

ИМУНОХИСТОХЕМИЈСКА ЕКСПРЕСИЈА ОНКОПРОТЕИНА *p53* У ВИЛМСОВОМ ТУМОРУ У ОДНОСУ НА ХИСТОЛОШКЕ КОМПОНЕНТЕ, ХИСТОЛОШКЕ ТИПОВЕ И ПРЕОПЕРАЦИОНУ ХЕМИОТЕРАПИЈУ

Славиша ЂУРИЧИЋ¹, Драгомир ЂОКИЋ¹, Драгана ВУЈИЋ¹,
Гордана БАСТА-ЈОВАНОВИЋ², Вера ТОДОРОВИЋ³, Сања РАДОЈЕВИЋ-ШКОДРИЋ²,
Славиша ЗДРАВКОВИЋ¹, Гордан М. ВУЈАНИЋ⁴

¹Институт за здравствену заштиту мајке и детета Србије „Др Вукан Чупић”, Београд;

²Институт за патологију, Медицински факултет, Универзитет у Београду, Београд;

³Институт за медицинска истраживања, Универзитет у Београду, Београд;

⁴Одељење за патологију, Медицински факултет, Универзитет у Кардифу, Кардиф, Велика Британија

КРАТАК САДРЖАЈ

Увод Иако су мутације туморског супресорског гена *p53* у Вилмсовом (*Wilms*) тумору (ВТ) ретке, имунохистохемијска експресија онкопротеина *p53* је честа. Студије о имуноекспресији *p53* у ВТ су малобројне, а њихови резултати контрадикторни.

Циљ рада Циљ рада је била процена имунохистохемијске експресије *p53* у односу на хистолошке компоненте ВТ, хистолошке типове ВТ и примењену преоперациону хемиотерапију.

Метод рада Анализирано је 79 примарних ВТ који су оперисани у Институту за здравствену заштиту мајке и детета Србије „Др Вукан Чупић” у Београду у периоду 1983-2001. године. Болесници су лечени према протоколима Међународног удружења за педијатријску онкологију (*SIOP*). Сви тумори су поново класификовани у складу с критеријумима Ревидиране *SIOP* радне класификације тумора бубрега код деце (2001). Моноклонско антитело *DO-7* (*ДАКО*) примењено је за откривање онкопротеина *p53* имунохистохемијским методом из узорака уклопљених у парафин. Процена имунопозитивности *p53* вршена је семиквантитативним методом.

Резултати Имуноекспресија *p53* имала је изразиту регионалну варијабилност и била подједнака у бластемској и епителној компоненти ВТ, док је у стромалној била изразито нижа ($p < 0,001$). Имунопозитивност *p53* значајно је повезана с хистолошким типовима ВТ ($p = 0,039$). Екстензивнија је у анапластичној компоненти ВТ него у неанапластичним компонентама ВТ, али разлике у имуноекспресији између ВТ типа дифузне анаплазије и неанапластичних типова и типа фокалне анаплазије ипак нису биле статистички значајне ($p = 0,10$). Пет ВТ бластемског типа било је имунопозитивно, а четири имунонегативно. Нису постојале разлике у имунопозитивности *p53* између тумора лечених преоперационом хемиотерапијом и примарно оперисаних тумора ($p = 0,88$).

Закључак Имунохистохемијска експресија *p53* значајно је већа у бластемској и епителној него у стромалној компоненти ВТ и значајно је повезана с хистолошким типовима ВТ. Екстензивнија је у анапластичној компоненти, али разлике у имунопозитивности *p53* између типа дифузне анаплазије и осталих типова ВТ ипак нису статистички значајне. Преоперациона хемиотерапија не утиче значајно на имуноекспресију *p53* код ВТ.

Кључне речи: Вилмсов тумор; нефробластом; класификација; туморски супресорски протеин *p53*; имунохистохемија; хемиотерапија

УВОД

Мутација супресорског гена *p53* је најчешћи генетски поремећај у канцерогенези. Функционална инактивација његовог протеинског производа, протеина *p53*, доводи до малигне трансформације ћелије. Имунохистохемијска идентификација протеина *p53* има прогностички значај у најчешћим туморима одраслих људи [1]. Улога *p53* у настанку солидних тумора код деце још није довољно позната [2, 3].

Вилмсов (*Wilms*) тумор (ВТ) или нефробластом најчешћи је тумор бубрега код деце. Као и други ембрионални тумори, има мешовиту хистолошку грађу, коју у различитим пропорцијама чине једна, две или најчешће три компоненте: бластемска, епителна и стромална. Усавршавањем хируршке технике и зрачне терапије, а посебно увођењем мултимодалне хеми-

отерапије са два или три агенса, укупно преживљавање болесника са ВТ данас је веће од 90%.

Дугогодишње мултицентричне студије у оквиру америчке националне групе (*NWTS*) и Међународног удружења за педијатријску онкологију (*SIOP*) потврдиле су да су хистолошка грађа и проширеност тумора два најважнија параметра за одлуку о терапији. Према терапијским протоколима *SIOP*, лечење ВТ код деце узраста од шест месеци почиње преоперационом хемиотерапијом (ПХ), која изазива регресивне промене у тумору (углавном некрозу) и смањење волумена тумора. Лечење после операције одређује се на основу хистолошке грађе, која се процењује након ресекције тумора [4]. Налаз више од 90% некротичне туморске масе после примене ПХ има изразито повољан прогностички значај [5]. ПХ различито делује на хистолошке компоненте ВТ тако што изазива масив-

но уништавање недиференциране, високо пролиферационе бластемске компоненте, с последичним повећањем пропорционалне заступљености боље диференцираних компоненти које су резистентније на хемиотерапију [5]. Анаплазија туморских ћелија се налази код око 5% тумора и једини је критеријум неповољне прогнозе код претходно нелечених ВТ. Биолошкој особини агресивности тумора у савременој ери хемиотерапије придружила се биолошка особина сензитивности на антигуморске агенсе. У студији Беквита (*Beckwith*) и сарадника [6] показано је да је бластемска компонента ВТ најагресивнија, али и најосетљивија на хемиотерапију, док епителна и стромална компонента испољавају управо обрнуте биолошке особине. Анапластичну компоненту одликује агресивност, али и изразита резистенција на хемиотерапију. Анаплазија је показатељ резистенције ћелија на хемиотерапију и за исход болести кључна је њена расподела у туморском ткиву. Само ВТ са дифузном анаплазијом сврстани су у групу неповољне прогнозе, док се фокална анаплазија не сматра додатним негативним прогностичким фактором [7]. На основу наведених анализа, а посебно након резултата мултицентричне студије ВТ *SIOP-9* [8], формирана је актуелна Ревидирана *SIOP* радна класификација тумора бубрега код деце (Табела 1) [9]. У делу класификације за туморе лечене ПХ типови бластемског, епителног и стромалног ВТ дефинисани су тако да обавезно садрже бар једну трећину од некрозе поштеђеног (вијабилног) ткива и у њему најмање две трећине (65%) одговарајуће хистолошке компоненте, с тим што епителни и стромални тип не смеју да садрже више од 10% бластемске компоненте. У мешовитом типу ниједна компонента не сачињава двотрећинску масу вијабилног туморског ткива, а бластемска компонента премашује лимит од 10% масе тумора. У регресивном типу вијабилна маса тумора је мања од једне трећине. У поменутој студији *SIOP* [8] утврђено је да дијагноза бластемског типа ВТ после ПХ има изразито неповољан прогностички значај, због чега је овај тип из групе средњег ризика пребачен у групу ВТ високог ризика. Перзистенција значајне бластемске компоненте после ПХ указује на постојање неопластичног ћелијског клона резистентног на хемиотерапијске агенсе [10].

Упркос огромном напретку у лечењу, и данас најчешће налазимо на децу са ВТ прогностички повољне хистолошке грађе који не реагује на хемиотерапију или код којег долази до релапса тумора током или након завршетка лечења према стандардизованим протоколима [11-13]. Због тога се улажу напори у откривању нових генетских и других фактора који могу да буду узрок таквом понашању тумора.

Након прве студије Вебера (*Weber*) и сарадника [14] и у неколико каснијих студија утврђено је да су алтерације гена *p53* у ВТ ретке [15]. За разлику од тога, у неколико студија је утврђено да је имунохистохемијска експресија протеина *p53* у ВТ честа [15-23]. Имунохистохемијско откривање протеина *p53* после-

дица је његове поремећене функције или пак његове инактивације услед стварања нефункционалних комплекса са другим протеинима, а у одсуству алтерација гена *p53* [15, 19, 21, 24, 25]. Алтерације гена *p53* откривене су много чешће у анапластичном него у неанапластичном ВТ [17, 26, 27]. Претпоставља се да је настанак анапластичне компоненте ВТ последица клоналне експанзије ћелија изазване или подстакнуте мутацијом гена *p53* [15, 28]. Према налазима неких студија, и имунохистохемијска експресија *p53* значајно је израженија у анапластичним него у неанапластичним ВТ [16, 18], али такви резултати нису добијени у свим истраживањима [22, 23].

ТАБЕЛА 1. Ревидирана *SIOP* радна класификација тумора бубрега код деце (2001).

TABLE 1. Revised *SIOP* working classification of renal tumours of childhood (2001).

За претретирани туморе For pretreated cases	
Тумори ниског ризика Low risk tumours	[Мезобластни нефром] [Mesoblastic nephroma]
	Цистични парцијално диференцирани нефробластом Cystic partially differentiated nephroblastoma
	Потпуно некротични нефробластом Completely necrotic nephroblastoma
Тумори средњег ризика Intermediate risk tumours	Нефробластом – епителни тип Nephroblastoma – epithelial type
	Нефробластом – стромални тип Nephroblastoma – stromal type
	Нефробластом – мешовити тип Nephroblastoma – mixed type
	Нефробластом – регресивни тип Nephroblastoma – regressive type
Тумори високог ризика High risk tumours	Нефробластом – фокална анаплазија Nephroblastoma – focal anaplasia
	Нефробластом – бластемски тип Nephroblastoma – blastemal type
	Нефробластом – дифузна анаплазија Nephroblastoma – diffuse anaplasia
	[Светлоћелијски сарком бубрега] [Clear cell sarcoma of the kidney] [Рабдоидни тумор бубрега] [Rabdoid tumour of the kidney]
За туморе примарно лечене нефректомијом For primary nephrectomy cases	
Тумори ниског ризика Low risk tumours	[Мезобластни нефром] [Mesoblastic nephroma]
	Цистични парцијално диференцирани нефробластом Cystic partially differentiated nephroblastoma
Тумори средњег ризика Intermediate risk tumours	Неанапластични нефробластом и његове варијанте Non-anaplastic nephroblastoma and its variants
	Нефробластом – фокална анаплазија Nephroblastoma – focal anaplasia
Тумори високог ризика High risk tumours	Нефробластом – дифузна анаплазија Nephroblastoma – diffuse anaplasia
	[Светлоћелијски сарком бубрега] [Clear cell sarcoma of the kidney]
	[Рабдоидни тумор бубрега] [Rabdoid tumour of the kidney]

* У угластим заградама су наведени тумори који не припадају подтипима Вилмсовог тумора.

* Tumours which do not belong to nephroblastoma are in square brackets.

Хемиотерапијски агенси покрећу апоптозу туморских ћелија путем активације гена *p53*. Код туморских ћелија с повишеном експресијом *p53* забележени су атенуација апоптозе, повећана резистенција на хемиотерапијске агенсе и селективан раст туморских ћелија [16, 19, 21, 23, 28].

ЦИЉ РАДА

Циљ ове студије је била процена имунохистохемијске експресије *p53* у односу на хистолошке компоненте и хистолошке типове ВТ одређене према критеријумима нове класификације *SIOP*, као и у односу на примењену ПХ. Циљ студије није било испитивање прогностичког значаја имуноекспресије *p53* у ВТ.

МЕТОД РАДА

Болесници, узорци тумора и патохистолошка анализа

Студијом је обухваћено 79 болесника с примарним ВТ који су лечени у Институту за здравствену заштиту мајке и детета Србије „Др Вукан Чупић” у Београду у периоду 1983-2001. године. Код свих болесника дијагноза и лечење су изведени у складу с протоколима *SIOP*. Узорци туморског ткива бојени су стандардним методом хематоксилином и еозином и рекласификовани према критеријумима Ревидиране *SIOP* радне класификације тумора бубрега код деце из 2001. године (Табела 1) [9]. И тумори који су примарно лечени хируршки класификовани су према делу класификације за туморе лечене ПХ, како би било могуће поређење имуноекспресије *p53* између хистолошких типова ВТ у односу на примењену терапију. Анаплазија је одређивана према стандардним критеријумима за ВТ [29]. Стадијум болести одређиван је према критеријумима *SIOP*, с тим што је у складу с новом класификацијом стадијум *II N+* (стадијум *II* уз метастазе у регионалним лимфним чворовима) пребачен у стадијум *III* [9]. Анализом су обухваћена четири синхрона билатерална тумора. Код њих је анализирано туморско ткиво из бубрега одстрањеног тоталном нефректомијом. Анализом нису обухваћени ВТ из групе ниског ризика, пошто они не садрже довољно вијабилног туморског ткива, као ни тумори из конгенитално спојених бубрега. Прегледани су пресеци из најмање три, а највише 30 парафинских блокова за сваки тумор (просечно 10,72 пресека, медијана 10).

Одређивање експресије протеина *p53* имунохистохемијским методом

За откривање протеина *p53* примењени су моноклонско мишје, антихумано антитело (*DO-7*, *DAKO*,

Глоструп, Данска) и високосензитиван и специфичан стрептавидин–биотин комплексни имунохистохемијски метод (*LSAB⁺/HRP*), у којем је стрептавидин обележен пероксидазом рена, а као хромоген коришћен је 3,3'-диаминобензидин. Само изразито једарно бојење узимано је као имунопозитивност *p53*. Имунохистохемијска бојења извршена су уз контролу квалитета и специфичности бојења применом „позитивних” и „негативних” контрола према пропозицијама *UK NEQAS* [30, 31].

Семиквантитативна процена имунохистохемијске експресије протеина *p53*

У анализираним узорцима туморског ткива процењивани су екстензитет и варијабилност експресије онкопротеина *p53*. Процена степена имунореактивности вршена је путем три мерења на по 100 туморских ћелија на сваком ткивном пресеку. Крајњи проценат имунопозитивних ћелијских једара у односу на укупан број микроскопски прегледаних туморских ћелија израчунаван је као средња вредност свих мерења за цели тумор и посебно за све три хистолошке компоненте. Степен имунопозитивног бојења означен је индексима на следећи начин: 0 је означавала изостанак „позитивног” бојења, 1 се односио на 1-25% „позитивних” ћелија, 2 на 26-50% „позитивних” ћелија, 3 на 51-75% „позитивних” ћелија, а 4 на 76-100% „позитивних” ћелија. Варијабилност бојења унутар тумора означавања је као 1 – хомогено, 2 – хетерогено и 3 – фокално. За сваки тумор анализиран је по један пресек из узорака из једног до три парафинска блока, просечно $1,95 \pm 0,68$ узорака по тумору (медијана 2,0).

Као граница позитивне имуноекспресије *p53* одређена је просечна вредност индекса за све испитиване туморе, што одговара просечној вредности процента имунопозитивних ћелија и у складу је с препорукама из ранијих релевантних имунохистохемијских студија [32, 33]. Тај приступ примењен је у две новије студије имуноекспресије *p53* у ВТ, у којима је граница имунопозитивности постављена на 20% [15, 23].

Просечни индекси имуноекспресије *p53* упоређивани су у односу на хистолошке компоненте ВТ и тип примењене терапије (ПХ или примарна хирургија). Процентуална заступљеност имунопозитивних тумора у односу на све туморе у одговарајућим групама упоређивана је у односу на хистолошке типове ВТ и тип примењене терапије.

Статистичка анализа података

За статистичку анализу резултата при поређењу учесталости и пропорција коришћени су Фишеров (*Fisher*) тест и χ^2 -тест уз Јејтсову (*Yates*) корекцију у

случајевима малих фреквенција. Поређење медијана и средњих вредности вршено је Ман-Витнијевим (*Mann-Whitney*) тестом и Студентовим (*Student*) *t*-тестом.

РЕЗУЛТАТИ

Основне одлике испитаника приказане су у табели 2. Није било статистички значајне разлике у расподели према узрасту, страни тумора и стадијуму болести између групе болесника са ВТ лечених ПХ и групе болесника лечених примарно хируршки. У групи

болесника лечених примарно хируршки било је значајно више девојчица него дечака.

У табели 3 су приказане одлике имунохистохемијске експресије *p53* код свих 79 ВТ и посебно у односу на хистолошке компоненте, укључујући и неанпластична и анапластична подручја тумора. Испитана је и разлика имуноекспресије у односу на примењену терапију. Имуноекспресија *p53* била је подједнака у бластемској и епителној, док је у стромалној компоненти била изразито мала ($p < 0,001$) (Слика 1). Просечан индекс имуноекспресије *p53* у целом туморском ткиву и посебно у свакој од три компоненте био је нешто већи код ВТ који су примарно лечени хирур-

ТАБЕЛА 2. Основне одлике испитаника.
TABLE 2. Study group characteristics.

Параметар Parameter		Укупно Total	Болесници лечени применом ПХ Patients treated with PC	Болесници примарно лечени хируршки Patients primarily surgically treated	р
Узраст (месеци) Age (months)	Просек±SD Mean±SD	49.8±33.7	51.0±32.9	43.84±38.8	=0.27
	Распон Range	3-132	5-132	3-126	
	Медијана Median	44	45	24	
Пол Sex	Мушки Male	42	39	3	=0.04
	Женски Female	37	27	10	
Страна тумора Tumour side	Десно Right	41	32	7	=0.91
	Лево Left	35	30	5	
	Обострано Bilateral	4	3	1	
Стадијум тумора Clinicopathologic stage	I	52 (65.8%)	46 (69.7%)*	6 (46.1%)*	=0.18
	II	6 (7.6%)	4 (6.1%)*	2 (15.4%)*	=0.55
	III	15 (19.0%)	11 (16.7%)*	4 (30.8%)*	=0.42
	IV	2 (2.5%)	2 (3.0%)	-	-
	V	4 (5.1%)	3 (4.5%)*	1 (7.7%)*	=0.82
Укупно Total		79 (100%)	66 (100%)	13 (100%)	

* $p=0.42$; ПХ – преоперациона хемиотерапија / PC – preoperative chemotherapy

ТАБЕЛА 3. Индекс* имунохистохемијске експресије *p53* у односу на хистолошке компоненте Вилмсовог тумора и примењено лечење.
TABLE 3. Index* of *p53* immunohistochemical expression in relation to histological components of Wilms tumour and type of treatment.

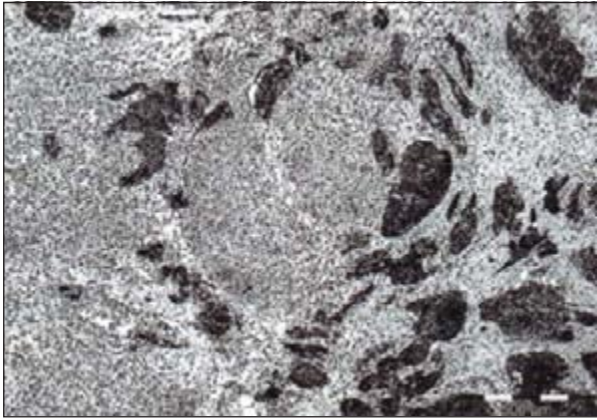
Параметар Parameter	Цели тумор (све компоненте) Complete tumour (all components)			Хистолошка компонента Histological component										
	Σ	ПХ PC	ПХЛ PS	Бластемска Blastemal			Епителна Epithelial			Стромална Stromal				
				Σ	ПХ PC	ПХЛ PS	Σ	ПХ PC	ПХЛ PS	Σ	ПХ PC	ПХЛ PS		
Број тумора Number of tumours	79	66	13	74	62	13	75	63	12	77	65	12		
Просек Mean	1.7	1.6	1.9	1.9**	1.9	2.1	1.9**	1.8	2.2	1.0**	0.9	1.3		
SD	0.9	0.8	1.0	1.3	1.3	1.4	1.3	1.3	1.5	0.7	0.7	0.9		
Med	1	1	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1		
Max	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	3	3		
Min	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
р		=0.24			=0.62				=0.34				=0.09	

* 0 – 0% имунопозитивних ћелија; 1 – 1-25%; 2 – 26-50%; 3 – 51-75%; 4 – 76-100%; ** $p < 0,001$

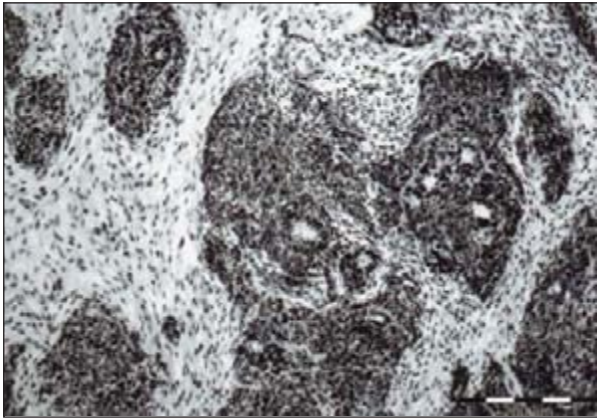
Σ – сви тумори; ПХ – преоперациона хемиотерапија; ПХЛ – примарно хируршко лечење; SD – стандардна девијација; Med – медијана; Max – највећа вредност; Min – најмања вредност

* 0 – 0% of immunopositive cells; 1 – 1-25%; 2 – 26-50%; 3 – 51-75%; 4 – 76-100%; ** $p < 0,001$

Σ – all tumours; PC – preoperative chemotherapy; PS – primary surgery; SD – standard deviation; Med – median; Max – maximum; Min – minimum



СЛИКА 1. Упадљива разлика између једарне имунопозитивности *p53* ћелија бластемске и епителне компоненте и имунонегативности *p53* ћелија стромалне компоненте Вилмсовог тумора.
FIGURE 1. Remarkable difference between nuclear *p53* immunopositivity of cells in the blastemal and epithelial components and *p53* immunonegativity of cells in the stromal Wilms tumour component.

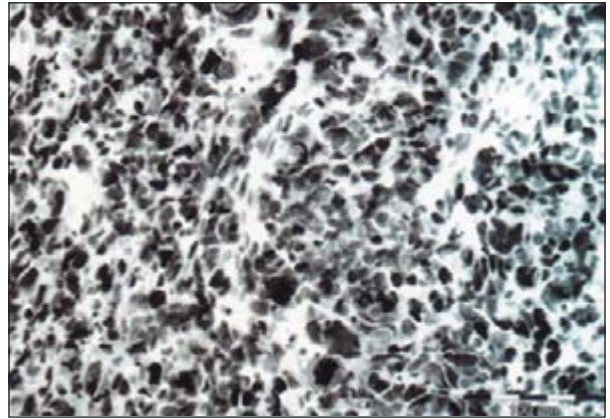


СЛИКА 2. Изразита хетерогеност имунохистохемијске експресије *p53* у Вилмсовом тумору.
FIGURE 2. Remarkable heterogeneity of *p53* immunohistochemical expression in Wilms tumour.

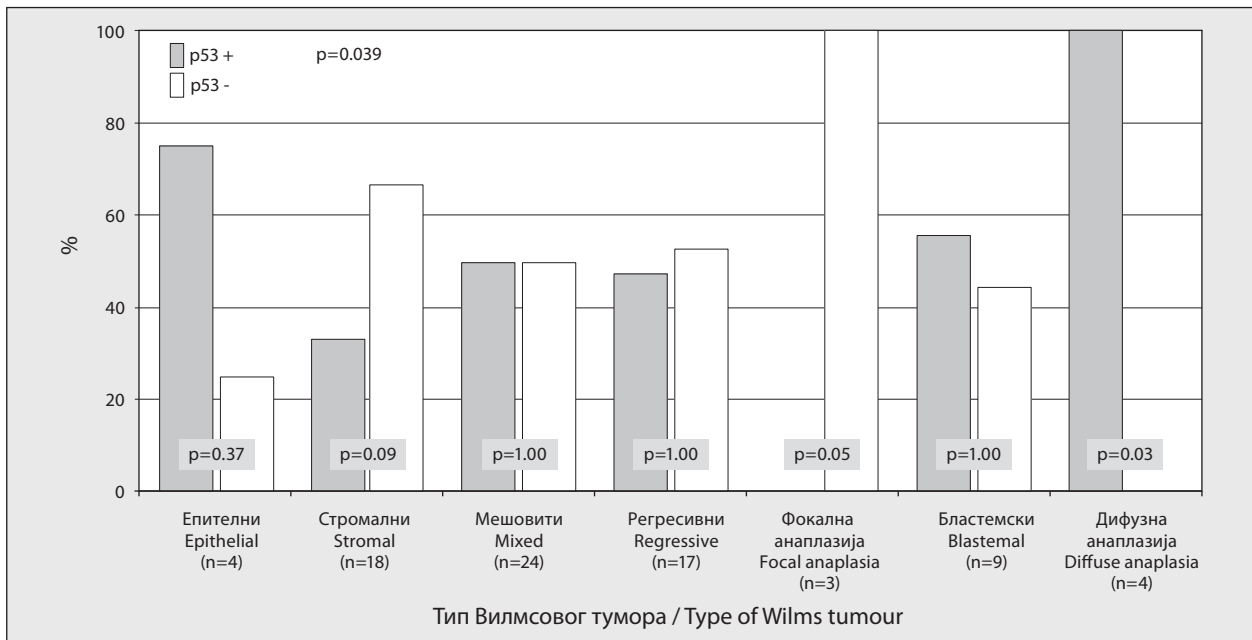
шки него применом ПХ, али разлике нису биле статистички значајне.

Уочена је регионална варијабилност имунохистохемијског бојења *p53*. Просечан индекс регионалне варијабилности позитивне имуноекспресије *p53* био је $1,7 \pm 0,7$, са медијаном на индексу 2, па се може закључити да је доминантна дистрибуција позитивног имунохистохемијског бојења била хетерогена (Слика 2). Једарна имунопозитивност *p53* забележена је у много већем броју ћелија у подручјима анапластичне хистолошке грађе у односу на подручја неанапластичне грађе, што је било посебно упадљиво код ВТ типа фокалне анаплазије. Ипак, и појединачне анапластичне ћелије биле су имунонегативне (Слика 3).

Праг позитивне имуноекспресије одређен је на основу просечне вредности индекса пропорционалне заступљености имунопозитивних ћелија за све испитиване туморе. Просечна вредност била је $1,7 \pm 0,9$



СЛИКА 3. Јака једарна имунопозитивност *p53* у великом проценту ћелија анапластичне компоненте Вилмсовог тумора.
FIGURE 3. Intense nuclear *p53* immunopositivity in high percentage of cells in the anaplastic Wilms tumour component.



ГРАФИКОН 1. Имуноекспресија *p53* у односу на хистолошки тип Вилмсовог тумора ($n=79$)
GRAPH 1. Immunoeexpression of *p53* in relation to histological type of Wilms tumour ($n=79$)

ДИСКУСИЈА

(медијана 1), па су у ВТ са „позитивном” имуноекспресијом *p53* класификовани они с индексом 2, 3 и 4, тј. тумори са више од 25% имунопозитивних ћелија, а у ВТ са „негативном” имуноекспресијом они с индексом 0 и 1, тј. са експресијом једнаком или мањом од 25% ћелија.

На графикону 1 види се да је расподела тумора у односу на имунопозитивност *p53* била значајно повезана с хистолошким типовима ВТ ($p=0,039$). Анализирањем имунохистохемијске реактивности *p53* по хистолошким типовима ВТ, уочавају се значајне разлике само код типа дифузне анаплазије (сва четири тумора имунопозитивна; $p=0,03$) и типа фокалне анаплазије (сва три тумора имунонегативна; $p=0,05$). Пет ВТ бластемског типа било је имунопозитивно, а четири имунонегативно. Међутим, двостраним поређењем пропорција имунопозитивних тумора између различитих хистолошких типова, ни у једној комбинацији нису уочене статистички значајне разлике, али су оне ипак биле највеће при поређењу типа дифузне анаплазије са стромалним типом ($p=0,06$) и типа дифузне анаплазије са типом фокалне анаплазије ($p=0,06$). Разлика у имунопозитивности није било ни приликом поређења тумора са дифузном анаплазијом (4/4) и свих осталих тумора (34/75; $p=0,10$). Значајних разлика у имуноекспресији *p53* у односу на хистолошке типове није било ни када су разлике испитане посебно за групу ВТ лечених ПХ ($p=0,11$), ни посебно за групу ВТ лечених примарно хируршки ($p=0,57$).

Разлика у имуноекспресији *p53* није било ни када је имуноекспресија поређена између хистолошких типова ВТ у односу на тип примењене терапије, што се види у табели 4.

ТАБЕЛА 4. Имуноекспресија *p53* у односу на хистолошке типове Вилмсовог тумора и примењено лечење ($n=79$).

TABLE 4. Immunexpression of *p53* in relation to histological types of Wilms tumour and type of treatment ($n=79$).

Хистолошки тип Histological type	Број тумора с имунопозитивношћу <i>p53</i> Number of <i>p53</i> immunopositive tumours		<i>P</i>
	ПХ PC	ПХЛ PS	
	Епителни Epithelial	3/4 (75.0%)	
Стромални Stromal	5/15 (33.3%)	1/3 (33.3%)	=0.50
Мешовити Mixed	11/21 (52.4%)	1/3 (33.3%)	=1.00
Регресивни Regressive	8/17 (47.1%)	-	-
Фокална анаплазија Focal anaplasia	0/3 (-)	-	-
Бластемски Blastemal	2/4 (50.0%)	3/5 (60.0%)	=0.70
Дифузна анаплазија Diffuse anaplasia	2/2 (100.0%)	2/2 (100.0%)	=1.00
Укупно Total	31/66 (47.0%)	7/13 (53.8%)	=0.88

ПХ – преоперациона хемиотерапија; ПХЛ – примарно хируршко лечење

PC – preoperative chemotherapy; PS – primary surgery

Резултати нашег истраживања упоређивани су с резултатима осам данас објављених студија имунохистохемијске експресије *p53*. Прву студију урадили су Лемуан (*Lemoine*) и сарадници [20] на узорцима 34 ВТ. У следеће две Лахоти (*Lahoti*) и сарадници [19] и Бениерс (*Beniers*) и сарадници [21] испитивали су однос између имуноекспресије *p53* и генских мутација *p53*, а у наредних пет студија из различитих земаља света анализирана је искључиво имунохистохемијска експресија *p53* [15, 16, 18, 22, 23].

Расподела болесника по узрасту, полу и страни захваћеног бубрега у нашој студији потпуно одговара овој расподели код свих 178 болесника који су испитани у претходној студији демографских и клиничко-патолошких одлика појаве ВТ код болесника оперисаних у Институту у двадесетшестогодишњем периоду (1976-2001. године) [34]. Медијана узраста наших болесника у време дијагностиковања ВТ је за шест-седам месеци већа од ове медијане у развијеним европским земљама [35]. Расподела тумора према полу је врло слична овој расподели у светским серијама ВТ [35, 36]. У групи болесника лечених примарно хируршки било је значајно више девојчица него дечака у односу на групу болесника лечених ПХ, што не сматрамо битним, јер ниједна досадашња студија није показала да су разлике у имуноекспресији *p53* повезане с полом болесника [22]. Код испитаника у нашем истраживању ВТ се налазио више од два пута чешће у III него у II стадијуму (2,5:1). Ово је запажено и при анализи свих 178 болесника у нашој претходно поменутој студији [34]. У студијама имунохистохемијске експресије *p53* код болесника из Холандије [21] и Сједињених Америчких Држава [15] број болесника у III стадијуму је за око два пута мањи него у II стадијуму, у студији код јужноафричких болесника [18] број тумора у II и III стадијуму је подједнак, док је у пољској студији [23] значајно већи број болесника у III него у II стадијуму (18:13). У студији болесника у Бразилу [22] број оболелих у III стадијуму је два пута већи него у II стадијуму, слично као у нашем истраживању. Мали број болесника у IV стадијуму у нашој студији сличан је овом броју у пољској, бразилској и америчкој студији [15, 22, 23]. Пропорционална заступљеност билатералних тумора (5,1%) у нашем истраживању у сагласности је с подацима великих светских студија [36].

У критичкој анализи резултата раних студија о прогностичком значају имунореактивности *p53* код различитих тумора утврђено је да су из студија са малим бројем болесника изведени нереални закључци [37]. Наша студија имуноекспресије *p53* у ВТ представља једну од највећих у односу на број тумора и узорка. Само у три претходне студије обухваћен је нешто већи број болесника: 97 болесника у бразилској студији [22], 93 у јужноафричкој [18] и 86 у америчкој [15].

Налаз хетерогености имунохистохемијског бојења *p53* у сагласности је са налазима свих претходних

студија. Процент имунореактивних ћелија једнак је у бластемској и епителној компоненти и у њима статистички изразито већи него у стромалној компоненти. Налазе о убедљиво већој имунопозитивности *p53* у бластемској и епителној компоненти саопштили су Лахоти и сарадници [19], Бениерс и сарадници [21] и Скотницка-Клоновиц (*Skotnicka-Klonowicz*) и сарадници [23], па се можемо сложити са мишљењем Бениерса и сарадника [21] да је таква расподела имунопозитивности *p53* у складу с теоријом патогенезе ВТ према којој је у ВТ нормална диференцијација бластемске компоненте која се развија из ембрионалног метанефричког мезенхима блокирана, што води ка стварању нефункционалних тубула и абортивних гломерула [38]. Среднијева (*Sredni*) и сарадници [22] су установили изразитију имуноекспресију само у бластемској компоненти, а од ових налаза одступају једино налази Лемуана и сарадника [20], који су уочили изразито високу експресију у тубулима епителне компоненте, а ниску експресију у бластемској и стромалној компоненти. Објашњење за ове разлике вероватно лежи у различитој техници (смрзнути узорци тумора), односно у другачијем тумачењу резултата имунохистохемијског бојења.

У нашем истраживању 38 тумора (48,1%) је било имунопозитивно на *p53*, док је 41 тумор (51,9%) био имунонегативан. С обзиром на претходно разматрану расподелу имунопозитивности *p53* у односу на хистолошке компоненте ВТ, потпуно је разумљиво да је расподела тумора у односу на имунохистохемијску експресију *p53* у нашем истраживању била значајно повезана с хистолошким типовима ВТ. Очигледно је да је на ове разлике пресудно утицала имунопозитивност сва четири ВТ типа дифузне анаплазије, што се види из резултата двостраних упоређивања имунопозитивности различитих хистолошких типова.

Имунопозитивност *p53* у скоро свим досадашњим студијама била је значајно већа у групи анапластичних ВТ него у неанапластичним ВТ. У нашој студији је број анапластичних ВТ био мали – седам од 79 (8,9%), што значајно умањује вероватноћу да се докаже статистичка значајност разлика, али тај недостатак се наводи и у другим сличним студијама. У нашем истраживању сва четири ВТ типа дифузне анаплазије била су имунопозитивна, а сва три типа фокалне анаплазије имунонегативна, што упућује на то да код тумора са фокалном анаплазијом није било имунопозитивности у неанапластичним компонентама, односно да је проценат анапластичне компоненте био мали. Овим запажањима одговара и налаз код једног тумора из студије Лахотија и сарадника [19] код којег је изразита имунопозитивност *p53* откривена само у два исечка од 19 анализираних туморских исечака, и то искључиво у анапластичној компоненти. Резултати наших испитивања најсличнији су резултати полске студије, где је у групи имунопозитивних ВТ било процентуално три пута више анапластичних тумора него у групи имунонегативних, а разлике су биле бли-

зу границе значајности ($p=0,06$). Слично нашој студији, у тој студији сва четири ВТ са дифузном анаплазијом била су имунопозитивна, за разлику од два (од пет) ВТ са фокалном анаплазијом [23]. Ни у бразилској студији није било корелације између експресије *p53* и анаплазије када се анализирају сви испитаници. Међутим, у издвојеној анализи тумора III стадијума појавила се значајна разлика (имунопозитивни анапластични 50%; неанапластични 4%; $p=0,006$) [22]. У осталим студијама разлике у имунопозитивности између група анапластичних и неанапластичних ВТ су биле статистички значајне. У студији 38 малезијских болесника, имунопозитивност у више од 75% туморских ћелија забележена је у оба анапластична тумора (100%) и у само четири од 36 (11,1%) неанапластичних ($p=0,021$) [16]. У јужноафричкој студији високу експресију у групи анапластичних ВТ имало је пет од седам (71,4%) тумора, а у групи неанапластичних три од 86 (3,5%) тумора ($p<0,001$) [18]. У холандској студији позитивно имунохистохемијско бојење код више од 1% ћелија нађено је код сва четири анапластична и три од 14 неанапластичних ВТ ($p=0,006$) [21]. У америчкој студији позитивна имуноекспресија забележена је код четири од седам анапластичних и пет од 63 неанапластична ВТ ($p<0,01$) [15].

Изузев налаза Среднијева и сарадника [22], који су имунопозитивност *p53* открили код осам од 55 (15%) ВТ са бластемском преминацијом, једног од 12 (8%) ВТ са епителном преминацијом и ни код једног од 13 ВТ са стромалном преминацијом, у досадашњим студијама није анализирана имунопозитивност *p53* према хистолошким типовима неанапластичног ВТ. У нашој студији није постојала значајна повезаност имуноекспресије *p53* с хистолошким типовима ВТ када се из процена искључи тип са дифузном анаплазијом. Ипак, на графикону 1 треба уочити да су три од четири ВТ епителног типа била имунопозитивна, да је подједнак број ВТ мешовитог, регресивног и бластемског имао позитивну и негативну имуноекспресију *p53*, као и да је двоструко више тумора стромалног типа било имунонегативно него имунопозитивно ($p=0,09$). Подједнак број ВТ бластемског типа био је имунопозитиван и имунонегативан на протеин *p53* (5:4). У двостраним поређењима имунореактивности између хистолошких типова ВТ такође није било значајних разлика. Ово указује на то да имуноекспресија протеина *p53* највероватније није самосталан индикатор агресивности, односно резистенције на хемотерапију бластемског типа ВТ.

У неким истраживањима других тумора наводи се да примена хемотерапије може да буде повезана са прекомерном експресијом протеина *p53*, јер хемотерапија допушта селективан раст резистентних ћелијских линија које садрже измењени протеин *p53*, па тако избегавају апоптозу, док ћелије с имунонегативношћу *p53* бивају уништене [39]. Резултати досадашњих испитивања ВТ, као и нашег, указују на то да ПХ не модификује имунохистохемијску експреси-

ју *p53*. У студији Лахотија и сарадника [19] имуноекспресија *p53* се није разликовала између дијагностичких биопсијских узорка 17 ВТ и узорка узетих из ресектата тих тумора после примењене хемиотерапије. У студији Среднијевице и сарадника [22] значајну имуноекспресију *p53* није показивао ниједан од 10 ВТ лечених ПХ, док је од осталих 87 ВТ лечених примарно хируршки 13 било имунопозитивно. У студији Говиндера (*Govender*) и сарадника [18] позитивна експресија *p53* откривена је код седам од 68 (10,3%) ВТ лечених ПХ и једног од 25 (4,0%) ВТ лечених примарно хируршки. У складу с овим налазима, потенцијалан прогностички значај имунохистохемијске експресије *p53* може се испитивати у свим ВТ, без обзира на примењени тип терапије. Наши резултати не подржавају ставове Данђела (*D'Angelo*) и сарадника [15], који наводе да ПХ може да утиче на прогностички значај имуноекспресије *p53* код ВТ. Међутим, ако би била тачна претпоставка ових аутора да су, из непознатих разлога, неки ВТ с имунопозитивношћу *p53* ипак сензитивни на хемиотерапију, а неки не, задржавање имунопозитивности *p53* после хемиотерапије могло би да буде повезано с неповољним исходом болести, као што је то код анапластичних ВТ. У том случају, имунопозитивност *p53* код тумора лечених ПХ имала би већи прогностички значај него имунопозитивност код тумора који су примарно оперисани.

ЗАКЉУЧАК

Имунохистохемијска експресија онкопротеина *p53* значајно је већа у бластемској и епителној, него у стромалној хистолошкој компоненти ВТ и у свим компонентама има изразиту регионалну варијабилност. Имунопозитивност *p53* значајно је повезана са хистолошким типовима ВТ класификованим према критеријумима Ревидиране *SIOP* радне класификације тумора бубрега код деце (2001), али првенствено захваљујући имунопозитивности сва четири ВТ типа дифузне анаплазије. Имунопозитивност *p53* је екстензивнија у анапластичној компоненти ВТ у односу на неанапластичне компоненте. То се испољава при поређењу имуноекспресије између ВТ типа дифузне анаплазије и осталих типова ВТ, мада ове разлике не досежу ниво статистичке значајности. Имунопозитивност *p53* није самосталан индикатор агресивности, односно резистенције на хемиотерапију бластемског типа ВТ. Преоперациона хемиотерапија не модификује имуноекспресију *p53* код ВТ.

ЛИТЕРАТУРА

- Jovanović I, Todorović V, Milosavljević T, et al. Expression of p53 protein in Barretts adenocarcinoma and adenocarcinoma of the gastric cardia and antrum. *Vojnosanit Pregl* 2005; 62:879-85.
- Kusafuka T, Fukuzawa M, Oue T, Komoto Y, Yoneda A, Okada A. Mutation analysis of p53 gene in childhood malignant solid tumors. *J Pediatr Surg* 1997; 32:1175-80.
- Fiszer-Maliszewska L, Czernik J, Sawicz-Birkowska K, Kazanowska B, Wojciechowska B. Results of p53 analysis in pediatric malignancies in Poland. *Med Pediatr Oncol* 2003; 40:316-21.
- Vujanic GM, Charles AK. Renal tumours of childhood: an update. *Pathology* 2008; 40:217-27.
- Zuppan CW, Beckwith JB, Weeks DA, Luckey DW, Pringle KC. The effect of preoperative therapy on the histologic features of Wilms' tumor. An analysis of cases from the Third National Wilms' Tumor Study. *Cancer* 1991; 68:385-94.
- Beckwith JB, Zuppan CE, Browning NG, Moskness J, Breslow NE. Histological analysis of aggressiveness and responsiveness in Wilms' tumor. *Med Pediatr Oncol* 1996; 27:422-8.
- Faria P, Beckwith JB, Mishra K, et al. Focal versus diffuse anaplasia in Wilms tumor – new definitions with prognostic significance. A report from the National Wilms Tumor Study Group. *Am J Surg Pathol* 1996; 20:909-20.
- Weirich A, Leuschner I, Harms D, et al. Clinical impact of histologic subtypes in localized non-anaplastic nephroblastoma treated according to the trial and study SIOP-9/GPOH. *Ann Oncol* 2001; 12:311-9.
- Vujanic GM, Sandstedt B, Harms D, Kelsey A, Leuschner I, de Kraker J. Revised International Society of Paediatric Oncology (SIOP) Working classification of renal tumors of childhood. *Med Pediatr Oncol* 2002; 38:79-82.
- Camassei FD, Ferlini C, Jenkner A, et al. Nephroblastoma. DNA characteristics and their modification induced by pre-nephrectomy chemotherapy: a cytofluorimetric study. *Pediatr Pathol Mol Med* 2002; 21:15-23.
- Dome JS, Liu T, Krasin M, et al. Improved survival for patients with recurrent Wilms tumor: the experience at St. Jude Children's Research Hospital. *J Ped Hematol Oncol* 2002; 24:192-8.
- Kullendorff CM. Relapses in Wilms tumour. *Pediatr Surg Int* 2003; 19:635-8.
- Kalapurakal JA, Dome JS, Perlman EJ, et al. Management of Wilms' tumour: current practice and future goals. *Lancet Oncol* 2004; 5:37-46.
- Weber PG, Chen J, Nisen PD. Infrequency of ras, p53, WT1, or RB gene alterations in Wilms tumors. *Cancer* 1993; 72:3732-8.
- D'Angelo MF, Kausik SJ, Sebo TJ, Rathbun SR, Kramer SA, Husmann DA. p53 immunopositivity in histologically favorable Wilms tumor is not related to stage at presentation or to biological aggression. *J Urol* 2003; 169:1815-7.
- Cheah PL, Looi LM, Chan LL. Immunohistochemical expression of p53 proteins in Wilms' tumour: a possible association with the histological prognostic parameter of anaplasia. *Histopathology* 1996; 28:49-54.
- El Bahtimi R, Hazen-Martin DJ, Re GG, Willingham MC, Garvin AJ. Immunophenotype, mRNA expression, and gene structure of p53 in Wilms' tumors. *Mod Pathol* 1996; 9:238-44.
- Govender D, Hairlal P, Hadley GP, Chetty R. p53 protein expression in nephroblastomas: a predictor of poor prognosis. *Br J Cancer* 1998; 77:314-8.
- Lahoti C, Thorner P, Malkin D, Yeger H. Immunohistochemical detection of p53 in Wilms' tumors correlates with unfavorable outcome. *Am J Pathol* 1996; 148:1577-89.
- Lemoine NR, Hughes CM, Cowell JK. Aberrant expression of the tumour suppressor gene p53 is very frequent in Wilms' tumours. *J Pathol* 1992; 168:237-42.
- Beniers AJMC, Efferth T, Fuzesi L, Granzen B, Mertens R, Jakse G. p53 expression in Wilms' tumor: a possible role as prognostic factor. *Int J Oncol* 2001; 18:133-9.
- Sredni ST, de Camargo B, Lopes LF, Teixeira R, Simpson A. Immunohistochemical detection of p53 protein expression as a prognostic indicator in Wilms tumor. *Med Pediatr Oncol* 2001; 37:455-8.
- Skotnicka-Klonowicz G, Kobos J, Los E, Trejster E, Szymik-Kantorowicz S, Daszkiewicz P. Prognostic value of p53 expression in Wilms' tumor in children. *Med Sci Monit* 2001; 7:1224-9.
- Pelletier J. Molecular genetics of Wilms' tumor: insight into normal and abnormal renal development. *Can J Oncol* 1994; 4:262-72.
- Malkin D, Sexsmith E, Yeger H, Williams BRG, Coppes MJ. Mutations of the p53 tumor suppressor gene occur infrequently in Wilms' tumor. *Cancer Res* 1994; 54:2077-9.
- Bardeesy N, Falkoff D, Petruzzi MJ, et al. Anaplastic Wilms' tumour, a subtype displaying poor prognosis, harbours p53 gene mutations. *Nat Genet* 1994; 7:91-7.
- Takeuchi S, Bartram CR, Ludwig R, et al. Mutations of p53 in

- Wilms' tumors. *Modern Pathol* 1995; 8:483-7.
28. Bardeesy N, Beckwith JB, Pelletier J. Clonal expansion and attenuated apoptosis in Wilms tumor are associated with p53 gene mutations. *Cancer Res* 1995; 55:215-9.
 29. Beckwith JB, Palmer NF. Histopathology and prognosis of Wilms tumor. Results from the First National Wilms' Tumor Study. *Cancer* 1978; 41:1937-48.
 30. Miller KD. Immunocytochemical techniques. In: Bancroft J, Gamble M, editors. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 5th ed. London: Churchill Livingstone; 2001. p.421-64.
 31. Rhodes A, Miller KD. Internal quality control and external quality assessment of immunocytochemistry. In: Bancroft J, Gamble M, editors. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 5th ed. London: Churchill Livingstone; 2001. p.465-98.
 32. Linden MD, Torres FX, Kobus J, Zarbo RJ. Clinical application of morphologic and immunocytochemical assessment of cell proliferation. *Am J Clin Pathol* 1992; 97:4-13.
 33. Taylor CR, Shi S-R, Chaiwun B, Young L, Imam SA, Cote RJ. Strategies for improving the immunohistochemical staining of various intranuclear prognostic markers in formalin paraffin-sections; androgen receptor; estrogen receptor; progesteron receptor; p53 protein; proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen revealed techniques. *Hum Pathol* 1994; 25:263-70.
 34. Đuričić S. Wilmsov tumor – nastanak, dijagnostika, lečenje i prognoza. Beograd: Zadužbina Andrejević; 2007.
 35. Breslow NE. Wilms tumor: Epidemiology. In: Bertino J, editor. *Encyclopedia of Cancer*, Vol 4. 2nd ed. Philadelphia: Elsevier; 2002. p.533-42.
 36. Grundy P, Green DM, Coppes MJ, et al. Renal tumors. In: Pizzo PA, Poplack DG, editors. *Principles and Practice of Pediatric Pathology*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2002. p.865-93.
 37. Dowell SP, Hall PA. The p53 tumour suppressor gene and tumour prognosis: Is there a relationship? Editorial. *J Pathol* 1995; 177:221-4.
 38. Beckwith JB. Precursor lesions of Wilms tumor: clinical and biological implications. *Med Pediatr Oncol* 1993; 21:158-68.
 39. Moll UM, Ostermeyer AG, Ahomadegbe JC, Mathieu MC, Riou G. p53 mediated tumor cell response to chemotherapeutic DNA damage: a preliminary study in matched pairs of breast biopsies. *Hum Pathol* 1995; 26:1293-301.

IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION OF p53 ONCOPROTEIN IN WILMS TUMOUR IN RELATION TO HISTOLOGICAL COMPONENTS, HISTOLOGICAL TYPES AND PREOPERATIVE CHEMOTHERAPY

Slaviša DJURIČIĆ¹, Dragomir DJOKIĆ¹, Dragana VUJIĆ¹, Gordana BASTA-JOVANOVIĆ², Vera TODOROVIĆ³, Sanja RADOJEVIĆ-ŠKODRIĆ², Slaviša ZDRAVKOVIĆ¹, Gordan M. VUJANIĆ⁴

¹Mother and Child Health Institute of Serbia "Dr Vukan Čupić", Belgrade;

²Institute of Pathology, School of Medicine, Belgrade;

³Institute for Medical Research, University of Belgrade, Belgrade;

⁴Department of Pathology, School of Medicine, Cardiff University, Cardiff, UK

INTRODUCTION There have been only few studies of immunopositivity of p53 in Wilms tumour (WT), and their results are somewhat contradictory.

OBJECTIVE The aim of the study was to determine p53 immunohistochemical expression in WT in relation to its histological components, histological prognostic types classified according to the SIOP Working Classification of Renal Tumours of Childhood (2001), and influence of preoperative chemotherapy.

METHOD The analyses are based on 79 primary WTs treated in single institution according to SIOP protocols between 1983-2001. For the immunohistochemical detection of p53, the monoclonal p53 antibody (DO-7, DAKO) was used. Semiquantitative grading of nuclear staining was done.

RESULTS The immunopositivity of p53 was significantly higher in the blastemal and epithelial than in the stromal component ($p < 0.001$). It was significantly correlated to WT histological prognostic types ($p = 0.039$). The exsivity of p53 immunopositivity was higher in anaplastic components but a difference between WT type of diffuse anaplasia and all other types was nonsignificant ($p = 0.10$). Five blastemal type WTs were p53 immunopositive and four immunonegative.

There was no difference in p53 immunopositivity between WT treated with the preoperative chemotherapy and primary resected WT ($p = 0.88$).

CONCLUSION The immunopositivity of p53 in WT was significantly higher in the blastemal and epithelial than in the stromal component. It was in significant correlation with histological types of WT. The anaplastic component had noticeable but statistically not significantly higher p53 immunopositivity than non-anaplastic. The preoperative chemotherapy did not modify p53 immunopositivity of WT which had been found in other similar studies.

Key words: Wilms tumour; nephroblastoma; classification; tumour suppressor protein p53; immunohistochemistry; chemotherapy

Slaviša ĐURIČIĆ
Institut za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije
„Dr Vukan Čupić“
Radoja Dakića 6, 11070 Beograd
Tel.: 011 3108 231
E-mail: djurisla@sezampro.rs