

of VEGF expression by the stratified squamous epithelium depends on the stage uterine neoplasia progression. Its expression by the stromal cells is highly specific for both microinvasive and invasive carcinoma stages. VEGFR2 expression by the endothelial cells is also dependent on the severity of cervical lesions, being the highest in squamous cell carcinoma of the uterine cervix. In this stage, VEGFR2 expression (with different intensities) is expressed by cancer cells.

Резюме

В настоящей работе был изучен материал прицельных биопсий и конизаций шейки матки у пациенток с патологическими участками эпителия органа, выявленных макроскопически. Поражения были классифицированы следующим образом: CIN1 (n=17), CIN2 (n=11), CIN3 (n=7), микроинвазивная карцинома (n=10) и инвазивная карцинома (n=49). В качестве контроля (n=5) были изучены конизации шейки матки с неизменной (нормальной) гистологической картиной. Было проведено иммуногистохимическое исследование с идентификацией VEGF и VEGFR-2. Наши данные доказывают, что экспрессия VEGF в клетках многослойного плоского неороговевающего эпителия возрастает по мере нарастания степени неоплазии шейки матки. По мере прогрессии неоплазии возрастает и экспрессия VEGFR2 в клетках сосудистого эндотелия, с максимальными значениями в случаях с плоскоклеточными карциномами. В этих случаях наблюдалась экспрессия VEGFR2 (с различной интенсивностью) и в опухолевых клетках.

ANALIZA MORFOMETRICĂ A POPULAȚIEI MASTOCITELOR DÎN PROSTATA UMANĂ

Tatiana Globa, asist. univ., *Vitalie Mazuru*,
asist. univ., *Lilian Șaptefrați*, dr. hab.,
Elina Pelin, dr. în medicină., conf. univ.,
USMF „Nicolae Testemițanu”

Introducere

Mastocitele, la fel ca și bazofilele, au fost descrise pentru prima dată cu mai bine de o sută de ani în urmă ca celule granulare care prezintă metacromazie la coloranții bazici. Prima descriere a mastocitului datează din 1863 și a fost realizată de către Friederich von Recklinghausen [12]. Acesta a observat o celulă cu refringență particulară în mezenterul necolorat de broască, în mezenterul de iepure, dar și în alte țesuturi provenind de la diferite animale.

Paul Ehrlich, studiind acțiunea coloranților tia-zidici asupra țesuturilor, semnalează metacromazia, proprietate histochemică prin care se identifică și astăzi o mare parte din populația mastocitară. Astfel Ehrlich, în 1878, descrie pentru prima dată morfologia microscopică a mastocitului, precum și principalele proprietăți tinctoriale ale acestuia [7].

Mastocitele prezintă pe suprafață receptori cum ar fi integrinele, care mediază interrelația lor cu alte celule, dar și cu matricea extracelulară. Filogenetic, mastocitele sunt prezente la toate animalele care au sistem circulator, fiind absente în țesuturile nevascularizate. Este o celulă cu durată lungă de viață și cu un marcat potențial secretor. Mastocitele au aspecte morfologice, histochemice și funcționale diferite, atât de la o specie la alta, cât și în cadrul aceleiași specii, ceea ce demonstrează heterogenitatea sistemului mastocitar.

Mastocitele sunt prezente în majoritatea țesuturilor, însă numărul lor depinde de organul în care sunt studiate, de vârstă, dar și de o serie de condiții patologice. Fiind o celulă fixă a țesutului conjunctiv, a fost identificată cu ajutorul unor metode specifice în țesutul conjunctiv perivascular, periglandular, în submucoasa organelor cavitare. Au mai fost observate în interstițiul muscular de la nivelul tubului digestiv, căi respiratorii, glanda mamară, uter, vezică urinară, dar și în țesutul adipos printre adipocite. În piele, mastocitele se găsesc în număr mare în derm, în imediata vecinătate a membranei bazale, în jurul foliculilor piloși și al glandelor sudoripare. Un număr mare de mastocite a fost evidențiat și în exudatele pleurale și peritoneale, ceea ce permite izolarea lor pentru efectuarea unor studii în vitro. Un număr mic de mastocite a fost descris în splină, testicol și ganglionii spinali. Doar câteva organe din organismul uman nu conțin mastocite în condiții normale: ficat, glandele suprarenale și hipofiză [3;5].

În prostată se observă o densitate mastocitară crescută, în special, în perioada pubertară și o scădere a numărului acestora odată cu înaintarea în vârstă [11]. Există încă numeroase controverse, nu numai asupra biologiei mastocitelor în condiții normale, cât mai ales privind comportamentul lor în neoplazii. Mastocitele au fost semnalate în număr mare în stroma tumorală și chiar printre celulele tumorale, dar semnificația lor în aceste condiții este încă incertă [1]. Deși secretă un mare număr de mediatori biologici, nu toate aceste substanțe sunt prezente în toate mastocitele. În lucrarea prezentă ne-am propus investigarea particularităților microscopice, analiza morfome-

trică complexă a populației mastocitelor din prostata umană, în condiții normale, cu extinderea ulterioară a studiului asupra comportamentului lor în patologia benignă și cea malignă a prostatei.

Material și metode

Studiul a inclus un număr de 22 de prostate colectate prin autopsiere de la bărbați decedați de cel mult 24 de ore, în urma accidentelor și morții subite, cu vârsta cuprinsă între 20 și 57 de ani, și care nu prezentau modificări morfologice caracteristice afecțiunilor prostatice. Materialul prelevat a fost fixat în formalină tamponată 10%, ulterior fiind incluzionate în parafină după metoda standard. Secțiuni de 8-10 microni au fost montate pe lame silanate. Diagnosticul histopatologic s-a stabilit pe preparate colorate cu hematoxilină eozină.

Populația de mastocite a fost pusă în evidență prin colorarea cu albastru de toluidină. După deparafinare, coloidare și hidratare, secțiunile se montau pentru 5 minute în soluție de 0,2% albastru de toluidină în tampon Walpole cu pH 4,2 (soluție 1,2% acid acetic, soluție 2,7% acetat de sodiu trihidratat). După clătire rapidă cu soluție tampon acetat, se aplică soluția de molibdat de amoniu 5% timp de 5 minute. Rezultatul colorației metacromatice utilizate este colorarea granulelor mastocitelor în violet sau roșu-violet.

Densitatea mastocitelor a fost cuantificată în conformitate cu metoda „hot spot”. Analiza morfometrică a populației mastocitare a fost efectuată după metoda propusă de Lidner și coaut. (1980) [12]. În fiecare secțiune obținută și prelucrată cu albastru de toluidină au fost studiate 100 mastocite. Primul pas al analizei morfometrice complexe a fost alcătuirea citogramelor, ținându-se cont de gradul de metacromazie și cantitatea de granule în fiecare mastocit. Parametrii indicați în mod direct depind de conținutul heparinei. Analiza citogramelor a permis calcularea indicelui de saturație a mastocitelor cu heparină. Aceasta a reieșit din raportul dintre suma tuturor celulelor întunecate și suma tuturor celulelor clare.

Pentru colorația imunohistochimică, secțiunile de 5 μm au fost deparafinate în benzen și rehidratate, folosind băi succesive de etanol cu concentrații descrescătoare (100%, 95%, 80%, 70%), urmate de spălarea cu apă distilată. Demascarea antigenului a necesitat imersia lamelor într-o soluție de EDTA la pH 9 și încălzirea la microunde timp de 15 minute în trei cicluri succesive. După răcirea la temperatura camerei în soluția de demascare, am aplicat blocarea peroxidazei endogene cu soluție de apă oxigenată 3% în apă dis-

tilată timp de 5 minute. Incubarea cu anticorpus primar s-a realizat timp de 30 de minute la temperatura camerei. Am utilizat anticorpus monoclonal anti-triptază, clona A1. Sistemul de lucru compatibil a fost cel de tip LSAB+, iar cromogenul aplicat 3,3'-diaminobenzidina dihidroclorid, vizualizat printr-o reacție de culoare brună.

Rezultate și discuții

La colorația imunohistochimică cu anticorpi anti-triptază am identificat mastocite cu formă variată, unele fiind mici, rotunde, altele ovoidale și fusiforme, prezentând una sau mai multe prelungiri citoplasmice de grosimi diferite și un număr variabil de granule, dând celulei un aspect stelat. Nucleul este unic, localizat central, de formă rotundă sau ovoidală, uneori fiind mascat de granulele citoplasmice. Mastocitele sunt distribuite în țesutul conjunctiv lax în spațiile perivascularare, precum și în vecinătatea glandelor, unde au fost observate izolat sau în grupuri mici.

Prin analiza morfometrică complexă (metoda Lidner și coaut. 1980) a fost studiată populația mastocitelor din trei zone topografice ale prostatei: periuretrală, pericapsulară și periglandulară (centrală). Pentru elaborarea citogramelor, mastocitele au fost divizate în patru grupe: mastocite extrem de întunecate (granulele ascund în totalitate nucleul) – tip I, mastocite întunecate (se vizualizează unele fragmente de nucleu) – tip II, mastocite clare (se vizualizează nucleul bine conturat pe fondul unui număr redus de granule) – tip III, mastocite extrem de clare (prezența granulației specifice mastocitare unice) – tip IV [12].

Analiza citogramelor a evidențiat faptul că mastocitele de tipurile I și IV, indiferent de vârstă, se întâlnesc mai rar decât cele de tipurile II și III. În toate regiunile topografice studiate (stroma fibromusculară, regiunea periuretrală, pericapsulară), indiferent de lotul de vârstă examinat, s-a constatat o predominanță netă a mastocitelor întunecate (tipurile I și II) față de cele clare (tipurile III și IV). În regiunea periglandulară, la vârsta tânără (20 -35 ani) s-a înregistrat o tendință de egalare a numărului mastocitelor clare cu cel al celulelor întunecate.

În baza citogramelor a fost calculat indicele heparinic, ce reprezintă raportul sumei tuturor mastocitelor întunecate (tip. I și II) la suma tuturor mastocitelor clare (tip. III și IV). Analiza morfometrică a evidențiat un indice heparinic scăzut la persoanele de vârstă tânără, determinat de degranularea mai intensă a populației de mastocite (degranularea intensă se soldează

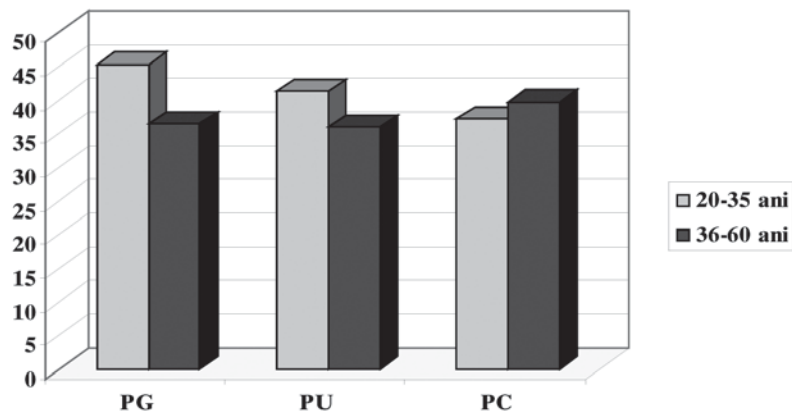


Diagrama 1. *Indicele de degranulare a populației mastocitare din prostata umană.*

cu eliberarea de heparină). Este bine cunoscut faptul că heparina își îndeplinește funcția nemijlocit în țesutul conjunctiv, participând la menținerea coloidității substanței fundamentale, astfel influențând homeostazia locală. Serov V.V., și coaut. (1981) au observat implicarea heparinei în micșorarea metabolismului la celulele adiacente prin modificarea potențialului plasmalemelor, ceea ce duce la inhibiția creșterii celulare și la blocarea procesului de fagocitoză [2; 13]. Schwartz L.B. (1987) a remarcat acțiunea stabilizatoare a heparinei asupra activității triptazei mastocitare umane, care în mod contrar s-ar distruge rapid în matricea extracelulară. În opinia autorului, acest fapt este elementul-cheie în dezvoltarea proceselor inflamatorii. Astfel, mastocitele nu sunt doar celulele efectoare ale inflamației, dar și reglatorii inflamației [10].

În același context a fost stabilit și indicele de degranulare (ponderea mastocitelor degranulate), și frecvența relativă a degranulării slabe, moderate și pronunțate, numărându-se în fiecare arie histologică câte 100 de celule. Rezultatele obținute în urma studiului efectuat arată că cea mai intensă activitate de degranulare o manifestă mastocitele din regiunea periglandulară – lotul persoanelor cu vârsta cuprinsă între 20 și 35 de ani. Menționăm că fenomenul dat se manifestă pe fundalul micșorării numerice a populației mastocitare din această regiune. Probabil că degranularea mastocitelor are un efect stimulator asupra

glandelor prostatei, care în această perioadă a vieții au o secreție mai intensă. Cei mai scăzuți indici de degranulare s-au înregistrat la mastocitele din regiunea periuretrală și periglandulară a prostatei în lotul persoanelor cu limita de vârstă 36-60 de ani.

Degranularea poate fi observată atât în microscopia optică, cât și în cea electronică și au fost descrise mai multe tipuri morfologice în funcție de stimulul care o determină. Studiind ultrastructural mastocitele aflate în degranulare, se evidențiază 4 tipuri morfologice ce corespund unei anumite concentrații de mediatori eliberați: *exocitoza secvențială* apare prin fuziunea membranei perigranulare cu plasmalema. Matricea granulară rămâne în spațiul extracelular, unde se dezintegrează sau este fagocitată de macrofage. Acest tip este caracteristic degranulării lente, observate mai ales în spațiile perivasculare. Intracitoplasmatic membranele perigranulare pot fuziona formând saci granulari care se deschid în afara celulei prin canale membranare [7].

Modificările granulare periferice sunt puse pe seama fosfolipidelor care participă la metabolismul acidului arahidonic, producând leucotriene și alte eicosanoide în cursul procesului de degranulare. Canalele membranare pot fi marcate cu nitrat de argint sau hemoglobină, identificarea lor permițând aprecierea stadiului funcțional al mastocitului. În timpul degranulării după acest model, organele intracitoplas-

Raportul procentual al tipurilor de mastocite din regiunile topografice ale prostatei umane

Localizarea (zonele topografice studiate)	Limitele de vârstă							
	20–35 de ani				36–60 de ani			
	Tipuri de mastocite (%)				Tipuri de mastocite (%)			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
Z. periglandulară	17,3	32,7	38,3	11,6	24,5	37	31,7	6,8
Z. periuretrală	14	39,7	32,3	14	19,5	31	35,5	14
Z. pericapsulară	15,3	41	32,6	11	18,8	37,7	36,5	7

matice nespecifice nu suferă modificări morfologice notabile și sunt capabile să-și reia funcția de sinteză. Granulele eliberate din mastocit pierd heparina și nu mai dau metacromazie la albastru de toluidină [4]; *eliberarea de fragmente citoplasmatică cu granule* care prezintă dublă membrană ce pot fi observate la distanță de celulă rezistând la acțiunea fluidului interstițial. Fragmentele citoplasmatică sau doar granulele pot fi fagocitate de macrofage; *eliberarea de mediator prin difuziune* determină aspectul rarefiat al granulelor periferice. Difuziunea se realizează prin pori foarte mici, realizați de membranele perigranulare și plasmalemă. Astfel se eliberează cantități foarte mici de mediator; *mastocitoclasia* este degranularea explozivă cu pierderea a peste 90% din granule; caracterizează reacția anafilactică și este urmată de citoliză. Fenomenul poate fi indus de cantități mici de antigen, mai ales pe mastocitele sensibilizate în prealabil. Procesul se desfășoară cu viteză mare și se soldează de obicei cu moartea celulei, sistemul membranal fiind în imposibilitate de a regenera organitele intracitoplasmatică [9].

Datele obținute relevă următoarele: populația mastocitelor reacționează la modificările tisulare, ceea ce reprezintă un factor important și obligatoriu în menținerea homeostaziei organului. Astfel, acestea devin celule active în modelarea micromediului, nu numai prin sinteză și secreție, ci și prin cooperarea cu celulele adiacente.

Concluzii

Mastocitele din prostata umană reprezintă o populație celulară care posedă particularități fenotipice, ce se modifică în funcție de aria topografică a organului, localizându-se predominant în spațiile perivascularare ale stromei fibromusculare. Analiza morfometrică a populației mastocitelor a stabilit în toate regiunile topografice ale prostatei, indiferent de vârstă, predominarea netă a mastocitelor întunecate (tip. I și II) față de cele clare (tip. III și IV). Rezultatele obținute în urma studiului efectuat arată că cea mai intensă activitate de degranulare manifestă mastocitele din regiunea periglandulară – lotul persoanelor cu vârsta cuprinsă între 20 și 35 de ani. Menționăm că fenomenul dat se manifestă pe fundalul micșorării numerice a populației mastocitare din această regiune.

Bibliografie

1. Arcadi A.J., *Metachromasia in the human prostate: a histochemical difference between benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma*. J Urol, 1988, 139:315-317.
2. Azizkhan RG, et al., *Mast cell heparin stimula-*

tes migration of capillary endothelial cells in vitro. J Exp Med, 1980; 152: 931–44.

3. Bloom W, Fawcett D., *A textbook of histology*. Saunders Comp, Philadelphia, 1984-1986.

4. Boyce J.A., *Mast cells and eicosanoid mediators: a system of reciprocal paracrine and autocrine regulation*. Immunological Reviews, 2007, Vol. 217: 168–185.

5. Diculescu I., Onicescu D., Rîmniceanu C., *Histologie*. Eddid și ped, București, 1970.

6. Ehrlich P., *Beiträge zur Theorie und Praxis der histologischen Färbung*. I. Teil: Die chemische Auffassung der Färbung. II. Teil: Die Anilinfarben in chemischer, technologischer und histologischer Beziehung. PhD Thesis, University of Leipzig, 1878.

7. Fischer M, et al., *Mast cell CD 30 ligand is upregulated in cutaneous inflammation and mediates degranulation-independent chemokine secretion*. J Clin Invest 2006, 116:2748–2756.

8. Recklinghausen F., *Ueber Eiter- und Bindegewebskörperchen*. Virchows Arch Path Anat 186, 28:157–197.

9. Schmauder-Chock E.A, Chock P.S., *New membrane assembly in Ig E receptor-mediated exocytosis*. Histochem J, 1990, 22:215-226.

10. Schwartz L.B., *Mast cells and basophils*. Clin. Allergy Immunol. 2002; 16:3 – 42.

11. Yue S. C., Pearse F. L., *Isolation and properties of mast cells from rat prostate*. Inflamm. Res., 1999 Apr, 48 suppl 1, S 23-4.

12. Лиднер Д.П., Поберий И.А., Розкин М.Я., Ефимов В.С., *Морфометрический анализ популяции тучных клеток*. Арх. Патол., 1980, 42-6, 60-64.

13. Серов В. В., Шехтер А. Б., *Соединительная ткань. Функциональная морфология и общая патология*. 1981.

Rezumat

Mastocitele sunt prezente în majoritatea țesuturilor, însă numărul lor depinde de organul în care sunt studiate, de vârstă și de o multitudine de factori atât în normă, cât și în patologie. În cadrul lucrării prezente au fost studiate particularitățile microscopice, a fost efectuată analiza morfometrică complexă a populației mastocitelor din prostata umană, în condiții normale. Rezultatele studiului au evidențiat o heterogenitate fenotipică a mastocitelor în prostata umană. Analiza morfometrică arată că cea mai intensă activitate de degranulare o manifestă mastocitele din regiunea periglandulară – lotul persoanelor cu vârsta cuprinsă între 20 și 35 de ani. Menționăm că fenomenul dat se manifestă pe fundalul micșorării numerice a populației mastocitare din această regiune.

Summary

Mast cells are present in most tissues, but their number depends on the organ within which there are studied, age, and a variety of factors both in norm and in pathology. The present work studies microscopic features, complex

morphometric analysis of the mast cell population from human prostate, in normal conditions. The study results showed a phenotypic heterogeneity of mast cells in human prostate. Morphometric analysis shows that the most intense activity of mast cells degranulation is characteristic for those from periglandular region - group of people aged 20-35 years. Note that this phenomenon occurs with the decreasing of mast cells population number in this region.

Резюме

Тучные клетки присутствуют в большинстве тканей, но их количество зависит от изучаемого органа, возраста и множества факторов, как в норме, так и в патологии. В данной работе изучались микроскопические особенности, морфометрический анализ популяции тучных клеток предстательной железы человека в норме. Результаты исследования показали фенотипическую гетерогенность тучных клеток предстательной железы человека. Морфометрический анализ выявил, что наиболее интенсивная дегрануляция характерна для тучных клеток из зон вокруг желез предстательной железы – в группе людей с возрастом от 20 до 35 лет. Отмечаем, что это явление происходит на фоне снижения количества тучных клеток в данной зоне.

ROLUL FACTORULUI DE CREȘTERE DERIVAT DIN TROMBOCITE (PDGF) ÎN CANCEROGENEZA CERVIXULUI UTERIN DE ORIGINE SCUAMOCELULARĂ

Vitalie Mazuru, asist. univ., *Oxana Mazuru*,
medic rezident, *Valeriu David*, dr. în medicină,
conf. univ., *Tatiana Globa*, asist. univ.,
Lilian Șaptefrățî, dr. hab. în medicină, conf.
univ., USMF „Nicolae Testemițanu”

Introducere

Cancerul de cervix uterin ocupă locul al 2-lea printre cele mai frecvente maladii maligne la femei, după cancerul de glandă mamară, anual în lume fiind depistate peste 500 000 de cazuri noi. Această incidență ridicată, la scară globală, este în mare măsură determinată de carențele grave în diagnosticul timpuriu al leziunilor cervicouterine precursore în țările cu venit mic și mediu. În țările dezvoltate, unde sunt implementate pe larg metodele de screening bazate pe PAP test, și mai nou – pe determinarea ADN-ului HPV, incidența în populație a acestei maladii a scăzut substanțial pe parcursul ultimelor decenii. Reieșind din aceste considerente, o importanță crucială o are

studierea în detaliu a tuturor evenimentelor patologice ce se desfășoară pe parcursul progresării leziunilor precursore și determinarea rolului lor predictiv, cu scopul de a preîntâmpina apariția cancerului.

Este bine cunoscut faptul că procesul de dezvoltare a cancerului este unul complex, ce implică diferite verigi patogenetice, în cadrul cărora are loc activarea unor procese cu rol patogen și inhibarea altora cu rol protector [7]. Formarea vaselor noi este indispensabilă dezvoltării unei neoformațiuni [3], celulele tumorale fiind, prin factorii de creștere sintetizați, „arhitecturii” acestei angiogeneze tumoral-dependente. Mai mult ca atât, tumoarea determină dezvoltarea nu doar a vaselor sangvine necesare creșterii, supraviețuirii, dezvoltării și extinderii proprii și a celor limfatice, prin intermediul cărora se răspândește la distanță.

Angiogeneza și limfangiogeneza sunt procese complexe, etapizate, reglate de o serie de factori moleculari ca VEGF, FGF-2 și mai nou – PDGF. Cel mai bine studiat, până la moment, este rolul factorilor de creștere din familia VEGF și al receptorilor săi complementari – VEGFR. Pe parcursul ultimului deceniu, au crescut exponențial datele despre implicarea PDGF în acest proces, ba mai mult, a fost demonstrat rolul lor în limfangiogenază [2]. La mijlocul anilor ‘70 ai secolului trecut s-a determinat că factorul de creștere major din ser (Serum Major Growth Factor) derivă din trombocite [6,10,12]. În 1979 a fost purificat de către Heldin, care i-a dat și numele actual [5]. Rolul PDGF în oncogeneză a fost pentru prima dată demonstrat pe baza faptului că *v-sis* oncogenele codifică o proteină PDGF-B asemănătoare. Această proteină, prin mecanism autocrin, este capabilă să inducă transformarea malignă a celulelor din cultură [1]. În model experimental de glioblastom, a fost demonstrat că PDGF intensifică expresia de VEGF de către celulele endoteliale și recrutarea pericitelor [4]. De asemenea, în model experimental de fibrosarcom murin a fost demonstrat efectul prolimfangiogen al acestui factor de creștere [2].

Deoarece incidența cancerului de col uterin este în scădere în țările dezvoltate, rolul PDGF în dezvoltarea neoplaziei cu această localizare este practic nestudiată. Reieșind din cele expuse mai sus, autorii și-au propus să identifice particularitățile de expresie a PDGF, evaluarea în dinamică a acestei expresii, precum și determinarea potențialelor corelații dintre expresia de PDGF și densitatea vaselor sangvine și limfatice.

Material și metode

Studiul a fost realizat pe materialul tisular recoltat din colul uterin prin biopsii țintite din leziunile ma-