor adekvatne, optimalne, ciljane, individualne antitumorske terapije.

Materijal i metode

Istraživanje je urađeno kao prospektivna, kliničko-eksperimentalna studija. Korišćen je postoperativni materijal dobijen resekcijom kolorektalnog tumora od 63 bolesnika oba pola, sa Hirurške klinike Kliničkog centra u Kragujevcu. U cilju dobijanja što više relevantnih patohistoloških podataka korišćene su rutinska Hematoksilin-Eozin (HE) metoda i imunohistohemijske metode obavljene u Centru za patološko-anatomsku dijagnostiku KC „Kragujevac“ u Kragujevcu.

U rutinskoj obradi preparata, uzorci tkiva fiksirani su u 4% neutralnom puferisanom rastvoru formalina, u toku 24h, na sobnoj temperaturi. Po završenoj fiksaciji, dehidratirani su provođenjem kroz seriju alkohola rastuće koncentracije (70%, 96% i 100%), prosvetljavani u ksilolu i kalupljeni u parafin. Preseci tkiva, debljine 4 µm, sečeni su mikrotomima Leica SM 2000R i Leica Reinhart Austria.

Posle deparafinisanja u ksilolu i hidratacije u opadajućem redu alkohola, isecci su bojeni Haematoxylin-om po Mayer-u, prosvetljavani u 2% rastvoru eozina, zatim dehidratirani, prosvetljavani i montirani na pločice sa Canada balzomom (8-10).

Imunohistohemijske metode korišćene su za identifikaciju ekspresije antigena na resekatu kolorektalnog karcinoma. Procedura imunohistohemijskog bojenja podrazumevala je postupke demaskiranja antigena, blokiranja endogene peroksidaze, inkubiranja preparata sa primarnim antiserumom i postupak izvođenja imunohistohemijske metode - LSAB+ - HRP (11).

Za detekciju p53 primenjeno je monoklonalno mišje antitelo (p53 DAKO DO-7 monoclonal mouse clone, 1:200) i visoko senzitivna specifična streptavidin - biotin imunohistohemijska

metoda (LSAB+/HRP, DAKO, Denmark), u kojoj je streptavidin obeležen peroksidazom a kao hromogen je korišćen 1,3 - diaminobenzidin. Kao opšti rastvarač antiseruma i sredstvo za ispiranje između različitih koraka u toku imunohistohemijske procedure bojenja korišćen je 0,1M fosfatni pufer pH 7,4. Ćelijska jedra su bojena Mayer-ovim hematoksilinom.

Cut off je izabrana vrednost praga za razlikovanje pozitivne i negativne ekspresije p53. Cut off u ovoj studiji za procenu pozitivnosti je 30% (ocena pozitivne ekspresije je ako više od 30% tumorskih ćelija pokazuje imunoreaktivnost na p53). Skoring sistem se zasniva na određivanju procenta imunoreaktivnih jedara tumorskih ćelija kao i na određivanju intenziteta imunoreaktivnog bojenja. Sabiranjem boda za procenat imunoreaktivnosti i za intenzitet dobija se ukupni, mogući maksimalni bod za procenu ekspresije (Tabela 1).

Tabela 1. Ukupni, mogući maksimalni bod za procenu ekspresije

% IMUNOREAKTIVNIH JEDARA	INTENZITET IMUNOREAKTIVNOG BOJENJA
0 = < 5% jedarnog bojenja	0 = nema jedarnog bojenja
1 = 5 do 30% obojenih jedara	1 = slab intenzitet bojenja jedara
2 = 30 do 50% obojenih jedara	2 = umeren intenzitet bojenja jedara
3 = 50 do 70% obojenih jedara	3 = veoma intenzivno bojenje
4 = 70 do 90% obojenih jedara	
5 > 90% obojenih jedara	

Imunohistohemijska bojenja izvedena su uz kontrolu kvaliteta i specifičnosti bojenja, primenom pozitivnih i negativnih kontrola prema propozicijama UK NEQAS (engl. UK National External Quality Assessment for Immunocytochemistry). Za statističku obradu podataka korišćen je programski paket SPSS i metode deskriptivne statistike (frekvencije, procenti, medijane, percentili). Ispitivanje zavisnosti dve opisne promenljive realizovana je pomoću Hi-kvadrat testa i Fišerovog testa. Ispitivanje uticaja više promenljivih na binarnu promenljivu urađeno je pomoću multi-varijante binarne logističke regresije.

Rezultati

Nuklearna ekspresija p53 prisutna je bila u 33/63, tj. 52.4% (ocena pozitivnosti više od 30% tumorskih ćelija pokazuje imunoreaktivnost na p53). U 30/63, tj. 47.6%, nije bilo ekspresije p53 (Tabela 2).

Najveći broj tumora 36/63, tj. 57.1%, manifestovao se u vidu infiltrativne forme, 9/63, tj. 14.3%, kao ulcerišuća forma, a 18/63, tj. 28.6% tumora, imalo je polipoidni - egzofitičan izgled (Tabela 3).

Rezultati su pokazali da je 3 tumora infiltrativne forme bilo p53 negativno a 17 ih je bilo p53 pozitivno. Kod tumora ulcerišuće forme 8 je bilo p53 negativno, a 16 je bilo pozitivnih p53 tumora. Kod tumora vegetativne forme 4 je bilo p53 negativno, a 15 tumora bilo je p53 pozitivno (Tabela 4).

Makroskopska manifestacija tumora i p53 su nezavisni ($p = 0,104$).

U cilju dobijanja pouzdanih parametara koji bi ispitali različite parametre koji bi mogli da utiču na ekspresiju p53 urađena je binarna logistička regresija.

Prikazani rezultati pokazali su da p53 ne zavisi ni od jednog kliničkog i patohistološkog parametra (Slika 1-4).

Tabela 2. Ekspresija p53

Ekspresija P53_30	Učestalost	Procenat (%)
Prisutna	33	52,4
Nije prisutna	30	47,6
Ukupno	63	100,0

Tabela 3. Makroskopska manifestacija tumora

Makroskopska manifestacija tumora	Učestalost	Procenat (%)
Vegetantna	18	28,6
Ulcerišuća	9	14,3
Infiltrativna	36	57,1
Ukupno	63	100,0

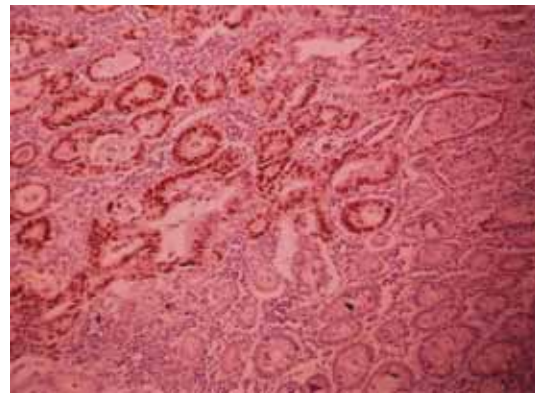
Tabela 4. Korelacija makroskopske manifestacije tumora i p53

Makroskopska manifestacija tumora	P53-	P53+	Procenat (%) -	Procenat (%) +
Vegetantna forma	4	15	21.05	78.95
Ulcerišuća forma	8	16	33.33	66.67
Infiltrativna forma	3	17	15	85

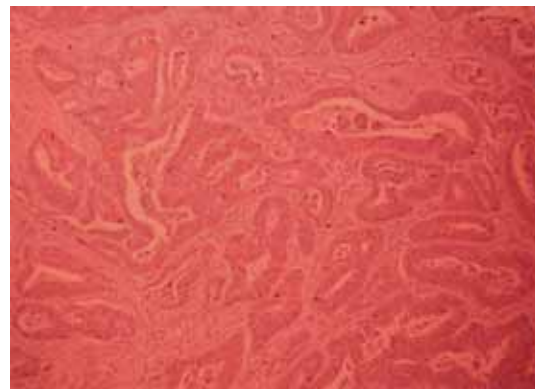
Diskusija

Kolorektalni karcinom (KRK) predstavlja jedan od najčešćih uzroka morbiditeta i mortaliteta kako u zapadnom svetu tako i na našim prostorima. Klasifikacije i ustanovljeni prognostički parametri koji se danas koriste u terapiji KRK još uvek samo delimično obezbeđuju informacije o toku i ishodu ove bolesti, tako da postoji stalna potreba za unapređenjem postojećih i identifikacijom novih dijagnostičkih i prognostičkih markera. U tom smislu, posebno je važna identifikacija molekularnih markera koji bi pružili uvid u potencijalno ponašanje ili agresivnost tumora (12-14).

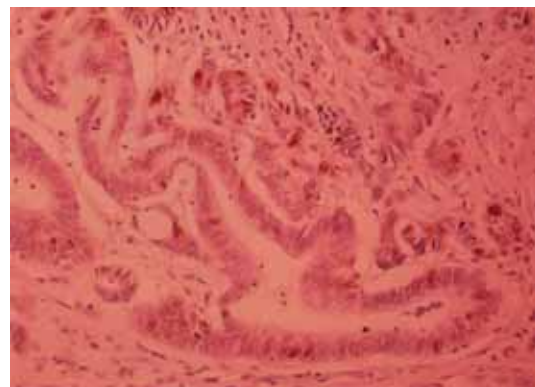
Kako postojeći kliničko-morfološki parametri (histološki tip tumora, stepen diferencijacije, tumorski stadijum, nodalni status, invazija vaskularnih struktura i hirurške margine) još uvek zadržavaju



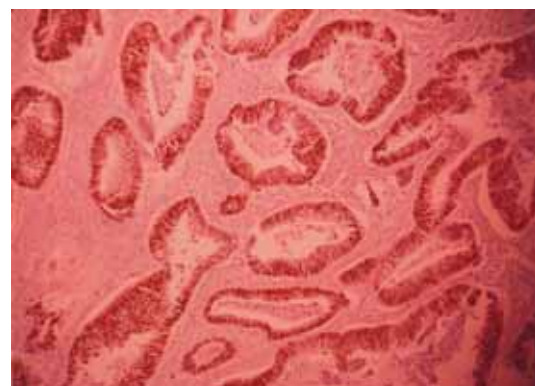
Slika 1. p53 – unutrašnja negativna kontrola (IHH, x 100))



Slika 2. Jedra tumorskih ćelija ne pokazuju imunoreaktivnost na p53 (IHH, x 100)



Slika 3. Jedra tumorskih ćelija pokazuju imunoreaktivnost p53 do 30% (IHH, x 200)



Slika 4. Jedra tumorskih ćelija pokazuju imunoreaktivnost p53 preko 30% (IHH, x 100)

svoj dominantni značaj u dijagnostičkim procedurama, molekularno profiliranje bi doprinelo njihovom upotpunjavanju, najčešće u smislu prepoznavanja odgovora na primenjenu terapiju (genetske promene), ili u smislu primene u unapređenju skrining programa rizičnih kategorija koji bi omogućili blagovremeno i uspešno lečenje (15).

Najveći broj tumora 36/63, tj. 57.1%, manifestovao se u vidu infiltrativne promene, 9/63, tj. 14.3%, kao ulcerišuća forma, a 18/63, tj. 28.6%, tumora imalo je polipoidni – egzofitičan izgled.

Rezultati ove studije pokazali su da je nuklearna ekspresija p53 bila prisutna u 33 slučaja ili 52,4% ukupnog broja, pri čemu je kao ocena pozitivnosti vrednovana ekspresija p53 u više od 30% tumorskih ćelija. U 30 uzoraka ili 47,6% ukupnog broja analiziranih KRK nije bilo ekspresije p53. Dobijeni podaci su u saglasnosti sa podacima iz dostupne literature o ekspresiji markera p53 u kolorektalnim karcinomima, prema kojima je uobičajena ekspresija p53 u svim karcinomima, 45-70%, dok je ekspresija ovog markera u kolorektalnim karcinomima 42-67% (16,17).

Rezultati različitih studija navode na zaključak da u prognostičkom smislu nije dovoljno pratiti samo ekspresiju p53, već da je neophodno pratiti i ekspresiju drugih tumorskih markera, čije pona-

šanje može ukazati na neke bolje terapijske pristupe u lečenju malignih bolesti (18-21).

Ekspresija p53 ne zavisi od makroskopske manifestacije tumora, odnosno nema korelacije između eksprimiranosti p53 i makroskopske manifestacije tumora, koja bi poslužila kao prognostički faktor daljeg toka i ishoda bolesti.

Iako uticaj makroskopske manifestacije tumora na ekspresiju p53 nije statistički značajan ($p = 0,124$), utvrđeno je da se kod ulcerišuće forme višestruko smanjuje mogućnost da p53 bude pozitivan (odds ratio 0,032, $p = 0,017$).

Zaključak

Ekspresija p53 bila je prisutna u 52,5% tumora i ne korelira sa makroskopskom manifestacijom i načinom rasta kolorektalnih karcinoma.

Iz svega prethodno navedenog moglo bi da se zaključi da u dosadašnjim studijama nije dokazana uloga p53 kao važnog prognostičkog pokazatelja. Evaluacija gena i molekularno profiliranje može olakšati identifikaciju grupe bolesnika sa overekspresijom p53, što bi moglo implicirati određene terapijske intervencije i važan skrining za target terapijske ciljeve.

Nivo ekspresije p53 nema dijagnostički, prediktivni i prognostički potencijal, dok je neosporna njegova važnost u razumevanju onkogeneze.

Literatura

- Perraud A, Akil H, Nouaille M, Petit D, Labrousse F, Jauberteau MO, Mathonnet M. Expression of p53 and DR5 in normal and malignant tissues of colorectal cancer: Correlation with advanced stages. *Oncol Rep* 2011; 26(5): 1091-7. [\[PubMed\]](#)
- Compton C. Colorectal carcinoma: Diagnostic, prognostic and molecular features. *Mod Pathol* 2003; 16(4): 376-81. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Losi L, Ponti G, Gregorio CD, Marino M, Rossi G, Pedroni M, Benatti P, Roncucci L, de Leon MP. Prognostic significance of histological features and biological parameters in stage I (pT1 and pT2) colorectal adenocarcinoma. *Pathol Res Pract* 2006; 202(9): 663-70. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Smith G, Carey F.A, Beattie J. Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53-alternative genetic pathways to colorectal cancer. *PNAS* 2002; 14: 9433-38. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Tada M, Furuuchi K, Kaneda M. Inactivate the remaining p53 allele or the alternate p73. Preferential selection of the Arg72 polymorphism in cancers with recessive p53 mutants but not trans dominant mutants. *Carcinogenesis* 2001; 3: 515-17. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Matsuda K, Hotta T, Takifuji K, Kobayashi Y, Tsuji T, Nagai Y, Horiuchi T, Yamaue H. Lymph nodes ratio is associated with the survival of colorectal cancer patients with peritoneal carcinomatosis. *Am Surg* 2011; 77(5): 602-7. [\[PubMed\]](#)
- Thirion A, Rouanet P, Thezenas S: Interest of investigating p53 status in breast cancer by four different methods. *Oncology Reports* 2002; 9: 1167-72. [\[PubMed\]](#)
- Howlett CJ, Tweedie EJ, Driman DK. Use of an elastic stain to show venous invasion in colorectal carcinoma: a simple technique for detection of an important prognostic factor. *J Clin Pathol* 2009; 62(11): 1021-5. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Bancroft JD and Gamble M, editors. Theory and practice of histological techniques. 5th edition. Churchill Livingstone: Edinburgh, London, New York, Oxford; 2002.
- Totty AB. The Mucins. In: Bancroft JD, Gamble M, editors. Theory and practice of histological techniques. 5th ed. Churchill Livingstone: Edeinburgh, London, New York, Oxford; 2002.
- Shiratsuchi I, Akagi Y, Kawahara A, Kinugasa T, Romeo K, Yoshida T, Ryu Y, Gotanda Y, Kage M, Shirouzu K. Expression of IGF-1 and IGF-1R and Their Relation to Clinicopathological Factors in Colorectal Cancer. *Anticancer Res* 2011; 31(7): 2541-5. [\[PubMed\]](#)
- Soliani P, Ziegler S, Romani A, Corcione L, Campanini N, Dell'Abate P, Del Rio P, Sianesi M. Prognostic significance of nm23 gene product expression in patients with colorectal carcinoma treated with radical intent. *Oncology Reports* 2004; 11: 1193-1200. [\[PubMed\]](#)
- Dan-ping Z, Xiao-wen D, Jia-ping P, Yi-xiong Z, Suzhan Z. Prognostic significance of bcl-2 and p53 expression in colorectal carcinoma. *J Zhejiang Univ Science B* 2005; 6(12): 1163-69. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Torsello A, Garufi C, Cosimelli M, Diodoro MG, Zeuli M, Vanni B, Campanella C, D'Angelo C, Sperduti I, R.Donnorsor P, Cognetti F, Terzoli E, Mottolese M. P53 and bcl-2 in colorectal cancer arising in patients under 40 years of age: Distribution and prognostic

- relevance. Eur J Canc 2008; 44: 1217-22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Higashi D, Futami K, Ishibashi Y, Egawa Y, Maekawa T, Matsui T, Iwashita A, Kuroki M. Clinical course of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis. Anticancer Res 2011; 31(7): 2499-504. [[PubMed](#)]
 16. Verdú M, Román R, Calvo M, Rodón N, García B, González M, Vidal A, Puig X. Clinicopathological and molecular characterization of colorectal micropapillary carcinoma. Mod Pathol 2011; 24(5): 729-38. [[PubMed](#)]
 17. Curtis Lj, Georgiades IB, White S, Bird CC, Harrison DJ, Wyllie AH. Specific patterns of chromosomal abnormalities are associated with HER status in sporadic colorectal cancer. J Pathol 2000; 192: 440-45. [[CrossRef](#)]
 18. Claudio P. P, Zamparelli A, Garcia F. U, Claudio L. Expression of Cell-Cycle-regulated Proteins pRb2/p130, p107, p27kip1, p53, mdm-2, and Ki-67 (MIB-1) in Prostatic Gland Adenocarcinoma. Clin Canc Res 2002; 6: 1808-15.
 19. Sasaki S, Yamamoto H, Kaneto H. Differential roles of alterations of p53, p16, and SMAD4 expression in the progression of intraductal papillary-mucinous tumors of the pancreas. Oncol Rep 2003; 10: 21-5. [[PubMed](#)]
 20. Berge E, Thompson C, Messersmith W. Development of Novel Targeted Agents in the Treatment of Metastatic Colorectal Cancer. Clin Colorectal Cancer 2011; [Epub ahead of print]. [[PubMed](#)]
 21. Blagosklonny M, p53 from complexity to simplicity: mutant p53 stabilization, gain-of-function, and dominant-negative effect. FASEB J 2000; 13: 1901-7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

CORRELATION OF TUMOUR SUPPRESSOR GENE P53 EXPRESSION WITH MACROSCOPIC MANIFESTATION AND GROWTH PATTERN OF COLORECTAL CANCER

Dušica Petrović, Vesna Stanković, Miloš Milosavljević and Vladimir Bulatović

Colon carcinoma is one of the most common malignant tumours and the second cause of cancer-related deaths in developed countries.

The objective of the research was to investigate the p53 expression in colorectal cancer and compare the expression levels of p53 with the macroscopic appearance and manner of growth of the tumours, followed by detection and identification of the expression levels of p53 as an important prognostic factor of the further course, outcome and data for the selection of appropriate therapy.

Research was implemented as a prospective, clinical and experimental study. We used a postoperative material obtained by resection of colorectal cancer from 63 patients of both sexes.

The results showed that the majority of tumours 36/63, i.e. 57.1% were manifested as infiltrative forms, 9/63, i.e. 14.3% as ulcerating form, and 18/63, i.e. 28.6% of tumours had a polypoid – exophytic form.

The results have shown that three tumours of infiltrative forms were p53 negative and 17 of them were p53 positive. In tumours with ulcerating form, eight were p53 negative, and 16 of them were no p53 positive tumours. In vegetative tumour forms, four were p53 negative, and 15 of the were p53 positive.

Positive p53 status was present in 52.4% of tumours. Expression of p53 was absent in 47.6% of the tumours and does not correlate with the macroscopic appearance and manner of tumour growth. Expression levels of p53 do not have a diagnostic, predictive and prognostic potential, while its importance is undeniable in the understanding of oncogenesis. *Acta Medica Medianae* 2011; 50(3):22-26.

Key words: colorectal cancer, p53, correlation, macroscopic appearance, growth pattern