

# ANALIZA IMUNOHISTOCHEMICALĂ A MACROFAGELOR CD68<sup>+</sup> DIN STROMA CARCINOMULUI DE PROSTATĂ

Globa Tatiana<sup>1,2</sup>, Globa Lilian<sup>3</sup>, Pelin Elina<sup>1</sup>, Globa Pavel<sup>4</sup>, David Valeriu<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Catedra de histologie, citologie și embriologie, USMF "Nicolae Testemițanu", Republica Moldova;

<sup>2</sup>Laboratorul de morfologie, USMF "Nicolae Testemițanu", Republica Moldova;

<sup>3</sup>Catedra de anatomie și anatomie clinică, USMF "Nicolae Testemițanu", Republica Moldova;

<sup>4</sup>Catedra de biochimie și biochimie clinică, USMF "Nicolae Testemițanu", Republica Moldova;

tatiana.globa@usmf.md

## Abstract

**Background:** Prostate adenocarcinoma often is accompanied by chronic inflammatory processes. Inflammatory cells, in a certain phase of inflammation, achieve a cooperative relationship not only with the tumor cells, but also with the stromal and endothelial cells, in the idea of creating of the suitable microenvironment for the development and progression of cancer. The aim of the study was the quantitative and qualitative characterization, as well as identification of the prognostic value of CD68<sup>+</sup> macrophages in prostate adenocarcinoma.

**Material and methods:** Our study included a number of 73 biopsies from patients with a prostate cancer. Specimens were fixed in buffer formalin and paraffin embedded. For immunostaining were used the monoclonal antibody anti-CD68. Macrophages were quantified in the peritumoral and intratumoral areas of the prostate cancer stroma. The results were analysed statistically.

**Results:** The high total density of macrophages was largely determined by the increased number of macrophages in the intratumoral areas. To assess the prognostic value of macrophages in the prostate adenocarcinomas was accomplished a correlation between the total number of CD68<sup>+</sup> macrophages and the Gleason score, thus were obtained a statistically significant correlation ( $p = 0.001$ ). Also, statistically significant correlation was obtained ( $p = 0.001$ ) between peritumoral CD68<sup>+</sup> macrophage density and intratumoral CD34<sup>+</sup> vessels.

**Conclusions:** The increase in CD68<sup>+</sup> macrophage density and the significant association of their density with the histological grade of the tumor allows us to consider these cells as a prognostic factor in prostate carcinomas.

**Key words:** prostate cancer, macrophage, CD68<sup>+</sup> cells, TAM, stroma.

---

## Actualitatea

Procesul inflamator cronic este o condiție importantă pentru dezvoltarea tumorii, iar celulele sistemului imun influențează procesul de cancerogeneză atât în sens pozitiv, cât și negativ [1,2]. Micromediul tumoral este infiltrat, în principal, de macrofage, neutrofile, celule natural killer (NK), celule dendritice, mastocite, limfocite T și B. Aceste celule sunt atrase de citokinele pro-inflamatorii secretate de celulele tumorale [3]. Procesul de inflamație cronică este orchestrat de o varietate mare de molecule, precum: chemokinele, citokinele, factorii de creștere, oxigenul reactiv, etc. Toate aceste molecule pot declanșa angiogeneza tumorală, deteriorarea ADN-ului, mutații genice, precum și perturba homeostazia locală [4]. Macrofagele reprezintă celulele imune implicate în reglarea procesului inflamator. Ele predomină în micromediul tumoral.

Macrofagele sunt celule ce aparțin seriei mieloide și care derivă din progenitorii CD34<sup>+</sup> ai măduvei osoase [5]. Ele au o capacitate remarcabilă de a recunoaște și de a răspunde la o gamă largă de stimuli, exprimând o varietate de receptori intracelulari și de suprafață. Macrofagele sunt celule active cu o durată lungă de viață, capabile să-și moduleze proprietățile la contactul lor cu diverse tipuri de celule, dar și cu matricea extracelulară. Heterogenitatea intrinsecă a macrofagelor este determinată de interacțiunile reciproce realizate cu celulele vecine, inclusiv macrofagele locale, diverse microorganisme, particule sterile și mediatori solubili.

Macrofagele asociate tumorii (TAM) au un rol semnificativ în inițierea și progresia tumorii. Cu toate acestea, semnificația clinică a TAM în diferite tipuri de cancer nu este încă pe deplin determinată. Studiul nostru a fost conceput pentru a determina dacă densitatea TAM poate fi considerat factor de prognostic la bărbații cu cancer de prostată supuși prostatectomiei radicale.

## Material și metode

Studiul dat a inclus un număr de 73 cazuri de carcinom de prostată. Gradarea histologică a carcinomului de prostată reprezintă un pas important în definirea diagnosticului și prognosticului. Specimenele cu carcinom au fost divizate în 2 grupe: adenocarcinoame acinare și carcinoame non-acinare. Adenocarcinoamele acinare au fost diferențiate histologic, cu aplicarea scorului Gleason, în: bine-diferențiate (Gleason 2-5), mediu-diferențiate (scor Gleason 6-7) și slab-diferențiate (scor Gleason 8-10). Carcinoamele non-acinare au fost considerate cancere slab-diferențiate. Fragmentele biopsice, după fixare în formalină tamponată 10%, au fost procesate primar respectând procedurile standard. Din fiecare bloc s-au realizat secțiuni cu grosimea de 5μm, care au fost montate pe lame histologice și lame silanate (pentru colorațiile imunohistochemice). Profilul histopatologic s-a realizat pe secțiuni colorate cu hematoxilină-eozină.

Studiul imunohistochimic a inclus anticorpul monoclonal anti-CD68 (clona 514H12, prediluat, Leica Biosystem Newcastle Ltd, Newcastle Upon Tyne, UK). Aplicarea anticorpului primar a fost precedată de demascarea prin Bond Epitope Retrieval Solution 2 – 20 minute. După incubarea cu anticorpul primar – 20 minute, a fost utilizat sistemul de lucru compatibil de tip Bond Polymer Refine Detection System (Leica Biosystems, Newcastle Upon Tyne, UK) pentru vizualizare, iar cromogenul folosit a fost 3,3" diaminobenzidina dihidroclorid. Contracolorarea s-a realizat cu hematoxilină Lille's modificată. Întreaga tehnică imunohistochimică s-a efectuat cu DakoCytomation Autostainer. Produsul final al reacției a constat în colorarea celulelor în brun. Macrofagele CD68+ au fost analizate în ariile peritumorală și intratumorală. Examinarea microscopică a fost realizată folosind microscopul Nikon Eclipse E600.

Densitatea celulelor CD68+ a fost studiată prin metoda hot-spot. Inițial, era identificat câmpul cu cea mai mare densitate celulară, la o mărire microscopică x100, ulterior celulele imunomarcate au fost numărate în 3 câmpuri, la mărirea microscopică x400. Valoarea medie a celor trei câmpuri a fost utilizată ca date pentru analiză. Din evaluare au fost excluse macrofagele CD68+ localizate în apropierea ariilor de necroză sau asociate infiltratului inflamator. Analiza statistică a fost efectuată cu ajutorul softurilor SPSS22.0 și Microsoft Excel 2010.

## Rezultate și discuții

Studiul imunohistochimic a evidențiat densitate crescută a macrofagelor CD68+ în stroma carcinomului de prostată comparativ cu țesutul prostatic normal (tabel 1). Distribuția macrofagelor în țesuturile prostatice normale era uniformă, în timp ce în stroma leziunilor hiperplazice maligne a fost neomogenă peritumoral și în special intratumoral, ceea ce indirect demonstrează implicarea activă a macrofagelor în procesul de inițiere și progresie a tumorii.

**Tabelul 1. Repartizarea densității totale al celulelor CD68+ în normă și carcinomul de prostată**

| Imunomarcaj     | Diagnostic histologic |                        |
|-----------------|-----------------------|------------------------|
|                 | Pn (n=12)             | CPa (n=73)             |
| Macrofage CD68+ | <sup>a</sup> 4,8±1,7  | <sup>a</sup> 58,7±31,3 |

<sup>a</sup> – media ± deviația standard; Pn – prostata normală; CPa – carcinomul de prostată

La compararea densității macrofagelor din ariile peritumorale cu cele intratumorale s-a obținut o corelație parțială (Spearman,  $p=0,001$ ). Densitatea totală mare a macrofagelor în carcinoamele de prostată, în mare parte, a fost determinată de numărul crescut al macrofagelor din ariile intratumorale (tabel 2).

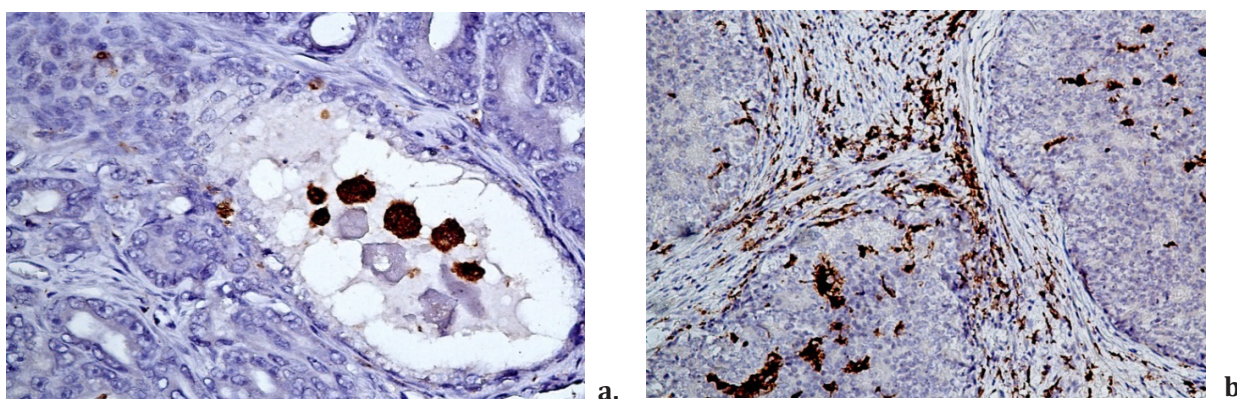
**Tabelul 2. Densitatea medie a macrofagelor CD68+ în specimenelor cu carcinom din arile studiate**

| n*                            | Macrofage CD68+ |             |
|-------------------------------|-----------------|-------------|
|                               | Intratumoral    | Peritumoral |
| 73                            | 72,7±4,7        | 44,7±5,0    |
| <i>t = 4,456 p &lt; 0,001</i> |                 |             |

\*n – număr de cazuri incluse în studiu, p – valoare obținută prin test Student

Localizarea preferențială a celulelor CD68+ a fost: de-a lungul marginii de invazie a tumorii, în stroma asociată tumorii, precum și în aria celulelor canceroase, inclusiv în lumenul acinilor glandulari transformați (Figura 1). Frecvent în arile de necroză au fost remarcate grupuri mici de celule CD68+.

Densitatea macrofagelor CD68+ în raport cu gradul histologic de diferențiere a adenocarcinoamelor a înregistrat o creștere liniară atât intratumoral cât și peritumoral. Excepție, carcinoamele cu celule mici, unde densitatea maximă a celulelor CD68+ a fost peritumoral (Figura 2).



**Fig. 1. Caracterul heterogen al distribuției macrofagelor CD68+ în stroma leziunilor hiperplazice maligne:**

a)×20; b)×10; Imunoreacție pentru anti-CD68, DAB

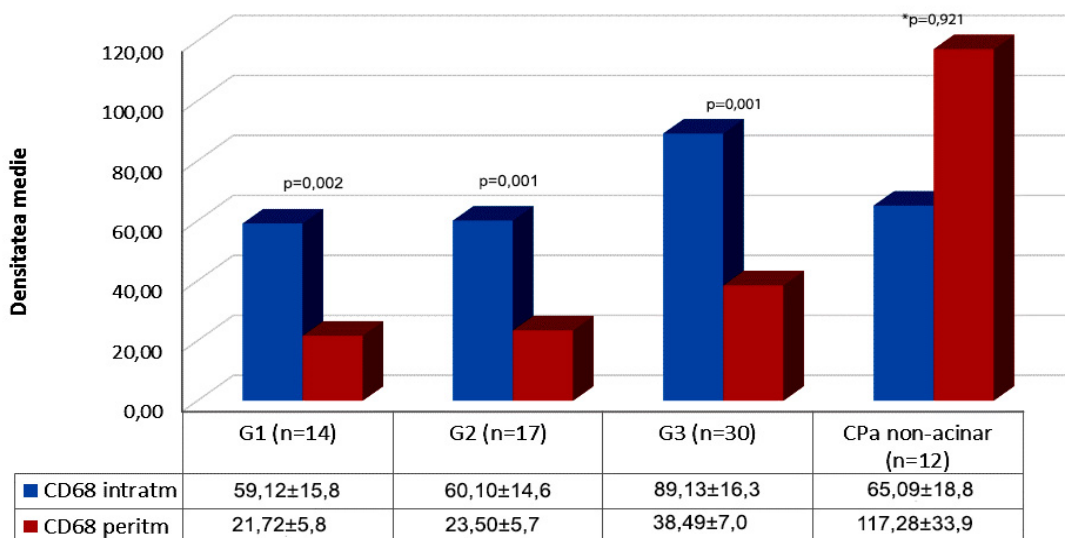
Pentru estimarea impactului prognostic al macrofagelor în adenocarcinoamele de prostată, s-a realizat corelația dintre numărul total de celule CD68+ și scorul Gleason, care a fost statistic semnificativ ( $p=0,001$ ). La împărțirea corelației pe zone intratumorale și peritumorale, au fost obținute corelații statistic semnificative atât intratumoral ( $p=0,008$ ), cât și peritumoral ( $p=0,001$ ).

Date similare asupra densității macrofagelor au fost observate de Gollapudi și colab. [6], care au relatat despre niveluri crescute de TAM în neoplazia intraepitelială prostatică comparativ cu țesuturile din leziunile benigne de prostată. Totodată, Gollapudi și colab. [6] au observat că la pacienții cu scor Gleason mare densitatea macrofagelor a fost cea mai crescută. Multiplele studii clinice au evidențiat existența corelației între densitatea TAM și pronosticul procesului tumoral [7,8]. De asemenea, foarte important este faptul că, TAM-urile din diferite compartimente tumorale, aparent, au efecte opuse asupra progresiei cancerului de prostată [7,8].

Studiind aspectul morfologic al macrofagelor CD68+, au fost descrise două populații celulare, ce se deosebeau prin: dimensiuni, localizare și structură. În literatura de specialitate se regăsesc date despre două stări de polarizare ale macrofagelor: fenotipul M1 și fenotipul M2. Macrofagele asociate tumorii (TAM), în principal, reprezintă o varietate a fenotipului M2, deși în literatură ele au fost descrise și cu fenotipul mixt M1 și M2 [9]. Fenotipul M1, indus de TNF- $\alpha$ , factorul de stimulare a coloniilor de granulocite-macrofage (GM-CSF) și IFN- $\gamma$ , este considerat proinflamator. Acesta secretă factori inflamatori, precum, IL-12 și IL-23. Fenotipul M1 de macrofage este implicat și în

patogeneza tumorală, îmbunătățind potențialul metastatic al celulelor canceroase prin activarea semnalelor factorului nuclear- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) [10]. Totuși, contribuțiile macrofagelor M1 la dezvoltarea tumorii rămâne a fi încă un subiect de discuție. Fenotipul M2, indus de IL-4, IL-13 și glucocorticoizi, este implicat în procesele biologice de angieneză, remodelare tisulară, vindecarea rănilor [11]. Mai mult, macrofagele M2 promovează în mod special angiogeneza tumorală, care facilitează creșterea și metastazarea tumorii, precum și remodelarea matricei extracelulare și imunosupresia [12]. Datorită unei comutări continue între fenotipurile M1 și M2 este dificil și complex să se distingă fenotipul macrofagului.

### Densitatea medie a celulelor CD68+ în stroma specimenelor cu carcinom de prostată



**Fig. 2. Densitatea medie a celulelor CD68+ în stroma carcinoamelor de prostată, unde:**  
*G1 - adenocarcinom bine diferențiat (Gleason 3-5), G2 - adenocarcinom mediu diferențiat (Gleason 6-7),  
 G3 - adenocarcinom slab sau nediferențiat (Gleason 8-10), CPa - carcinom de prostată;*  
 \* între grupele comparate nu au fost stabilite deosebiri veridice

Particular, a fost observată circumscrierea de către celulele CD68+ a simpexioanelor prostatice, ceea ce sugerează, indirect, despre modificările din compoziția secretului glandular.

În raport cu vasele sangvine, macrofagele CD68+ au fost localizate în grosimea peretelui vascular și foarte rar printre celulele endoteliale. A fost obținută corelație statistic semnificativă ( $p=0,001$ ) între densitățile celulelor CD68+ peritumorale și vasele CD34+ intratumorale. Numeroase studii au demonstrat că macrofagele asociate tumorii sunt producători majori de factori proangiogenici în multe tumori maligne [13]. Acestea influențează formarea capilarelor de novo prin diferite mecanisme. În primul rând, macrofagele produc și secretă numeroase citokine pro-angiogenice, cum ar fi: VEGF, TGF- $\beta$ , TGF- $\alpha$ , FGF-2, factor de necroză tumorală- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) și interleukine (IL-6 și IL-8), care influențează proliferarea, migrarea și diferențierea celulelor endoteliale [14]. De asemenea, citokinele secretate de macrofage au efect stimulator asupra celulelor din stroma tumorală, influențând formarea unui micromediu potrivit pentru angieneză [13].

Un al doilea mecanism prin care macrofagele modulează angiogeneza este producția de metaloproteinază-9 (MMP-9), care modificând matricea extracelulară, la rândul său, este capabilă să influențeze forma și morfologia celulelor endoteliale. Mai mult, MMP-9 și alte proteaze secretate de TAM, susțin invazia activată a celulelor endoteliale și migrarea altor celule stromale [15].

Un al treilea mecanism este producerea de inhibitori ai angiogenezei, inclusiv trombospondina-1 (TSP-1) [16].

Pentru evidențierea interrelațiilor dintre alte celulele imune din stroma adenocarcinoamelor densitățile macrofagelor au fost corelate cu densitățile mastocitelor. Astfel, au fost obținute

următoarele corelații statistic semnificative între macrofagele CD68+ peritumorale cu mastocitele triptază-pozitive, atât intratumoral ( $p=0,001$ ), cât și peritumoral ( $p=0,037$ ).

## Concluzii

Macrofagele CD68+ din stroma adenocarcinoamelor de prostată sunt cele mai numeroase celule inflamatorii. Macrofagele asociate tumorii secretă o varietate mare de mediatori inflamatori, precum chemokine, factori de creștere, citokine pro- și antiinflamatorii, proteaze, care contribuie la creșterea tumorii prin remodelarea matricei extracelulare, modulare angiogenezei și prin procesele de suprimare imună. Macrofagele CD68+ din stroma carcinoamelor de prostată sunt diferite de macrofagele din stroma prostatei normale. Interacțiunile dintre macrofage și alte celule imune (mastocite, celule dendritice) în stroma tumorală a carcinomului de prostată pot contribui la reprogramarea bilaterală a acestor celule, ceea ce duce la secreția unui set diferit de substanțe biologice active, care permit supraviețuirea și dezvoltarea celulelor tumorale.

## Bibliografie

1. Disis ML. Immune regulation of cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28:4531-4538.
2. Taniguchi K., Karin M. NF- $\kappa$ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age. *Nat Rev Immunol.* 2018;18:309-324.
3. Luster AD., Alon R., von Andrian UH. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *International Congress.* 2005;1271:135-138.
4. Wang J., Li D., Cang H., Guo Bo. Crosstalk between cancer and immune cells: Role of tumor-associated macrophages in the tumor microenvironment. *Cancer Med.* 2019 Aug; 8(10): 4709–4721. doi: 10.1002/cam4.2327.
5. Caronni N., Savino B., Bonocchi R. Myeloid cells in cancer-related inflammation. *Immunobiology* 2015; 220(2): 249-253; doi: 10.1016/j.imbio.2014.10.001.
6. 103. Gollapudi K., Galet C., Grogan T., et al: Association between tumor-associated macrophage infiltration, high grade prostate cancer and biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Am J Cancer Res.* 2013; 3:523-529.
7. Lissbrant IF., Stattin P., Wikstrom P., Damber JE., Egevad L., Bergh A. Tumor associated macrophages in human prostate cancer: relation to clinicopathological variables and survival. *Int J Oncol.* 2000;17:445–451. doi: 10.3892/ijo.17.3.445.
8. Shimura S., Yang G., Ebara S., Wheeler TM., Frolov A., Thompson TC. Reduced infiltration of tumor-associated macrophages in human prostate cancer: association with cancer progression. *Cancer Res.* 2000;60:5857–5861.
9. Biswas SK., Sica A., Lewis CE. Plasticity of macrophage function during tumor progression: regulation by distinct molecular mechanisms. *J Immunol.* 2008;180:2011–2017. doi: 10.4049/jimmunol.180.4.2011.
10. Cho U., Kim B., Kim S., Han Y., Song YS. Pro-inflammatory M1 Macrophage enhances metastatic potential of ovarian cancer cells through NF- $\kappa$ B activation. *Mol Carcinog.* 2017;57:235-242
11. Martinez FO., Sica AA., Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci.* 2008;13:453-461.
12. Mantovani A., Sozzani S., Locati M., Allavena P., Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 2002;23:549-555.
13. Bailey C., Negus R., Morris A., et al. Chemokine expression is associated with the accumulation of tumour associated macrophages (TAMs) and progression in human colorectal cancer. *Clin Exp Metastasis.* 2007;24:121-130.
14. Chanmee T., Ontong P., Konno K., Itano N. Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers.* 2014; 6(3): 1670-1690; doi: 10.3390/cancers6031670.
15. Deryugina EI., Quigley JP. Tumor angiogenesis: MMP-mediated induction of intravasation and metastasis-sustaining neovasculature. *Matrix Biol.* 2015;44–46:94-112.
16. Mantovani A. Tumor-associated macrophages in neoplastic progression: a paradigm for the in vivo function of chemokines. *Laboratory Investigation* 1994; 71(1): 5-16

