

# ANGIOGENEZA ȘI MASTOCITELE ÎN LEZIUNILE PROLIFERATIVE BENIGNE DE PROSTATĂ

Global T.

Catedra de histologie, citologie și embriologie  
Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova  
Corresponding author atiana.globa@usmf.md

## Abstract

### ANGIOGENESIS AND MAST CELLS IN THE BENIGN PROLIFERATIVE LESIONS OF THE PROSTATE

**Background:** Angiogenesis is essential for tumor growth and metastasis formation. It is assumed that cancers, after an early vasculogenic phase, acquire ability to induce new vessels formation. Such phenomenon is referred to as angiogenic switch. Angiogenic switch depends on the ability to release specific growth factors stimulating blood vessels formation. The source of those factors is both neoplastic cells and various stromal and immune cells, like mast cells. Mast cells (MCs) produce a lot of pro-angiogenic and tissue-remodeling factors. Recent works showed that angiogenic factors are already expressed by the benign lesions. The aim of our study was to investigate the density of CD34-positive blood vessels and number of tryptase-positive mast cells, as well as to establish correlations between microvessel density and mast cells involved in tumor angiogenesis in prostatic benign lesions.

**Material and methods:** Our study included 7 cases of normal prostate, 25 cases of benign prostatic hyperplasia. MCs and the blood vessels were assessed using double immunostaining CD34/MCT.

**Results:** We have shown a total correlation between that two markers in peritumoral areas ( $p = 0.001$ ,  $p < 0.01$  are considered significant) and absence of significant correlation between CD34 and tryptase in intratumoral areas.

**Conclusions:** Our data, as well as, preferential perivascular localization of mast cells and their potential to secrete vascular endothelial growth factor suggests the involvement of mast cells in pathological angiogenesis process from the stage of benign prostate proliferative lesions.

**Key words:** angiogenesis, tryptase positive mast cells, prostate benign lesions.

## Introducere

Angiogeneza este un proces multifactorial, caracterizat prin formarea de noi vase în condiții normale și patologice. Angiogeneza patologică este o caracteristică distinctivă a cancerului, fiind parte fundamentală a proceselor de progresie, invazie, și metastazare a cancerului. În același timp, angiogeneza este un eveniment complex mediat de factorii angiogenici eliberați din celulele canceroase și celulele imune al gazdei.

Un rol important par să joace interrelațiile celulelor tumorale cu diferiți constituenți celulari ai stromei înconjurătoare, contribuind și ele în acest mod la inducerea indirectă a angiogenezei. La momentul dat, mastocitele rămân încă a fi unele dintre cele mai misterioase celulele cu un rol în inițierea și progresia angiogenezei tumorale. Mastocitul pare a fi un promotor al angiogenezei normale și tumorale [1].

Mulți factori angiogenici, inclusiv VEGF, bFGF și factorul de creștere derivat din trombocite, au fost raportați ca stimulatori ai migrării mastocitare. Hipoxia ar putea determina celulele tumorale să elibereze factori angiogenici, care la rândul lor ar putea determina mastocitele să migreze în zonele hipoxice ale tumorii. După migrarea în zonele hipoxice, mastocitele ar putea produce factori angiogenici, care stimulează infiltrarea sporită cu mastocite [2].

Chiar dacă inițial angiogeneza tumorală a fost considerat că apare numai după ce tumora a devenit invazivă, lucrările recente au arătat că factorii angiogenici sunt deja secretați în leziunile benigne. Astfel fenotipul angiogenic din ce în ce mai mult nu este neapărat o caracteristică a tumorilor invazive.

Din motivele descrise mai sus, ne-am propus să efectuăm studiul microdensității vasculare și să stabilim corelații între microdensitatea vasculară și mastocitele implicate în angiogeneza patologică din leziunile benigne prostatice.

## Material și metode

Studiul dat a inclus un număr de 25 pacienți diagnosticați cu patologie benignă de prostată. Lotul de control a fost reprezentat de specimene preluate (în primele 24 ore de la deces) de la 7 persoane decedate accidental, fără istoric de patologie de prostată.

Piesele cu patologie prostatică au fost prelevate de la pacienți prin operație deschisă, TUR, după care au fost prelucrate conform tehnicii histologice. Fragmentele biopsice au fost fixate în formalină tampornată și procesate standard. Secțiuni din fiecare caz au fost inițial colorate cu hematoxilină eozină pentru diagnosticul histopatologic. Din punct de vedere imunohistochimic am folosit dubla imunocolorare CD34/MCT (triptaza mastocitară). Demascarea prin căldură, timp de 30 minute, cu soluție pH6 (Leica Biosystems, Newcastle upon Tyne, UK) a fost urmată de blocarea peroxidazei endogene cu apa oxigenată 3% – timp de 5 minute, incubarea cu anticorpul primar anti-triptaza mastocitară (Dako Glostrup Denmark, diluție 1:300, clona AA1, 30 minute), vizualizare (sistemul The NovoLink Max Polymer Detection System Leica Biosystems, Newcastle upon Tyne, UK) și aplicarea cromogenului 3,3 – diaminobenzidina. Tehnica a continuat cu blocarea peroxidazei endogene cu apa oxigenată 3% – timp de 5 minute, aplicarea celui de al doilea anticorp anti-CD34 (Dako Glostrup Denmark, monoclonal mouse anti-human, clona 1A4, prediluat) – 30 minute, vizualizare cu același sistem și aplicarea timp de 10 minute a cromogenului VINA Green (Biocare Medical, LLC, Concord, CA 94520, USA). Contracolorarea s-a realizat folosind hematoxilină Lillie modificată. Am cuantificat structurile vasculare cu lumen, pozitive pentru CD34 – colorate verde cu o distribuție citoplasmatică în celulele endoteliale. Semnalele pozitive pentru triptaza mastocitară, brune, au fost observate la nivel citoplasmatic, cu pattern granular.

Pentru evaluarea microscopică am folosit microscopul Nikon Eclipse E 600, iar imaginile au fost achiziționate utilizând sistemul Lucia G. Cuantificarea s-a făcut prin metoda hot-spot, care este cea mai utilizată metodă manuală de cuantificare a vaselor sangvine și a mastocitelor.

La microscopul optic ariile de cuantificare au fost alese la o mărire x200, ceea ce a corespuns la o suprafață de 0,74 mm<sup>2</sup>. Metoda a constat în alegerea a trei zone cu densitatea mastocitară cea mai mare, numărarea mastocitelor din interiorul acestora fiind urmată de realizarea mediei aritmetice. S-a urmărit densitatea mastocitară atât intranodular (intratumoral), cât și în ariile perinodulare (peritumorale). Analiza statistică a fost efectuată cu ajutorul softurilor SPSS13.0 și Microsoft Excel 2010.

## Rezultate și discuții

Distribuția vaselor sanguine CD34 pozitive și a mastocitelor în prostata normală.

În specișenele cu țesut normal, mastocitele erau prezente în toate zonele topografice, atât intralobular, cât și perilobular. Mastocitele erau mai numeroase în jurul vaselor sanguine și în apropierea de membrana bazală la interfața stromei cu epiteliul glandular. Mastocitele din ariile perilobulare au prezentat un grad crescut de degranulare, comparativ cu cele din ariile intralobulare. În urma calculării efectuate am stabilit că densitatea mastocitelor în stroma prostatei în normă a fost  $18,8 \pm 1,5$ , iar a vaselor CD34 pozitive a fost  $15,1 \pm 1,1$ . Vasele sangvine CD34 pozitive au fost răspândite uniform în toată stroma cu predominare ușoară în ariile intralobulare ( $16,5 \pm 1,3$  versus  $13,7 \pm 1,7$ ). Morfologic se descriu ca vase mature, cu un lumen larg, rare ramificații, perete bine conturat. Periacinar vasele au avut un calibru mic și au prezentat cavități atât în secțiunea transversală, cât și longitudinală. Vasele perilobulare au fost cu certitudine mai largi.

Densitatea maximală vasculară a fost observată în lama proprie a uretrei, porțiunea prostatică, unde MVD s-a situat între 39 și 46 de vase pe câmp, x 200. Remarcăm că, aceasta a fost zona și cu densitatea maximă a mastocitelor – 43-45/câmp.

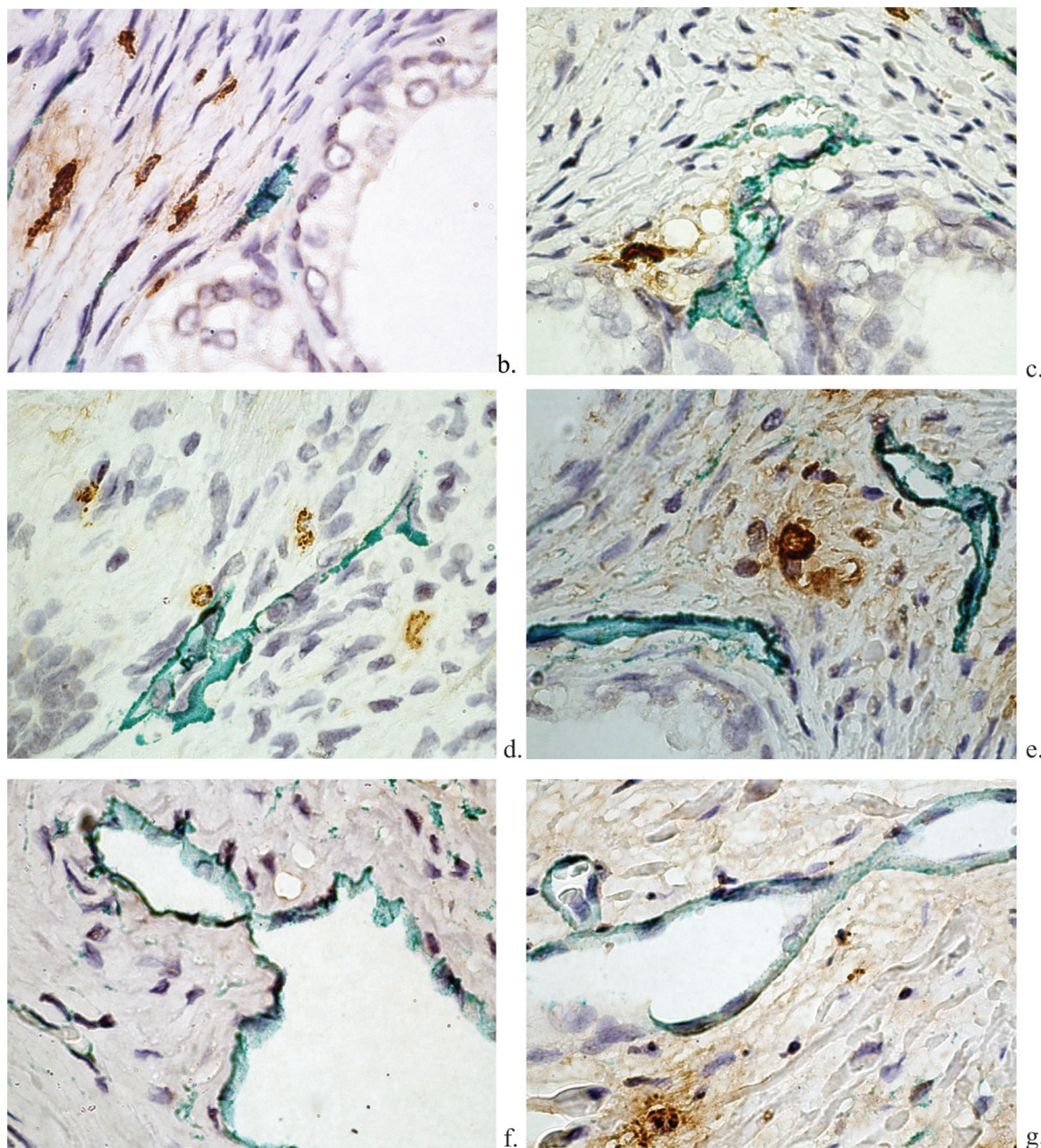
Distribuția vaselor sanguine CD34 pozitive și a mastocitelor în leziunile benigne.

În interiorul ariilor de hiperplazie am observat un număr crescut al celulelor CD34+. Uneori s-au putut evidenția grupuri mici de celule endoteliale, care formau cordoane scurte neperfuzabile. Celulele endoteliale prezentau adesea aspecte de activare: citoplasmă bine reprezentată, contur neregulat, nucleu oval eucromatic (fig.1).

Vasele de dimensiuni mari și medii au dominat ariile perinodulare, De notat că pentru stroma intratumorală au fost caracteristice vasele de talie medie și mică, cu o reacție pozitivă intensă la CD34.

Perinodular, în unele vase de calibru mare, s-a constatat, de asemenea, o heterogenitate a reacției pozitive pentru CD34, nu toate celulele de pe circumferința vaselor fiind pozitive. Densitatea celulelor CD34+ nu a fost mare.

În urma calculării efectuate am stabilit că densitatea intranodulară a vaselor CD34+ a fost mai mare ( $28,5\pm 1,1$ ) față de densitatea perinodulară ( $19,3\pm 1,03$ ). Contrar acesteia, densitatea mastocitelor a fost crescută perinodular ( $30,3\pm 2,4$ ) față de densitatea intranodulară ( $23,7\pm 1,5$ ).



**Fig. 1. Celule CD34+ (a), grupuri mici de celule endoteliale, care formau cordoane scurte neperfuzabile (b, c, d), vase sanguine CD34 pozitive cu elemente de sprouting (f, g). Imunoreacție pentru CD34/Triptază, Vina Green /DAB.**

Distribuția mastocitelor nu se deosebea semnificativ de rezultatele obținute în prostata normală. Mastocitele triptază pozitive au fost omniprezente atât în stroma intranodulară, cât și stroma perinodulară. Intranodular mastocitele au fost mai numeroase la interfața stromei cu epiteliul glandular. În papilele conjunctive ale epiteliului glandular mastocitele însoțeau vasele sanguine ale microcirculației.

În 7 cazuri (28%) de hiperplazie benignă am observat că ariile densității maxime a vaselor sanguine CD34 pozitive nu au coincis cu ariile densității maxime a mastocitelor (fig. 2).

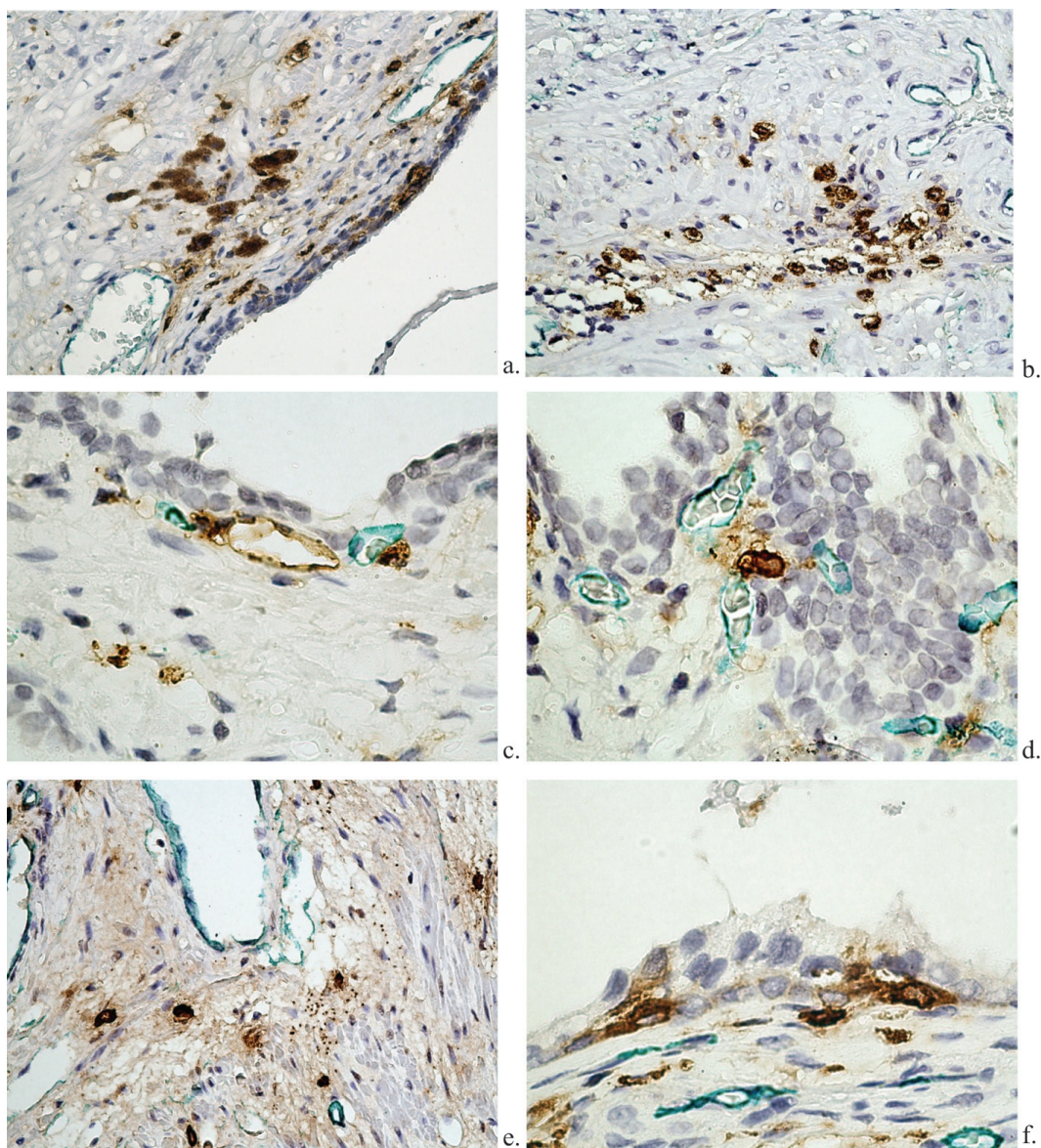


Fig. 2. Densitate crescută de mastocite ce nu corespund densității maxime de vase (a, b); mastocite localizate în jurul vaselor sanguine CD34 pozitive cu localizare intranodulară (c, d); mastocite ce prezintă un grad crescut de degranulare perinodular (e) comparativ cu aria intranodulară (f). Imunoreacție pentru CD34/Triptază, Vina Green /DAB.

Datele despre densitățile totale a mastocitelor și a vaselor sanguine CD34 pozitive în leziunile proliferative benigne au fost oglindite în tabelul 1.

**Tabelul 1**

**Densitatea vaselor sanguine CD34+ și a mastocitelor din stroma conjunctivă/tumorală în leziunilor proliferative benigne prostatice**

	Cazuri control (normă)	BHP
Vase CD34+	15,1±1,1 n=7	23,9±0,9 n=25
Mastocite	18,8±1,5 n=7	27,1±1,5 n=25

Analizînd rezultatele obținute în leziunile proliferative benigne am considerat oportun să realizăm corelația dintre expresia intranodulară și perinodulară pentru CD34. Astfel nu s-a obținut o corelație

semnificativ statistică. În schimb, s-a observat o corelație directă și totală pentru mastocitele din ariile intranodulare și perinodulare ( $p=0.005$ , unde valorile  $p<0.01$  sunt considerate semnificative).

Ulterior, am considerat utilă corelația densității mastocitelor triptază pozitive și a vaselor CD34 pozitive din ariile perinodulare, în absența unei corelații a acestora în ariile intranodulare. Astfel, perinodular corelația dintre cei doi markeri a fost directă și totală ( $p=0.001$ , unde valorile  $p<0.01$  sunt considerate semnificative).

Hiperplazia benignă de prostată (BPH) și adenocarcinomul de prostată (PCa) sunt cele mai comune tumori benigne și maligne, a bărbaților în vârstă; și în aproximativ 20% din cazuri, ele pot coexista în aceeași zonă de prostată [3]. Acestea ar trebui să fie considerate boli cronice care pentru inițiere și progresie necesită timp îndelungat. BPH necesită o perioadă lungă de evoluție, de la o simplă hiperplazie micronodulară la un volum macroscopic extins, ca apoi să se manifeste clinic [4]. În mod similar, PCa evoluează în decursul unei perioade lungi de timp prin multiple modificări ale leziunilor precanceroase. Deși patogeneza BPH și PCa nu este încă pe deplin înțeleasă și mai multe mecanisme par a fi implicate în dezvoltarea și progresia ambelor patologii. Există multiple dovezi care vorbesc despre rolul deosebit al inflamației cronice de prostată în dezvoltarea și progresia acestor afecțiuni.

Diagnosticarea întârziată a PCa este cauza principală a tratamentului eșuat. Recunoașterea precoce în baza markerilor biologici ar putea fi de un mare ajutor în identificarea diferențelor biologice dintre leziunile benigne și maligne, care ar facilita și mai mult indicațiile pentru tratament.

Creșterea tumorii și a metastazelor depind de angiogeneza tumorală, care se bazează pe o creștere de noi vase spre și în interiorul unei tumori [5]. Angiogeneza patologică caracterizează atât leziunile maligne, cât și pe cele benigne. Angiogeneza este un proces extrem de complex. În inițierea și reglarea acestui proces sunt implicate diverse mecanisme umorale și celulare. Microcirculația tumorilor este heterogenă și constă din vase de neo-vascularizație, precum și vase cooptate (de exemplu vasele originale ale organului implicat în procesul de cancerogeneză).

Vascularizația în leziunile proliferative benigne din studiul nostru a fost caracterizată prin prezența a două tipuri de vase sangvine: vase care morfologic nu se deosebeau semnificativ de cele din țesutul normal (vase preexistente invadate de țesutul hiperplazic) și vase cu arhitectură total diferită (vase tumorale, componente ale procesului de neo-angiogeneză). Primul tip de vase a fost localizat în special în zonele perinodulare. Vasele perinodulare CD34 pozitive au fost bine delimitate, cu contur regulat, perete gros, lumen larg, puține ramificații, circumscriau zona tumorală. Tipul doi de vase, prin prisma definițiilor lor histologice, nu au putut fi încadrate ca cele de tip normal. Vasele prezentau perete subțire, lumen neregulat. Acestea erau ramificate, cu aspect de "înmugurire" și cu fenomen de sprouting (fig. 1). Astfel de vase caracterizau stroma intranodulară, precum și periferia nodulului hiperplazic.

Uneori, unele tumori formează niște canale care imită funcția vaselor sangvine și care nu sunt tapetate de endoteliocite. Ele pot fi căptușite cu celule tumorale sau sunt compuse din componentele structurale matriceale. De cele mai multe ori aceste canale formează anastomoze cu vasele sangvine. Acest fenomen a fost numit mimetism vascular. [6].

Cea mai facilă metodă de cuantificare microscopică a angiogenezei tumorale este stabilirea microdensității vasculare pe preparate colorate imunohistochimic pentru markeri endoteliali [7, 8]. Microdensitatea vasculară reprezintă un parametru important al angiogenezei tumorale, dar nu interpretat izolat. Astfel, neovascularizare poate fi stimulată de factori eliberați de celulele tumorale, celulele inflamatorii asociate tumorilor, și / sau de matricea extracelulară.

Mastocitul reprezintă una dintre cele mai controversate celule ale stromei, rolul căreia este complex și nu pe deplin înțeles. Multiplele studii demonstrează legătura dintre mastocite și procesul tumoral datorită acțiunii citotoxice asupra celulelor tumorale [9, 10], dar și datorită capacității de a secreta produși cu efect anti-tumoral [11]. S-au obținut multiple rezultate contradictorii despre acumularea mastocitelor în jurul tumorilor, ceea ce face ca acest subiect să devină unul cotroversat. Nu se știe cu certitudine dacă mastocitele au rolul de a stimula sau inhiba răspândirea celulelor tumorale [12], totuși s-a observat corelația între mastocite și rata de supraviețuire în diverse cancere [13]. Foarte puțină atenție s-a acordat rolului mastocitelor la pacienți cu tumori maligne ale prostatei. Datele din literatură sunt cotroversate, unele arătând o creștere a numărului de mastocite în adenocarcinom [14, 15], iar altele susțin că numărul acestor celule nu se modifică sau este scăzut [16].

Mastocitele pot contribui la dezvoltarea tumorii prin diverse mecanisme, cum ar fi inducerea imunosupresiei, angiogenează și mitogenează, precum și prin degradarea matricei extracelulare prin intermediul proteinazelor. [17]. Lipsa de informații referitor la rolul mastocitului în transformările benigne și maligne de prostată derivă din caracteristica incompletă a fenotipului mastocitar nu numai în leziunile benigne sau maligne, dar și din stroma normală. Tehnicile imunohistochimice, cele mai des descrise și folosite, ce includ anticorpii anti-triptază și anti-chimază, permit diferențierea celor două subtipuri de mastocite (MCTC și MCT). Densitatea mastocitelor triptază pozitive crește cu progresia tumorală și sunt localizate în contact strâns cu vasele nou formate. Vascularizația are o creștere liniară în raport cu creșterea displaziei în cancerele invazive. L. Benítez și colaboratorii, 2001, sugerează, că mastocitele triptază pozitive pot regla neoangiogeneza în cancerul de col uterin. [18]. Triptaza mastocitară stimulează inflamația și recrutarea fibroblastelor la nivelul zonei de fibroză tumorală și determină de asemenea o limitare a creșterii tumorii și metastazării [19]. Toate aceste aspecte sugerează că triptaza mastocitară mediază fibroza și angiogeneza (care se corelează cu un răspuns la chimioterapie), și ar putea fi responsabilă de un pronostic bun, aspect observat în special în cancerul ovarian [20].

Frecvent, aceste celule aderă intim la membrana bazală a endoteliului vascular. În mai multe cazuri au fost remarcate infiltrate cu mastocite sub epiteliul glandular, precum și în epiteliul glandular, printre celulele secretorii intens proliferate. Dimensiunile mastocitelor triptază pozitive au fost ceva mai mari ca în stroma normală, și au prezentat un grad crescut de degranulare (observat prin pigmentul brun din jurul mastocitului). Perinodular, mastocitele erau localizate preponderent uniform, în jurul vasului aveau tendința de formare a unor grupuri mici de celule. Și în aceste arii am constatat un grad înalt de degranulare a mastocitelor (fig.2).

Rezultatele obținute, precum și dispoziția preferențială perivasculară a mastocitelor și potențialul acestor celule de a secreta factor endotelial de creștere vasculară sugerează implicarea mastocitelor în procesul de angiogenează patologică încă din stadiul leziunilor proliferative benigne.

## Concluzii

Mastocitele peritumorale inițiază proliferarea vasculară îndreptată spre interiorul leziunii proliferative. Odată acest proces început este susținut în continuare, iar rețeaua nou formată favorizează în timp transformarea malignă.

## Bibliografie

1. Coussens LM, Werb Z. Cancer and inflammation. *Nature*;420(6917):860–7. 2002.
2. Michailidou E.Z, Markopoulos A.K, Antoniadis D.Z. Mast Cells and angiogenesis in oral malignant and premalignant lesions, *Open Dent J*; 2: 126–132. 2008.
3. B. Djavan, E. Eckersberger, G. Espinosa, et al. Complex mechanisms in prostatic inflammatory response. *Eur Urol Suppl*. 2009;8:872-878.
- A. Sciarra, F. Di Silverio, S. Salciccia, et al. Inflammation and chronic prostatic diseases: evidence for a link?. *Eur Urol*. 2007;52:964-972.
4. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 4-6.
5. Folberg R, Maniotis AJ. Vasculogenic mimicry. *APMIS* 2004; 112: 508-525.
6. Sharma S, Sharma MC, Sarkar C. Morphology of angiogenesis in human cancer: a conceptual overview, histoprostic perspective and significance of neoangiogenesis. *Histopathology* 2005; 46: 481-489.
7. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, et al. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumors. *Eur J Cancer* 2002; 38: 1564-1579.
8. Ghiara P, Boraschi D, Scapigliati G, Taddei C and Tagliabue A. In vitro generated mast cells express natural cytotoxicity against tumor cells. *Immunology*, 1985, 55:317-224.
9. Farram E., Nelson DS. Mouse mast cells as anti-tumor effector cells. *Cell Immunol* 1980, 55:294-301.
10. Henderson WR, Chi EY, Jong EC and Klebanoff SJ Mast cell-mediated tumor cell cytotoxicity – role of the peroxidase system. *J Exp Med* 1981, 153:520-533.
11. Dimitriadou V and Koutsilieris M. Mast cell-tumor cell interactions: for or against tumor growth and metastasis? *Anticancer Res*, 1997, 17:1541-1549.
12. Tomita M, Matsuzaki Y and Onitsuka T. Correlation between mast cells and survival rates in patients with pulmonary adenocarcinoma. *Lung Cancer*, 1999, 26:103-108.