

# ASPECTE IMUNOHISTOCHEMICE ALE INFILTRATULUI CELULAR ÎN CANCERUL PANCREATIC

I. ȘIMON<sup>1</sup>, R.TOGĂNEI<sup>1</sup>, O. CEBOTARI<sup>1</sup>, O. FABLAN<sup>1</sup>, M. CAZACU<sup>1</sup>,  
E. RYSCHICH<sup>2</sup>, J. SCHMIDT<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Clinica Chirurgie IV, UMF Iuliu Hațieganu Cluj-Napoca, Romania

<sup>2</sup> Departamentul de Chirurgie, Universitatea Heidelberg, Germania

## Rezumat

Există limfocite care infiltrează celulele canceroase sugerând răspunsul imun antitumoral. Țesutul pancreatic din jurul carcinomului ar trebui să fie aproape liber de celule infiltrate. Pentru a caracteriza infiltrația celulară, prezentăm rezultatele unui studiu efectuat la pacienți cu cancer de cap de pancreas, folosind o gamă largă de anticorpi monoclonali specifici subsetului de leucocite.

În studiu au fost incluși 15 pacienți cu cancer pancreatic cefalic. Țesutul pancreatic din jurul carcinomului pancreatic a fost obținut prin rezecție chirurgicală.

rezultatele noastre sugerează că țesutul pancreatic al pacienților cu carcinom pancreatic a avut o creștere semnificativă a celulelor pozitive mononucleare comparativ cu pancreasul normal. Celulele predominante în această infiltrație sunt celulele T cu memorie, indicând un răspuns imun specific în țesutul din jurul carcinomului. Oricum aceste celule T nu proliferază.

**Cuvinte cheie:** cancer pancreatic, subset de leucocite, infiltrat celular

## Summary. Immunohistochemical aspects of the pancreatic cellular infiltrate in pancreatic carcinoma

There are tumours infiltrating lymphocytes between carcinoma cells and at the border of carcinoma suggesting anti-tumour immune response. Pancreatic tissue surrounding carcinoma was expected to be nearly free of infiltrating cells.

We present results from a larger number of carcinoma patients using an extended panel of monoclonal antibodies specific to the leucocytes subsets to characterize the cell infiltration.

A total of 15 patients with pancreatic carcinoma were included in the investigation. Pancreatic tissues surrounding pancreatic carcinoma were obtained from surgical resections.

Our results suggest that in pancreatic tissue of patients with pancreatic carcinoma there was a significant increase of mononuclear positive cells compared to the normal pancreas. The predominant cells in these infiltrations are memory T cells indicating specific immune response in the carcinoma surrounding tissues. However these T cells do not proliferate.

**Key words:** pancreatic carcinoma, lymphocyte subsets, cellular infiltrate

## Introducere

Există limfocite care infiltrează celulele canceroase sugerând răspunsul imun antitumoral<sup>(1)</sup>. Țesutul pancreatic din jurul carcinomului ar trebui să fie aproape liber de celule infiltrate.

Am comparat cantitativ tipurile de leucocite infiltrate în pancreasul normal la om, în pancreatita cronică și în vecinătatea carcinomului pancreatic<sup>(2, 3)</sup>.

Tipul de leucocite din țesutul pancreatic din jurul carcinomului și cel din pancreatita cronică a fost similar. Pentru a caracteriza infiltrația celulară, prezentăm rezultatele unui studiu efectuat la pacienți cu cancer de cap de pancreas, folosind o gamă largă de anticorpi monoclonali specifici subsetului de leucocite.

## Material și metodă

În studiu au fost incluși 15 pacienți cu cancer pancreatic cefalic. Țesutul pancreatic din jurul carcinomului pancreatic a fost obținut prin rezecție chirurgicală. Din punct de vedere al

gradului de diferențiere al carcinomului au fost: G2 – 11 cazuri, G3 – 4 cazuri

Piesele chirurgicale au fost înghețate și depozitate la -80°C. Au fost tăiate secțiuni seriate cu o grosime de 5 μm, uscate ulterior la aer, la temperatura camerei și apoi fixate în acetona timp de 10 minute. Mostrele fixate au fost depozitate la -80°C până la colorația imunohistochimică. Piesele pancreatice au fost marcate cu următoarele clone de anticorpi monoclonali:

- MT310 (CD4, T-helper/inductor)
- DK25 (CD8, T supresor/citotoxic)
- UCHL-1 (CD45R0, limfocite cu memorie)
- ACT-1 (CD25, receptor IL2)
- Ber-ACT18 (MLA, antigen specific limfocitar al mucoasei)
- T015, (CD22, celule B)
- T16 (CD38, celule plasmatic)
- EBM11 (CD68, monocite/macrofage)
- TUK4 (CD14, monocite)

Clona T16 a fost obținută de la DIANOVA, Hamburg, Germania. Ceilalți anticorpi au fost cumpărați de la DAKO, Glostrup, Danemarca. Fixarea anticorpilor a fost vizualizată folosind metoda alcalin fosfataza monoclonal antialcalin fosfatază (APAAP)<sup>0</sup>.

Probele au fost incubate secvențial cu anticorpi monoclonal primar nemarcat de șoarece, imunoglobulină IgG de iepure anti-șoarece (DAKO) și cu un complex monoclonal de șoarece APAAP (DAKO).

Activitatea fosfatazei alcaline a fost vizualizată prin incubarea pieselor cu o soluție conținând fucsină, nitrat de sodiu, levamisol și naftol AS-BI (Sigma, St. Louis, SUA).

Nucleii celulari au fost numărați folosind hematoxilină urmată de o fixare în glicogel. Pentru numărarea celulelor colorate pozitiv a fost folosită o grilă oculară constând într-un pătrat cu o suprafață de 0,625 mm<sup>2</sup> (x 400).

Rezultatele au fost exprimate pe mm<sup>2</sup>. Evaluarea a fost „orarbă” și a fost efectuată de către 2 cercetători. Reproducibilitatea testului după decodare, a avut o deviație standard <10%.

## Rezultate

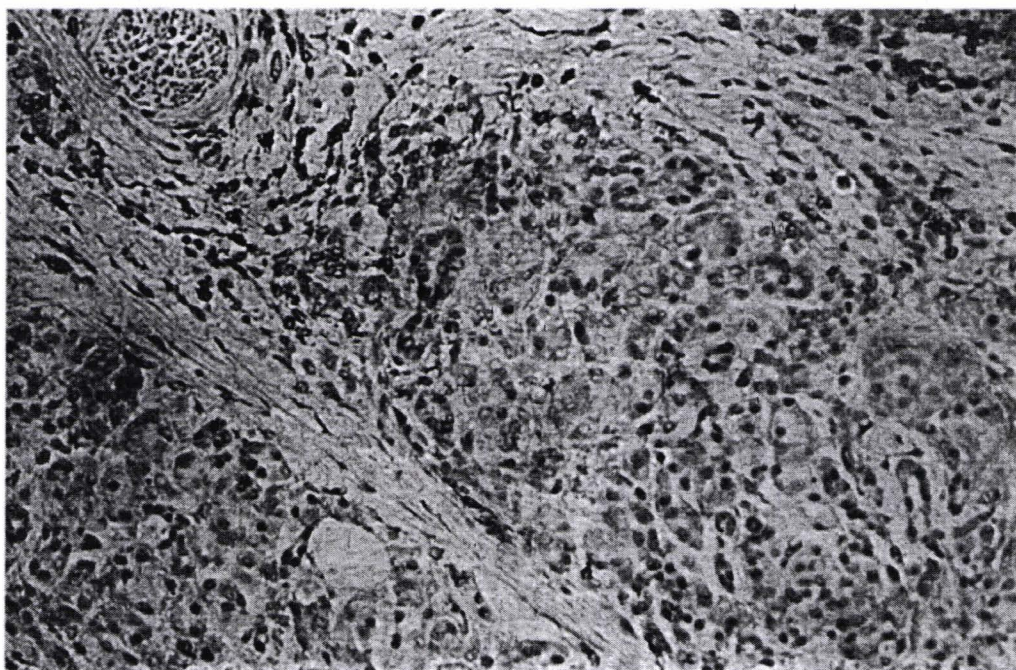
În țesutul pancreatic din jurul carcinomului pancreatic au fost găsite un număr crescut de leucocite mononucleare infiltrate ( $350,4 \pm 121,1$  celule/mm<sup>2</sup>).

Predominanța populației celulare în infiltratul leucocitar a fost: limfocite T (53,5%), macrofage (32,4%).

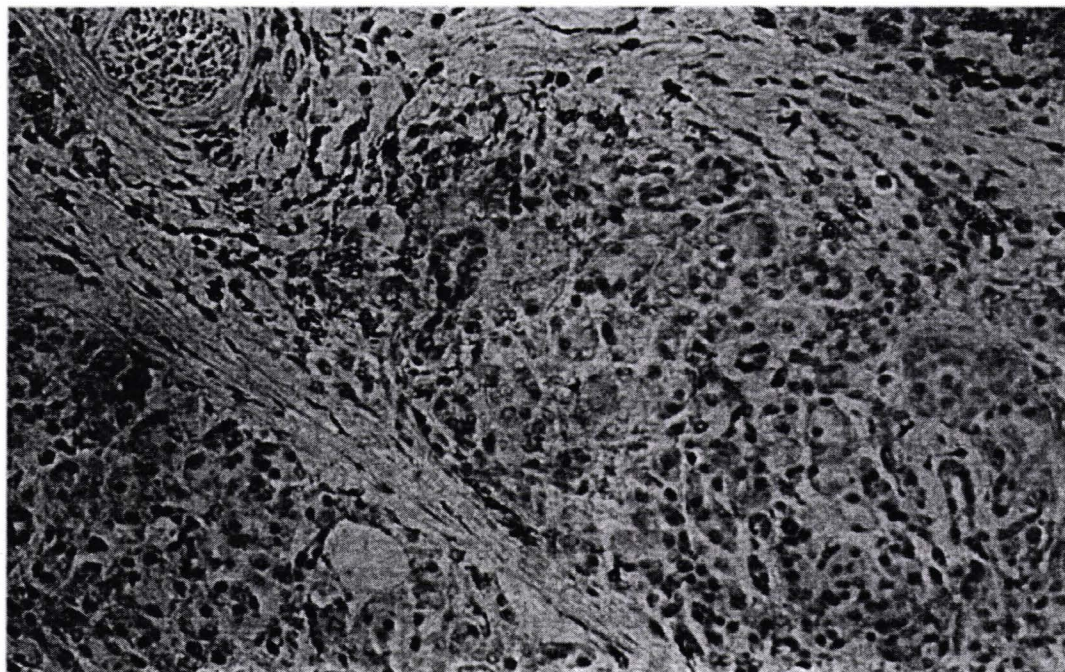
Referitor la subsetul de celule T, raportul CD4/CD8 a fost de 1,12. Infiltrația cu limfocite CD4 și CD8 este prezentată în Figura 1 și în Figura 2.

Aproape 80% din limfocitele T au avut CD45R0 identificându-se celule cu memorie. Numai 4,1% din celulele T au avut receptori de suprafață celulară pentru IL2.

Antigenul specific limfocitar pentru mucoasă a apărut în 8,7% din limfocite. În țesutul pancreatic din jurul carcinomului 5,7% din limfocite au fost recunoscute de M0AB specific celulelor B. În infiltrație, am descoperit un procent crescut (8,4%) de celule plasmatică (CD38+). Macrofagele au fost caracterizate prin expresia lui CD68. O medie de  $113,6 \pm 46,8$  celule/mm<sup>2</sup> a fost găsită pentru macrofage, reprezentând 32,4% din leucocite.



**Figura 1:** Analiza imunohistochimică a limfocitelor CD4+ din carcinomul pancreatic. (colorație tehnică APAAP - hematoxilină x400).



**Figura 2:** Analiza imunohistochimică a limfocitelor CD8+ din carcinomul pancreatic.  
(colorație tehnică APAAP - hematoxină x400)

### Discuții

În țesutul pancreatic din jurul carcinomului pancreatic s-a descoperit un număr crescut de celule mononucleare infiltrate, în comparație cu rezultatele din țesutul pancreatic normal<sup>0</sup>.

Infiltrația leucocitară a fost găsită în cazurile fără obstrucție marcată a ductului pancreatic. În țesutul pancreatic normal limfocitele T (31,3%) și macrofagele (56,3%) au fost predominant populate cu celule mononucleare fără tipar special al distribuției spațiale<sup>0</sup>.

Țesutul pancreatic obținut de la pacienții cu carcinom a fost caracterizat din punct de vedere histologic printr-un procentaj crescut al limfocitelor T (53,5%). Numai un număr scăzut de celule au avut receptori IL2 ca și marker al celulelor proliferative. Comparativ cu rezultatele noastre într-un număr mic de pacienți cu carcinom<sup>0</sup> raportul CD4/CD8 a fost crescut (1,12/0,78), indicând o ușoară acumulare preferențială a limfocitelor CD4 în timpul infiltrației continue.

Bedossa și colab<sup>0</sup> au găsit în pancreasul sănătos un număr egal de CD4 și CD8, raportul CD4/CD8 = aprox. 1, folosind un sistem de scor semicantitativ. Acești autori descriu de asemenea o predominanță a subsetului CD8 în pancreatita cronică. CD45R0 este puternic exprimat în celulele T cu memorie la contactul cu antigenul specific<sup>0</sup>. Aproape 80% din infiltratul cu celule T din țesutul pancreatic localizat în jurul carcinomului a fost caracterizat prin acești

markeri celulari cu memorie. A fost sugerată infiltrația selectivă cu celule cu memorie în pancreas, deoarece în compartimentul sanguin periferic celulele T cu memorie și cele „naive” sunt de mărime similară<sup>0</sup>.

De asemenea au fost prezente un număr scăzut de limfocite B și celule plasmice. Antigenul limfocitar specific pentru mucoasă (MLA) este receptorul gazdă al limfocitelor specifice pentru tractul gastro-intestinal<sup>0</sup>. Numai 8,7% din infiltrația limfocitară a țesutului pancreatic de la pacienții cu carcinom a exprimat acest receptor indicând că aceste limfocite nu au primit o specificitate ca și limfocitele tractului gastrointestinal.

Utilizând anticorpi împotriva CD14 ca și markeri monocitari, 66,2% din macrofagele marcate CD68+ au exprimat acest receptor ca și rezultat al infiltrației cu monocite în sângele periferic.

### Concluzii

1. Rezultatele noastre sugerează că țesutul pancreatic al pacienților cu carcinom pancreatic a avut o creștere semnificativă a celulelor pozitive mononucleare comparativ cu pancreasul normal.
2. Celulele predominante în această infiltrație sunt celulele T cu memorie, indicând un răspuns imun specific în țesutul din jurul carcinomului. Oricum aceste celule T nu proliferază.

**Bibliografie**

- GANSS, R., HANAHAN, D.: Tumor microenvironment can restrict the effectiveness of activated antitumor lymphocytes. *Cancer Res.* 1998;58:4673-4681.
- EMMRICH, J.: Immunohistochemical characterization of the pancreatic cellular infiltrate in normal pancreas, chronic pancreatitis and pancreatic carcinoma. *Digestion* 1997;59:192-198.
- CORDELL, J.L.: Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase. *J. Histochem. Cytochem.* 1984;12:219-229.
- BEDOSSA, P.: Lymphocyte subsets and HLA-DR expression in normal pancreas and chronic pancreatitis. *Pancreas* 1990;5:415-420.
- TOUGH, V.H., SPRENT J.: Turnover of naive- and-memory phenotype T cells. *J. Exp. Med.* 1994;179:1127-1135.
- DEPAOLI, P.: Age related changes in human lymphocyte subsets: Progressive reduction of the CD4, CD45R population. *Clin. Immunol.* 1988;48:290-296.
- SCHIEFERDECKER, H.L.: The HML1 antigen of intestinal lymphocytes is an activation antigen. *J. Immunol.* 1990;144:878-884.