

3. Berrardi A., Haxby J., De Carli C. et al., *Face and word memory differences are related to paterus of right and left lateral ventricle size in healthy aging*. Journal of Gerontology. Series B. Psychological Sciences & Social Sciences, 52, (1), 1997. p.54-61.
4. Brovn PD, Davies SL, Speake T, Millar ID. *Molecular mechanisms of cerebrospinal fluid production*. Neuroscience. 129 (4) 2004. p. 957-70.
5. Edvinson L., Jansen J., Uddman R. et al., *Innervations of the human cerebral circulation*. Journal of The Autonomic Nervous Sistem., 49. Suppl., p. 591-6, 1994, Sept.
6. Emerich DF., Vasconcellios AV, Elliott RB, Skinner SJ, Borlongan CV. *The choroid plexus: funcțion, pathology and therapeutic potențial of its transplantațion*. Expert Opin Biol Ther. 4 (8). 2004. p. 1191-201.
7. Emerich DF., Skinner SJ, Borlongan CV, Thanos CG. *A role of the choroid plexus in transplantațion therapy*. Cell Transplant. 14 (10). 2005. p.715-25.
8. Emerich DF., Skinner SJ, Borlongan CV, Vasconcellios AV, Thanos CG. *The choroid plexus in the rise, fall and repair of the brain*. Bioessays. 27 (3), 2005. p.262-74.
9. Praetorius J. *Water and solute secretion by the choroid plexus*. Pflugers Arch. 454 (1). 2007. p.1-18.
10. Serot JM, Bene MC, Faure GC. *Choroid plexus, aging of the brain, and Alzheimer's disease*. Front Biosci. 8. 2003. p.15-21.
11. Strazielle N., Mutin M., Gherzi-Egeia JF. *The choroid plexuses: a dynamic interface between the blood and the cerebrospinal fluid*. Morphologie. 89 (285) 2005. p.90-101.
12. Strazielle N., Gherzi-Egeia JF. *Choroid plexus in the central nervous system: biology and physiopathology*. Neuropatol. Exp. Neurol. 59 (7), 2000. p.561-74.
13. Korzevskii D.E., Otellin V.A. *Morfological basis of the development of hemato-liquor barrier of the coroid plexus in prenatal ontogenesis*. Zh. Evol. Biokim. Fiziol. 37 (2). 2001.
14. Добровольский Г.Ф., *Изучение срединных структур мозга и системы ликворообразования в условиях патологии ЦНС*. Архив патологии 58(3): 30-3, 1996.
15. Куприянов В.В., Жица В.Т., *Нервный аппарат кровеносных сосудов головного мозга*. Кишинев,»Штиинца», 1975, 247с.
16. Мотавкин П.А., Ломакин А.В., Черток В.И., *Капилляры головного мозга*. ДВНЦ АН СССР, Владивосток,1983, 140с.
17. Науменко В.Г., Митяева Н.А., *Изменения в легких и сосудистых сплетений головного мозга при хронической алкогольной интоксикации*. Суд.мед. экспертиза ,№4, т.27, 1984,с.33-36.
18. Польский В.И., Шарипов Ф.Х., *Морфологические изменения сосудистых сплетений мозга при гипертонической болезни и атеросклерозе*. Здравоохран. Таджикистана, №1, 1975, с.10-15.

EXPRESIA DIVERGENTĂ A ENDOGLINEI ȘI MARKERULUI DE PROLIFERARE KI67 ÎN LEZIUNILE BENIGNE ȘI MALIGNNE ALE COLULUI UTERIN

Lilian Șaptefrați

Catedra Histologie, Citologie și Embriologie USMF „Nicolae Testemițanu”

Summary

Divergent expression of endoglin and marker of proliferation Ki67 in the benign and malign lesions of the uterine cervix

In this study we show, for the first time, application of double immunohistochemical stain method using endothelial marker of high specificity (CD105) and marker of proliferation (Ki67), applied on the neoplazic specimens of the uterine cervix imbedded in the paraffin. This method represents high accurateness in functional status interpretation of the blood vessels. On the base of obtained results, we can conclude the hypothesis that activation and proliferation of

endothelial cells are distinctive processes in the precursor and malign lesions of the uterine cervix. Activation of endothelial cells is an early stage that predominates in the cervical intracellular lesions of the uterine cervix, while the endothelial proliferation is observed in blood vessels of the invasive carcinomas.

Rezumat

În acest studiu prezentăm pentru prima dată aplicarea metodei de dublă imunocolorare bazată pe un marker endotelial de mare specificitate (CD105) și un marker de proliferare (Ki67) pe specimene neoplazice de col uterin incluse în parafină. Această metodă este de o acuratețe superioară în interpretarea statutului funcțional al vaselor sanguine. Pe baza rezultatelor obținute, putem emite ipoteza că în leziunile precursore și maligne ale colului uterin, activarea și proliferarea celulelor endoteliale sunt procese distincte. Activarea celulelor endoteliale este etapa precoce care predomină în leziunile cervicale intraepiteliale ale colului uterin, în timp ce proliferarea endotelială este observată la vasele din carcinoamele invazive.

Actualitatea temei

Endoglinea (CD105) este o glicoproteină transmembranară de 180 kDa, care este exprimată predominant de celulele endoteliale activate din vasele tumorale a unei mari varietăți de leziuni maligne și în leziunile inflamatorii. De asemenea, endoglinea este slab exprimată de o varietate diferită de celule, așa cum sunt monocitele, macrofagele, fibroblastele, melanocitele și celulele musculare ale vaselor sanguine. CD105 este una dintre componentele complexului receptor al factorului de transformare al creșterii- β (TGF- β), o citokină pleiotropică implicată în proliferarea celulară, diferențiere și migrare [5].

Ki67 (clona MIB1) este un marker al proliferării celulare [6]. Acest marker definește în manieră acceptabilă proliferarea celulară atât a celulelor tumorale, cât și endoteliale din vasele sanguine asociate tumorii. În timpul interfazei, Ki67 poate fi decelat exclusiv în nucleu, iar în timpul mitozei, cea mai mare parte a proteinei este realocată suprafeței cromozomilor. Proteina Ki67 este prezentă în toate fazele active ale ciclului celular (G_1 , S, G_2 , și mitoză), dar este absentă în celulele aflate în fază de repaus (faza G_0). Ki67 este un excelent marker utilizat pentru determinarea fracției de creștere a unei anumite populații celulare. Numeroase date din literatură asociază expresia endoglinei în celulele endoteliale cu rata lor crescută de proliferare *in vitro* [2]. Recent s-a demonstrat că forma solubilă a endoglinei, s-Eng, interferează cu proliferarea celulelor endoteliale și formarea de noi capilare [7]. Există în prezent controverse în ceea ce privește acest aspect, generate de studiile asupra expresiei Ki67 și endoglinei efectuate pe specimene de țesuturi tumorale incluzionate în parafină. Benetti A. și col., 2008 [1], au demonstrat că TGF- β 1 și CD105 induc migrarea celulelor endoteliale derivate din carcinomul hepatocelular prin creșterea motilității spontane și capacitate mai mare de a migra ca răspuns la TGF- β 1.

În 2003, Li C. și col. [3], au demonstrat că CD105 previne apoptoza în celulele endoteliale hipoxice. Autorii menționați au arătat că expunerea la hipoxie de 24 de ore a celulelor endoteliale derivate din microvascularizația dermului determină o creștere a expresiei CD105mRNA și o alterare dramatică a ciclului celular al celulei endoteliale, care este oprită în fazele G_0/G_1 .

Obiective

Dat fiind datele controversate în ceea ce privește expresia CD105 și a Ki67 în celulele endoteliale din leziunile colului uterin, ne-am propus să studiem distribuția și co-localizarea markerilor menționați mai sus în leziunile maligne ale colului uterin. Menționăm că în literatura de specialitate nu am identificat nici un articol referitor la co-expresia endoglinei și Ki67 în leziunile benigne și maligne ale colului uterin, iar cele referitoare la angiogeneza tumorală cu această localizare sunt rare și incerte.

Material și metode

Specimenele și procesarea primară. În studiul prezent au fost prelevate și incluse biopsiile țintite din leziuni evidente macroscopic și piesele de conizație. Biopsiile au fost prelucrate după tehnica histologică uzuală, fixate în formalină și incluzionate în parafină.

Histopatologie. Din fiecare bloc au fost efectuate secțiuni în serii cu grosimea de 3 μm grosime. Secțiunile inițiale au fost colorate cu metoda hematoxilină-eozină pentru diagnosticul patologic și stabilirea gradului de diferențiere al tumorii. Leziunile au fost clasificate după cum urmează: metaplazie scuamoasă (n=17), neoplazie intraepitelială cervicală (n=11), carcinom *in situ* (n=7), carcinom microinvaziv (n=10) și carcinom invaziv (n=49). Cazurile control (n=8) au fost reprezentate de speciamentele normale rezultate în urma procedurii de conizație. La subgrupele de carcinom microinvaziv și invaziv, gradul de diferențiere (G) a fost: G1 la 29 cazuri, G2 la 22 cazuri și G3 la 8 cazuri.

Imunohistochimie. Pe secțiuni adiționale a fost aplicată metoda de dublă imunocolorare, pentru colocalizarea CD105 și a Ki67. Secțiunile deparafinate și rehidratate au fost supuse blocării peroxidazei endogene cu peroxid de hidrogen 3% timp de 5 minute, urmată de pretratamentul cu Proteinaza K pentru 15 minute la temperatura camerei. Incubarea cu anticorpii primari anti-CD105, clona SN6h (DakoCytomation), timp de 1 oră, cu diluția de 1:10, a precedat prima aplicare a sistemului de lucru avidină-biotină LSAB+/HRP și vizualizarea s-a realizat cu 3,3'-diaminobenzidină. În acest fel, produsul final al imuno reacției pentru endoglină a fost colorat în brun. Ulterior s-a efectuat metoda automată de demascare a antigenului în tampon citrat la pH6 utilizând modulul PT Link (DakoCytomation), pentru 30 de minute, în vederea demascării epitopului Ki67. După 30 de minute de incubare cu anticorpii anti-Ki67 (clona MIB1, gata de utilizare), s-a aplicat sistemul de lucru LSAB+/HRP, urmat de vizualizarea cu aminoetil carbazol pentru 10 minute. Produsul final al reacției pentru Ki67 a fost colorat în roșu. Colorarea nucleilor s-a realizat cu hematoxilina Lillie modificată. Întreaga procedură imunohistochimică a fost realizată cu Autostainer-ul DakoCytomation. Preparatele au fost montate în mediu apos.

Interpretarea CD105 și scorul Ki67. Am cuantificat structurile vasculare cu lumen, pozitive pentru CD105, colorat în brun la nivel citoplasmatic în celulele endoteliale. Densitatea microvasculară a fost stabilită aplicând metoda modificată după Weidner N. [8]. Semnalele pozitive pentru Ki67 au fost restricționate nucleare, și au fost numărate atât în celulele endoteliale CD105 pozitive, cât și în celulele tumorale.

Analiza statistică. A fost efectuată cu programul SPSS13-0, și a inclus testul Chi pătrat și testul Student, valorile $p < 0.05$, fiind considerate semnificative.

Rezultate

Nici unul dintre cazurile de cervix uterin normal nu a exprimat endoglină. Imunoreacția pozitivă pentru CD105 a fost restricționată la endoteliul activat din leziunile intraepiteliale, carcinom *in situ* și carcinom microinvaziv.

Activarea intensă a endoteliului vaselor sanguine a fost observată în metaplazia scuamocelulară și neoplazia intraepitelială cervicală, cu densitate microvasculară care a variat între 0 și 25 de vase/ $\times 400$, cu o medie de 6.5 vase/ $\times 400$. Densitatea vaselor CD105 pozitive a fost mai mare în imediata vecinătate a metaplaziei și neoplaziei intraepiteliale și a scăzut semnificativ la distanță de leziune. De asemenea, carcinomul *in situ* a prezentat vase pozitive pentru endoglină, dar fără marcaj pentru Ki67, care reflectă proliferarea.

Vasele endoglin-pozitive au fost grupate în apropierea leziunilor epiteliale și au avut densitate mai mică la distanță, similar cu aspectele identificate în leziunile intraepiteliale. În carcinomul microinvaziv vase sanguine cu celule endoteliale endoglin pozitive au fost găsite la un singur caz.

Dintre cele 49 cazuri de carcinom invaziv 41 au fost negative pentru endoglină și multe dintre ele (n=28) au prezentat celule tumorale cu index proliferativ mai mic sau egal cu 5%.

Celulele endoteliale CD105 negative din carcinomul invaziv au prezentat rată de proliferare semnificativ mai mare decât vasele sanguine CD105 negative din colul uterin normal. Am găsit corelație semnificativă între absența expresiei endoglinei în celulele endoteliale proliferative și tipul invaziv al carcinomului cervical ($p=0,004$). De asemenea, indexul proliferativ redus în celulele tumorale s-a corelat cu absența expresiei CD105 din endoteliul vaselor din aria tumorală ($p=0.003$). Expresia divergentă a CD105 și Ki67 în celulele endoteliale a fost observată constant. În 3 cazuri de carcinom invaziv cu valori mari ale microdensității vasculare (13-15 vase/câmp $\times 400$, CD105), am observat semnale pozitive pentru Ki67 în nucleii celulelor endoteliale CD105 pozitive. Aceste vase au fost localizate la frontul de proliferare tumorală, la interfața dintre celulele tumorale și stromă.

Discuții

Leziunile maligne și benigne ale cervixului uterin sunt intens studiate în contextul transformării potențiale din leziunile cervicale intraepiteliale în tumori invazive. Multe date au fost publicate în ultimii ani referitor la epidemiologia și factorii cauzativi ai neoplaziei de col uterin. În pofida numeroaselor studii axate pe tumorile cervicale, evoluția și prognosticul acestora nu s-au ameliorat pe parcursul ultimilor ani. În vederea obținerii unui răspuns optimal în tratamentul neoplaziilor cervicale uterine este necesar de a studia în detalii profilul acestor leziuni, care ar include markerii moleculari ai proliferării celulare, interacțiunea cu angiogeneza, matricele extracelular în adhezie/invazie, apoptoza, etapele ciclului celular și mecanismele de reparare a ADN-ului.

În studiul angiogenezei leziunilor de cervix uterin au fost folosiți drept markeri pentru celulele endoteliale markerii pan-endoteliali cum ar fi CD31, CD34 și factorul von Willebrand. Toți acești anticorpi se exprimă atât în vasele normale, cât și cele tumorale. În 2008, Mazibrada J. și col. [4] a raportat existența corelației între densitatea microvasculară efectuată pe secțiuni colorate cu CD105 și CD31, și a observat creșterea densității microvasculare (la ambii markeri) pe măsura sporii severității neoplaziei de col uterin, de la leziunile benigne până la carcinomul invaziv. Aceste date sunt în contrast cu rezultatele noastre, referitor la densitatea microvasculară CD105. Noi am obținut cele mai înalte valori ale microdensității vasculare CD105 în leziunile displazice și în carcinomul *in situ*. Valoarea acestui indice se micșora pentru vasele tumorale ale carcinomului microinvaziv și invaziv.

Din datele pe care le-am obținut, reiese corelația clară dintre expresia divergentă a endoglinei și a markerului de proliferare Ki67. Inițial, s-a considerat că endoglina este exprimată exclusiv de către vasele sanguine din aria tumorală, aspect care s-a demonstrat ulterior ca inexact. Pe leziunile neoplazice ale colului uterin am observat prezența de vase cu celule endoglin pozitive și în precursorii carcinomului, astfel încât densitatea de vase calculată pe baza acestui parametru este mai mare în leziunile non-invazive. Această particularitate susține câștigarea precoce a fenotipului angiogenic și atrage atenția asupra semnificației colorației pozitive pentru endoglină, care în baza rezultatelor noastre, este exprimată de către celulele endoteliale activate, cu potențial proliferativ. În plus, datele prezentate arată că doar rareori celulele endoteliale pozitive pentru endoglină exprimă Ki67. Din acest motiv susținem că exprimarea endoglinei precede proliferarea endotelială, aspect susținut și de corelația găsită între prezența/numărul de vase pozitive și indexul de marcaj al celulelor tumorale pentru Ki67. În aceste condiții, putem afirma că exprimarea secvențială a celor doi markeri în leziunile colului uterin se corelează cu angiogeneza activă. Lucrările referitoare la angiogeneza tumorală cu alte localizări au arătat că proliferarea endotelială este unul dintre cei mai fideli indicatori ai angiogenezei active. Din datele care ne-au stat la dispoziție, nu am găsit referiri asupra acestui subiect în literatura de specialitate. Rezultatele pe care le-am obținut pledează pentru investigarea acestui aspect în vederea elucidării răspunsului potențial la terapia antiangiogenică (care se află în curs trialuri clinice) pentru tumorile invazive ale colului uterin. De asemenea, expresia endoglinei și a Ki67 poate fi considerată element predictiv pentru răspunsul la terapia adjuvantă clasică, care până în prezent nu este utilizat în practică.

Concluzii

1. În această cercetare prezentăm pentru prima dată aplicarea metodei de dublă imunocolorare bazată pe un marker endotelial de mare specificitate (CD105) și un marker de proliferare (Ki67) pe specimene neoplazice de col uterin incluse în parafină. Această metodă reprezintă o metodă cu acuratețe superioară în interpretarea statutului funcțional al vaselor sanguine.
2. Pe baza rezultatelor obținute, putem emite ipoteza că în leziunile precursore și maligne ale colului uterin, activarea și proliferarea celulelor endoteliale sunt procese distincte. Activarea celulelor endoteliale este etapa precoce care predomină în leziunile cervicale intraepiteliale ale colului uterin, în timp ce proliferarea endotelială este observată la vasele din carcinoamele invazive.

Bibliografie

1. Benetti A., Berenzi A., Gambarotti M., Garrafa E., Gelati M., Dessy E., Portolani N., Piardi T., Giulini S.M., Caruso A., Invernici G., Parati E.A., Nicosia R., Alessandri G. Transforming growth factor-beta1 and CD105 promote the migration of hepatocellular carcinoma-derived endothelium. *Cancer Res.* 2008 Oct 15;68(20):8626-34.
2. Lebrin F., Goumans M.J., Jonker L., Carvalho R.L., Valdimarsdottir G., Thorikay M., Mummery C., Arthur H.M., ten Dijke P. Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction. *EMBO J.* 2004; 23:4018-28.
3. Li C., Issa R., Kumar P., Hampson I.N., Lopez-Novoa J.M., Bernabeu C., Kumar S. CD105 prevents apoptosis in hypoxic endothelial cells. *J Cell Sci.* 2003 Jul 1;116(Pt 13):2677-85.
4. Mazibrada J., Rittà M., Mondini M., De Andrea M., Azzimonti B., Borgogna C., Ciotti M., Orlando A., Surico N., Chiusa L., Landolfo S., Gariglio M. Interaction between inflammation and angiogenesis during different stages of cervical carcinogenesis. *Gynecol Oncol.* 2008;108:112-20.
5. Pepper M.S. Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1997;8:21-43.
6. Scholzen T., Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J. Cell. Physiol.* 2000, 182, 3: 311-22.
7. Venkatesha S., Toporsian M., Lam C., Hanai J., Mammoto T., Kim Y.M., Bdolah Y., Lim K.H., Yuan H.T., Libermann T.A., Stillman I.E., Roberts D., D'Amore P.A., Epstein F.H., Sellke F.W., Romero R., Sukhatme V.P., Letarte M., Karumanchi S.A. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. 2006, *Nat Med* 12:642-49.
8. Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. *Breast Cancer Res Treat.* 1995;36(2):169-80.

MODIFICĂRILE HISTOLOGICE ALE UTERULUI ÎN PROCESUL INVOLUȚIEI SALE POST-PARTUM

Ruslan Pretula

Laboratorul Morfologie USMF „Nicolae Testemitanu”

Summary

The histological modifications in uterus during its post-partum involution

The histological modifications in uterus during its post-partum involution were investigated. It was determined that the process of post-partum involution of the uterus is manifested histologically by atrophy and dystrophy processes in muscle elements, by the