

**IP UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„NICOLAE TESTEMIȚANU”**

Cu titlu de manuscris

C.Z.U.: 616.65-006-018(043.2)

GLOBA TATIANA

**PROFILUL MOLECULAR AL STROMEI ÎN PROLIFERĂRILE
BENIGNE ȘI MALIGNNE ALE PROSTATEI**

311.02 – ANATOMIE PATOLOGICĂ

Rezumatul tezei de doctor în științe medicale

CHIȘINĂU, 2022

Teza a fost elaborată la Catedra de histologie, citologie și embriologie al IP Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” în colaborare cu Centrul de Cercetări în Angiogeneză, UMF „Victor Babeș”, Timișoara, Romania

- Conducător științific:** ȘAPTEFRAȚI Lilian, dr. hab. șt. med., profesor universitar
- Conducător științific prin cotutelă:** RAICA Marius, dr. în medicină, profesor universitar, UMF “Victor Babeș”, Timișoara, România
- Consultant științific:** EȘANU Nicolae, dr. șt. biol., profesor universitar
- Referenți oficiali:** CĂRUNTU Irina-Draga, dr. în medicină, profesor universitar, UMF “Grigore T. Popa”, Iași, România
- NAKU Viorel, dr. hab. șt. med., profesor universitar, USMF “Nicolae Testemițanu”, Chișinău

Componența consiliului științific specializat:

- Președinte:** FULGA Veaceslav, dr. hab. șt. med., conferențiar universitar
- Membrii:** DAVID Valeriu, dr. șt. med., conferențiar universitar
- ȘTEFANEȚ Mihail, dr. hab. șt. med., profesor universitar
- DUMBRĂVEANU Ion, dr. hab. șt. med., conferențiar universitar
- CEAUȘU Raluca Amalia, dr. med., conferențiar universitar

Susținerea va avea loc la ” 07 ” septembrie ” 2022, ora 14⁰⁰, în ședința Consiliului științific specializat D 311.02-22-27 din cadrul IP USMF „Nicolae Testemițanu” (bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, Chișinău, MD-2004).

Teza de doctor și rezumatul pot fi consultate la biblioteca IP USMF „Nicolae Testemițanu” și pe pagina web a ANACEC www.anacec.md.

Rezumatul a fost expeditat la ” 29 ” iulie ”

Secretar științific al Consiliului științific specializat, dr. șt. med., conf. univ.

DAVID Valeriu

Conducător științific,
dr. hab. șt. med., prof. univ.

ȘAPTEFRAȚI Lilian

Conducător științific prin cotutelă,
dr. în medicină, prof. univ.

RAICA Marius

Consultant științific,
dr. șt. biol., prof. univ.

EȘANU Nicolae

Autor

GLOBA Tatiana

© Globa Tatiana, 2022

CUPRINS

REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII	4
CONȚINUTUL TEZEI	7
1. Importanța componentelor stromale în dezvoltarea leziunilor proliferative benigne și maligne de prostată	7
2. Materialul și metodele de cercetare	8
3. Particularitățile histologice și histochimice a componentelor stromale și epiteliale în leziunile proliferative de prostată	9
3.1. Raportare histologică (colorația hematoxilină-eozină).....	9
3.2. Evidențierea fibrelor reticulare.....	10
3.3. Evidențierea fibrelor de colagen și celulelor musculare netede.....	11
4. Caracteristica imunohistochimică a stromei în leziunile proliferative de prostată.....	12
4.1. Expresia actinei mușchiului neted-alpha (α -SMA) în leziunile proliferative de prostată.....	12
4.2. Studiul mastocitelor în leziunile proliferative benigne și maligne.....	13
4.3. Mastocitele și relația lor cu vasele sanguine CD34+.....	14
4.4. Expresia CD68 în leziunile proliferative benigne și maligne de prostată.....	15
4.5. Expresia S100 în leziunile proliferative benigne și maligne.....	17
4.6. Expresia receptorilor androgeni în leziunile proliferative de prostată.....	18
5. Analiza comparativă a componentelor stromale ale prostatei și rolul acestora în tumorigeneză	19
CONCLUZII GENERALE ȘI RECOMANDĂRI	23
BIBLIOGRAFIA	24
LISTA PUBLICAȚIILOR AUTORULUI LA TEMA TEZEI	26
ADNOTARE (în română, rusă și engleză)	28
Foaia privind datele de tipar.....	31

REPERELE CONCEPTUALE ALE CERCETĂRII

Actualitatea și importanța temei. Prostata este organul unde își au localizarea două patologii proliferative: hiperplazia nodulară benignă și adenocarcinomul. Carcinoamele și hiperplazia benignă sunt cele mai frecvente leziuni care afectează prostata, constituind peste 90% din toate afecțiunile prostatei [1]. Hiperplazia nodulară benignă se caracterizează printr-o proliferare progresivă, discontinuă, atât a celulelor epiteliale glandulare, cât și a celulelor stromale, care, în final, duce la creșterea glandei și evoluția simptomelor clinice [31]. Diverse studii au relevat că prevalența hiperplaziei benigne de prostată crește semnificativ după cel de-al patrulea deceniu al vieții și se determină la până la 90% dintre bărbații cu vârsta peste 80 de ani [15]. Mecanismele moleculare exacte care stau la baza inițierii, menținerii și dezvoltării hiperplaziei rămân a fi doar parțial descifrate [15]. Adenocarcinomul de prostata este o formă foarte imprevizibilă de cancer. Întrucât multe tipuri de cancer de prostata sunt cu creștere lentă și ar putea fi lăsate fără tratament, altele sunt foarte agresive. Carcinoamele de prostată sunt considerate a fi patologii cu caracteristici și comportamente biologice variate. Mai mult, adenocarcinoamele de prostată sunt reprezentate de multiple focare cu heterogenitate histologică și moleculară variată în cadrul aceleiași pacient [22].

Stroma prostatei se caracterizată printr-o plasticitate absolută, ce determină un răspuns prompt la perturbarea homeostaziei, iar interacțiunile între epiteliu și stromă sunt cunoscute ca fiind importante atât în timpul dezvoltării prostatei, cât și în dezvoltarea, progresia leziunilor proliferative maligne, dar și benigne. Aceste interacțiuni sunt mediate de o varietate de factori paracrin secretați de celulele epiteliale modificate și/sau celulele stromale [13, 28]. Totalitatea modificărilor fenotipice și genotipice apărute în stromă sunt denumite prin termenul de stromă reactivă sau stromă tumorală. Această stromă modificată este de tip reparativ, caracterizată prin creșterea densității celulelor inflamatorii, reacție desmoplazică, alterarea expresiei factorilor de creștere și citokinelor, creșterea angiogenezei și remodelarea matricei extracelulare [5].

Reactivitatea stromei asociate tumorii variază atât în amplitudine, cât și în compoziție sa, în funcție de leziune, dar și gradul de diferențiere tumorală. Compoziția stromei reactive este esențială pentru biologia tumorală [6]. Înțelegerea mecanismelor care reglementează recrutarea, activarea și biologia celulelor stromei reactive este o problemă importantă. De asemenea, posibilă că, interacțiunile paracrine între epiteliu și stroma reactivă pot fi implicate în apariția carcinoamelor rezistente la castrare. Reieșind din toate aceste motive, este extrem de important să fie identificate noi metode de diagnostic ce vizează micromediul stromei reactive, ceea ce va dezvolta și noi abordări terapeutice în tratamentul cancerului de prostată. În ultimele decenii a fost recunoscut faptul că dezvoltarea, evoluția rețelei vasculare reprezintă un moment crucial pentru creșterea exponențială a tumorilor maligne și ulterior, dezvoltarea metastazelor. Leziunile hiperplazice sunt dependente de angiogeneză, iar studiul mecanismelor, factorilor moleculari prin care tumora și patul său vascular se intercondiționează reciproc are valoare prognostică și terapeutică. Terapiile ce au drept țintă angiogeneza tumorală se bazează în principal pe observația că vasele tumorale prezintă caracteristici distincte, specifice care le deosebesc net de vasele normale, mature preexistente.

În contextul celor discutate mai sus, reiese necesitatea efectuării un studiu profund al micromediului stromal din leziunile hiperplazice benigne și maligne de prostată, prin caracterizarea și definirea modificărilor celulare și matriciale cu identificarea unor potențiali

factori reglatori, și, de asemenea, să se determine relații de asociere între factori de creștere, metaloproteineaze, hormoni cu prognosticul tumorii.

Scopul lucrării: Studiarea componentelor stromale ale prostatei prin evaluarea rolului factorilor stromali în carcinogeneza, în vederea îmbunătățirii diagnosticului histologic.

Obiectivele cercetării:

1. Studiul histologic (gradul și tipul leziunii) și imunohistochimic a componentei celulare stromale (α -SMA, MCT, CHY, CD117, CD68, S100) în leziunile hiperplazice benigne și maligne ale prostatei.
2. Determinarea modificărilor cantitative și topografice ale fibrelor de colagen tip I și tip III în cadrul leziunilor hiperplazice benigne și maligne de prostată;
3. Studiul rețelei vasculare sanguine prin determinarea densității și tipurilor de vase în raport de severitatea leziunilor hiperplazice de prostată;
4. Estimarea gradului de exprimare a receptorilor androgenici de către celulele stromale și glandulare.

Ipoteza de cercetare. Reieșind din complexitatea structurală a stromei au fost formulate următoarele ipoteze de cercetare, precum: existența relației între modificările cantitative, calitative ale stromei și evoluția leziunilor proliferative; scăderea numărului celulelor musculare netede poate fi legată cu evoluția fulminantă a patologiei hiperplazice și un pronostic rezervat; modificarea caracteristicilor componentei fibrilare a stromei (fibrelor de colagen tip I și reticulare) poate fi considerată drept marker tisular al gradului fibrozei în leziunile hiperplazice de prostată; existența relației între modificarea imunofenotipului mastocitelor și activitatea lor; celulele imune interacționând cu alte celulele stromale promovează modificări cantitative și calitative ale stromei de prostata; scăderea densității receptorilor androgeni stromali poate facilita proliferarea tumorală; existența relației între mastocitele triptază pozitive și angiogeneza tumorală.

Metodologia generală a cercetării. Studiul efectuat a fost primar, descriptiv, observațional transversal. În conformitate cu scopul și obiectivele lucrării, a fost cercetat țesutul prostatei în succesiunea modificărilor stromale în leziunile proliferativă benignă și maligne. Au fost studiate componentele stromei: celulele, fibrele de colagen și vasele sangvine. În studiul dat au fost utilizate metode morfologice de cercetare. Studiul a inclus material histologic uman (specimene cu patologie prostatică), care a fost recoltat prin operație deschisă, TURP, iar selectarea specimenelor s-a realizat prin aplicarea criteriilor de includere și de excludere. Din punct de vedere etic studiul nu a inclus elemente de experimentare umană. Materialul a fost împărțit în 3 loturi: control, leziunilor hiperplazice benigne și carcinoamelor de prostată. Specimenele cu cancer de prostată au fost împărțite în 2 grupuri: adenocarcinoamele acinare și carcinoame non-acinare. Diferențierea histologică a adenocarcinoamelor acinare a fost efectuată cu utilizarea scorului Gleason. În cercetarea dată au fost utilizate metode: histologice (HE, tricromă Masson), histochimice (impregnarea argentică), imunohistochimice (α -SMA, MCT, CHY, CD117, CD68, S100, AR, dubla imunocolorare anti-CD34/anti-MCT), lumină polarizantă. Cuantizarea datelor s-a realizat prin metodele: hot-spot, Weidner modificată [33], Hilly modificată [14], Ohno modificată [26], scorul Quick pentru receptorii steroizi [23]. Datele acumulate au fost procesate statistic prin calcularea mediei aritmetice (M), erorii standard (ES), coeficienților de corelare non-parametrici Pearson, Spearman (r). Veridicitatea diferenței

mediilor aritmetice (p) a fost comparată cu ajutorul criteriului Student, valorile $p < 0,05$, fiind considerate semnificative.

Noutatea și originalitatea științifică a rezultatelor obținute. În lucrarea dată au fost raportate în premieră câteva aspecte ce țin de profilul molecular al stromei reactive în proliferările benigne și maligne ale prostatei. A fost definită și descrisă stroma reactivă din adenomul și carcinomul de prostată, cu reliefarea rolului reacției stromale în geneza leziunilor proliferative benigne și maligne de prostată. Au fost demonstrate modificările fundamentale ale MEC, cu accentuarea componentei colagenice, atât intratumoral, cât și peritumoral pentru toate formele de adenocarcinom, inclusiv și a gradului de maturizare a fibrelor de colagen. A fost identificat raportul populațiilor de celule stromale (celule musculare netede, miofibroblaste, macrofage, celule dendritice, mastocite) în leziunile proliferative de prostată. Au fost identificate imunofenotipurile mastocitelor din stroma leziunilor proliferative benigne și maligne de prostată, totodată, fiind stabilit un imunofenotip unic mastocitar în ariile peritumorale din adenocarcinoamele de prostată. Au fost determinate particularitățile angiogenezei tumorale în leziunile proliferative benigne și maligne de prostată. Utilizând dubla imunocolorare a fost demonstrată implicarea mastocitelor pozitive la triptază în procesul de neoangiogeneză, atât în leziunile hiperplazice benigne, cât și în carcinomul de prostată. A fost stabilit că celulele dendritice stromale exercită un efect important anti-tumoral, iar scăderea numărului lor este un factor de prognostic nefavorabil, pe când creșterea numărului de celule dendritice intraepiteliale poate genera dezvoltarea toleranței imune. A fost stabilit că expresia stromală a AR în carcinomul de prostată scade proporțional cu creșterea gradului de diferențiere a tumorii, ceea ce poate fi interpretat ca o selecție naturală a celulelor stromale AR negative față de celulele AR pozitive.

Semnificația teoretică și valoarea aplicativă a lucrării. Prin analizarea evoluției modificărilor cantitative și calitative ale populațiilor celulare, și a componentelor matricei extracelulare a fost posibilă completarea cunoștințelor existente cu informații noi despre implicarea stromei în procesele proliferative a parenchimului prostatei, confirmarea utilității metodelor histologice și imunohistochimice în diagnosticarea și evaluarea severității proliferărilor de prostată.

Aprobarea rezultatelor științifice. Rezultatele științifice expuse în lucrare au fost comunicate și discutate în cadrul diferitor foruri științifice naționale și internaționale: Annual conference of the PHD and POST-DOC students, Tîrgu Mureș, Romania, 2013; International Scientific Conference Actual Issues of Morphology dedicated to 70th year anniversary of “Nicolae Testemițanu” SUMPh, Chișinău, 2015; Conferința științifică anuală al USMF “Nicolae Testemițanu”, Chișinău, 2019; International Scientific Conference Actual Issues of Morphology dedicated to the 75th anniversary of the founding of “Nicolae Testemitsanu” SUMPh, Chișinău, 2020; Congresul consacrat aniversarii a 75-a de la fondarea USMF „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, 2020.

Teza a fost discutată, aprobată și recomandată spre susținere la ședința Catedrei de histologie, citologie și embriologie a USMF “Nicolae Testemițanu” (process verbal nr.11 din 09.03.2022) și Seminarul Științific de profil 311. Anatomie și morfologie; 351. Medicină interdisciplinară (process verbal nr.2 din 06.04.2022).

Publicațiile la tema tezei. Pe marginea temei au fost publicate 12 lucrări științifice, dintre care 6 articole în reviste științifice (1 articol în reviste din bazele de date Web of Science și SCOPUS, 5 articole în reviste din Registrul Național al revistelor de profil); 3 articole în culegeri științifice și 3 teze în lucrările conferințelor științifice internaționale și naționale. Au fost obținute 5 certificate de inovator și 9 acte de implementare practică a rezultatelor științifice.

Implementarea rezultatelor științifice. Rezultatele studiului dat au fost implementate în activitatea didactică și științifică a Catedrei de histologie, citologie și embriologie și a Laboratorului de morfologie al USMF "Nicolae Testemițanu".

Sumarul compartimentelor tezei. Teza realizată în limba română este expusă pe 166 pagini, dintre care partea principală reprezintă 119 pagini. Teza constă din adnotări, introducere și 5 capitole, dintre care capitolul 1 prezintă reviuul literaturii, capitolul 2 – materialul și metodele de cercetare, capitolele 3 și 4 – include datele obținute, capitolul 5 – sinteza rezultatelor obținute; concluzii; recomandări practice; bibliografie. Bibliografia include 236 de titluri de referințe. Lucrarea conține 77 figuri, 23 tabele și 3 anexe.

Cuvinte-cheie: carcinom de prostată, adenom de prostată, stromă reactivă, matrice extracelulară, celulele α -SMA+, macrofage CD68+, celule S100+, mastocite, angiogenează, receptori androgeni.

CONȚINUTUL TEZEI

1. Importanța componentelor stromale în dezvoltarea leziunilor proliferative benigne și maligne de prostată

Acest compartiment al cercetării este dedicat analizei surselor științifice care raportează date despre implicarea componentelor stromale în procesul de cancerogenează. Stroma reprezintă carcasa de susținere a organului, fiind alcătuită din țesut conjunctiv. După părerea lui Cunha, noțiunea de stromă este un termen inexact care se referă doar la "componenta non-epitelială" a unui organ. Compartimentul stromal al prostatei are o structură mult mai complexă și este alcătuit din două componente de bază: componenta celulară și substanța extracelulară, ultima subdivizată în componenta fibrilară și componenta amorfă sau fundamentală. Heterogenitatea stromei reactive, precum și interacțiunile dintre diferite tipuri de celule ale stromei dau naștere unui micromediu cu un potențial înalt tumorogenetic.

Componenta celulară a stromei este reprezentată de celule, care secretă diverși factori de creștere, produc componentele matricei extracelulare și exprimă receptori pentru androgeni, etc [20]. Stroma este reprezentată de diverse tipuri de celule, precum miocitele netede, fibroblastele, miofibroblastele, mastocite, celule dendritice, celulele imune și celulele endoteliale. Celulele stromei reactive din micromediul tumoral modulează progresia și severitatea cancerului, dar și procesele de angiogenează și inflamație.

Matricea extracelulară reprezintă o barieră în calea celulelor tumorale atât în tumorile primare, cât și cele secundare. Pentru a depăși această barieră, celulele tumorale modifică conținutul de proteaze specifice, astfel, degradând componentele extracelulare. Producerea componentelor matricei extracelulare și a proteazelor de către celulele stromei reactive indică faptul că, matricea extracelulară din leziunile proliferative ale prostatei este într-un proces continuu de remodelare activă și indirect sugerează modificarea micromediului stromal. Majoritatea studiilor asupra stromei tumorale cercetează interacțiunea componentelor stromei cu

celulele epiteliale ale cancerului. Studii consacrate interacțiunii diferitor tipuri de celule stromale între ele dar și cu componentele matricei practic lipsesc. Totuși, nu este exclus că asemenea interacțiuni există.

Androgenii realizează un rol important în menținerea homeostaziei stromei, precum și în modificările din stroma reactivă în diverse leziuni proliferative de prostată. Pe langa rolul lor în dezvoltarea normală a prostatei și menținerea homeostaziei acesteia, androgenii, de asemenea, potențiază evoluția hiperplaziilor de prostată. Aprecierea rolului receptorilor androgenici stromali de-a lungul progresiei hiperplaziilor de prostată ar aduce date noi care ar sta la baza îmbunătățirii terapiei hormonale.

2. Materialul și metodele de cercetare

Capitolul prezintă caracteristica generală a materialului studiat, metodelor histologice, imunohistochimice de cercetare. Sunt prezentate grupele de leziuni incluse în studiu și criteriile de selectare a cazurilor. Sunt descrise metodele de interpretare a rezultatelor (cuantificarea structurilor de interes, scorificarea intensității expresiei pentru imunomarkerii utilizați).

Studiul a fost primar, descriptiv, observațional transversal. Cercetarea a fost realizată pe țesut, recoltat de la pacienți cu patologie prostatică prin operație deschisă, TURP la bazele clinice din cadrul IMSP Institutul Oncologic și IMSP Spitalul Clinic Republican din R. Moldova, în perioada anilor 2007-2010. Pentru lotul de control speciemenle au fost prelevate, în primele 24 ore de la deces de la persoane decedate accidental, fără patologie de prostată detectată microscopic. Studiul a inclus pacienți cu vârsta cuprinsă între 23 și 87 ani. Pentru investigațiile imunohistochimice a fost selectat materialul de la 119 pacienți, respectiv 12 lotul control, 34 cu hiperplazie benignă de prostată și 73 cu carcinom de prostată. Numărul total de obiecte confecționate și studiate (preparate histologice) a fost 1316.

Pentru examinarea morfologică toate secțiunile histologice au fost colorate cu hematoxilină-eozină. Tehnica de colorare a fost efectuată prin metoda standard. Această metodă a permis stabilirea diagnosticului histopatologic, stabilirea gradului de diferențiere al adenocarcinoamelor de prostată și selectarea secțiunilor destinate colorării imunohistochimice. Examinarea morfologică a secțiunilor în HE furnizează date limitate cu privire la implicarea stromei în dezvoltarea și progresia leziunilor proliferative de prostată, deaceia pentru identificarea gradului de colagenizarea al stromei, analiza modelelor de distribuție a fibrelor de colagen și a miocitelor netede în leziunile benigne și maligne de prostată, secțiunile histologice au fost colorare prin metoda tricromă Masson și prin impregnare argentică după metoda Gordon-Sweet.

În cercetarea dată au fost utilizate și metode imunohistochimice - α -SMA, MCT, CHY, CD117, CD68, S100, AR, dubla imunocolorare anti-CD34/anti-MCT.

Pentru dubla imunocolorare s-a folosit 2 anticorpi monoclonali: anti-CD34 (clona 1A4 pentru evidențierea endoteliului vaselor microcirculației) și anticorpi anti-triptază mastocitară (clona AA1). Dubla imunocolorare a permis studiul microdensității vasculare și stabilirea legăturii între microdensitatea vasculară și mastocitele implicate în angiogeneza tumorală.

Cuantizarea datelor s-a realizat prin metodele: hot-spot, Weidner modificată [33], Hilly modificată [14], Ohno modificată [26], scorul Quick pentru receptorii steroizi [23]. Datele acumulate au fost analizate statistic, astfel reușind: sistematizarea rezultatelor, formularea concluziilor și elaborarea recomandărilor practice.

Tabelul 1. Metodele imunohistochimice utilizate în studiu

Anticorp	Clona	Sistem de detecție	Demascare Antigen	Incubare anticorp
Actina mușchi neted-alpha	Human Alpha Smooth Muscle Actin, clona csm-1	Bond Polymer Refine Detection System	20 minute, pH 10, PT-Link	15 minute
Triptaza mastocitară	Monoclonal mouse anti-human, clona AA1	NovoLink Polymer System	Max Detection 30 minute, pH6, PT-Link	30 minute
Chimaza mastocitară	Monoclonal mouse anti-human, clona CC1	NovoLink Polymer System	Max Detection 30 minute, pH6, PT-Link	30 minute
CD 117	Mouse, monoclonal, clona T595	Bond Polymer Refine Detection System	20 minute, pH9, PT-Link	15 minute
CD68	Human CD68 antigen, clona 514H12	Bond Polymer Refine Detection System	20 minute, Bond Epitope Retrieval Solution 2	20 minute
S100	polyclonal	Bond Polymer Refine Detection System	10 minute, Bond Enzyme 1	20 minute
AR	Monoclonal mouse anti-human, clona AR 441	NovoLink Max Polymer Detection System	40 minute, pH6, PT-Link	30 minute

3. Particularitățile histologice și histochimice a componentelor stromale și epiteliale în leziunile proliferative de prostată

3.1 Raportare histologică (colorația hematoxină-eozină)

Patologia proliferativă benignă s-a caracterizat printr-un grad înalt de modificări arhitecturale atât la nivel epitelial, cât și stromal. Majoritatea leziunilor hiperplazice nodulare (HBP) au prezentat leziuni asociate: hiperplazie de celule bazale (BCH) (n=3), atrofie prostatică (n=3), arii de țesut prostatic cu inflamație (n=12) și noduli stromali hiperplazici (n=11).

Patologia proliferativă malignă (CaP) reprezintă de un grup heterogen de leziuni, ponderea cea mai mare o are adenocarcinomul slab diferențiat, cu scor Gleason mai mare de 8, urmat de adenocarcinomul moderat-diferențiat adenocarcinomul bine diferențiat și alte forme de carcinom prostatic. Adenocarcinomul de prostată s-a prezentat ca patologie multifocală în 72%. Un grup mare de leziuni maligne au prezentat leziuni asociate, precum, precum, HBP (n=12), hiperplazie de celule bazale (BCH) (n=3), neoplazie intraepitelială prostatică (PIN) de grad înalt (n=10).

Analizând aspectul stromei intranodulare și perinodulare, s-a observat că, pentru stroma intranodulară, indiferent de forma histologică de HBP, a fost caracteristic aspectul edemațiat și fibrozant comparativ cu stroma perinodulară care s-a prezentat mai compactă. Aspectul stromei tumorale a fost diferit în cele două grupuri de entități patologice (adenocarcinomul acinar și carcinomul non-acinar cu celule mici). Intensitatea modificărilor desmoplazice de la nivelul stromei adenocarcinoamelor acinare în funcție de gradul de diferențiere este reprezentată în tabelul 2.

Tabelul 2. Relația dintre intensitatea reacției desmoplazice și gradul histologic al tumorii

Grad de diferențiere al carcinomului	Intensitatea reacției desmoplazice			Total
	Redusă	Moderată	Intensă	
G1	7 (50%)	5 (35,7%)	2 (14,3%)	14
G2	4(19%)	14 (66,7%)	3 (14,3%)	21
G3	2 (6,7%)	13 (43,3%)	15 (50%)	30
CaP non-acinar	-	4 (26,7%)	11 (73,3%)	15
Total	13 (16,3%)	36 (45%)	31 (38,7%)	80

G1 – adenocarcinom bine diferențiat , G2 - adenocarcinom moderat diferențiat; G3 - adenocarcinom slab diferențiat, CaP – carcinom de prostată.

O particularitate a carcinoamelor de prostată a fost prezența invaziei perineurale, care a fost mai frecventă în carcinoamele cu celule mici. În speciunile studiate au fost prezenți și embolii tumorali, dovada extinderii vasculare a tumorii. Prezența embolilor intravasculari și a invaziei perineurale în dependență de gradul histologic este reprezentată în tabelul 3.

Tabelul 3. Prezența embolilor intravasculari și invaziei perineurale în dependență de gradul histologic al tumorii

Grad de diferențiere al carcinomului	Emboli intravasculari		Invazie perineurală		Total cazuri
	Absenți	Prezenți	Absentă	Prezentă	
G1	11 (78,6%)	3 (21,4%)	12 (85,7%)	2 (14,3%)	14
G2	15 (71,4%)	6 (28,6%)	17 (81%)	4 (19%)	21
G3	11 (36,6%)	19 (63,4%)	19 (63,3%)	11 (36,4%)	30
CaP non-acinar	4 (26,7%)	11 (73,3%)	5 (33,3%)	10 (66,7%)	15
Total	41 (51,3)	39 (48,7)	53 (66,3%)	27 (33,7%)	80

G1 – adenocarcinom bine diferențiat , G2 - adenocarcinom moderat diferențiat; G3 - adenocarcinom slab diferențiat.

3.2 Evidențierea fibrelor reticulare

În hiperplaziile nodulare benigne aspectul stromei variază în funcție de forma histologică a patologiei. Astfel, în formele pur glandulare cantitatea de stromă este mult redusă comparativ cu formele mixte sau stromale, în care volumul de stromă este crescut. Au fost evidențiate 2 pattern-uri distincte de distribuție a fibrelor reticulare: aranjament liniar și paralel, caracteristic ariilor perinodulare și aspect ratatinat al fibrelor reticulare, cu multiple ramificații fine, caracteristic ariilor intranodulare. Distribuția fibrelor reticulare în leziunile proliferative maligne a avut un caracter variat, nefiind vizualizat un anumit tipaj de distribuție în raport cu forma histologică, precum și scorul Gleason.

Densitatea fibrelor reticulare a fost în scădere comparativ cu densitatea înregistrată în speciunile cu leziuni benigne nodulare. Remarcăm că, a fost observată o diferență în densitatea fibrelor reticulare în raport cu ariile stromale studiate (intratumoral/peritumoral). Astfel, pentru majoritatea adenocarcinoamelor densitatea fibrelor reticulare a fost crescută în ariile intratumorale comparativ cu ariile peritumorale, unde a predominat componenta conjunctivă. În adenocarcinoamele cu scor Gleason mediu și înalt, fibrelor reticulare localizate periacinar prezentau un grad crescut de fragmentare în fibrile. Fragmentele fibrilare pătrundeau în componenta glandulară, circumscriind celulele tumorale. O particularitate a stromei a fost

prezența ariilor optic dense atât în leziunile benigne (mai frecvent), cât și maligne. Acestea erau dispuse neuniform în stromă și deseori formau conglomerate. Ariile au fost identificate ca procese focale de activare a celulelor fibroblast-like.

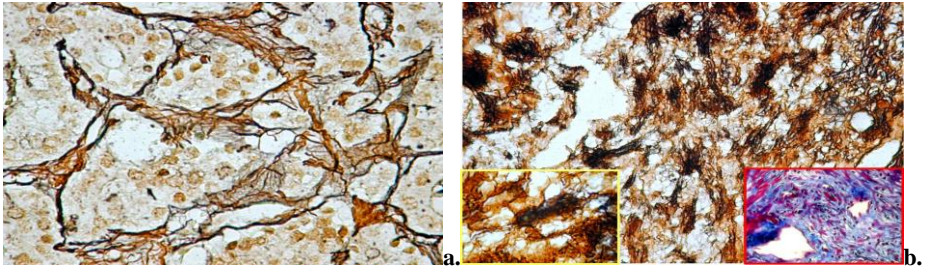


Fig. 1. Distribuția fibrelor reticulare în leziunile proliferative: a) fibre reticulare localizate periacinar cu grad crescut de fragmentare, $\times 20$; b) arii optic dense; aspect comparativ cu evidențierea fibrelor de collagen în tehnica tricrom Masson, $\times 40$, Impregnație argentică Gordon-Sweet.

Microscopic, aceste zone s-au caracterizat printr-o densitate sporită de fibre reticulare în aria pericelulară. Fibrele erau scurte, ondulate, intens ramificate, cu un caracter dezorganizat. În stroma adenocarcinoamelor aceste arii optic dense, au fost localizate focal în ariile peritumorale, perivascular și ariile de invazie tumorală.

3.3 Evidențierea fibrelor de collagen și celulelor musculare netede în leziunile proliferative benigne și maligne

În leziunile hiperplazice nodulare birefrigență fibrelor de collagen a fost similară lotului de control, ceea ce poate fi interpretat ca un indicator al gradului de maturizare a fibrei de collagen, puțin modificat în HBP. În adenocarcinoamele de prostată morfologia fibrelor de collagen a fost variabilă. Astfel, în stroma intratumorală a adenocarcinoamelor moderat și slab diferențiate, fasciculele de fibre de collagen au fost subțiri și puternic destrămate, în timp ce în stroma carcinoamelor bine diferențiate acestea erau groase, fără aspect ondulat.

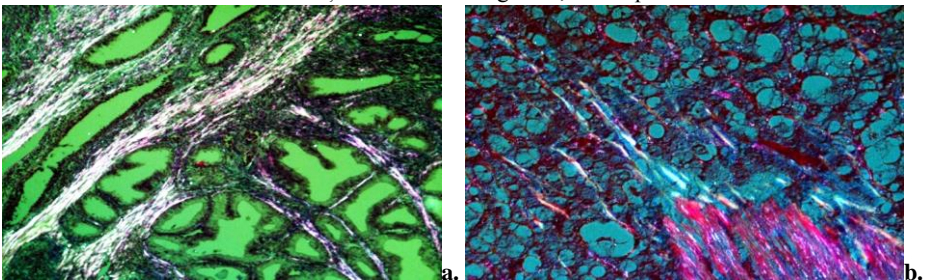


Fig 2. Stroma cu fibre de collagen birefringente (alb-transparent) între densitatea miocitelor (roz); a) leziune proloferativă benignă, $\times 10$; b) leziune proliferativă malignă, în aria de invazie tumorală, $\times 40$, Colorația tricromă Masson în lumină polarizantă

Practic în toate ariile intratumorale, rareori peritumoral, fibrele apăreau slab colorate. În leziunile proliferative maligne densitatea fibrelor de collagen birefringente a fost crescută peritumoral comparativ cu aria intratumorală. Intratumoral, distribuția fibrelor cu birefringență a

fost neomogenă, acestea fiind prezente în număr redus în ariile periferice ale masei tumorale și absente în zonele profunde ale prostatei.

Majoritatea fasciculelor de fibre, cu un grad crescut de destrămăre și distribuție haotică, erau înconjurată de matrice cu caracter mixoid. În stroma adiacentă ariilor de invazie tumorală, au fost observate plăci de stromă cu caracter hialinizat, ceea ce reprezintă dovada degradării matricei și a procesului de remodelare tumorală. Odată cu scăderea densității miocitelor a fost observată creșterea numărului celulelor fibroblastice, aspect cuantificat atât prin colorația Masson, cât și imunohistochimic (reducerea intensității de expresie a markerului α -SMA). În adenocarcinoamele bine-diferențiate miocitele, atât intratumoral, cât și peritumoral, erau organizate în fascicule, frecvent, separate de componenta conjunctivă cu caracter edematos, aspect observat și în stroma peritumorală din adenocarcinoamele slab diferențiate. Un fenomen aparte, care poate fi legat de activitatea fibroblastelor sau miofibroblastelor, a fost evidențierea unor halouri periacinare (spații de retracție în jurul acinului). Aspect care a caracterizat în special carcinoamele moderat și slab diferențiate.

4. Caracteristica imunohistochimică a stromei din leziunile proliferative

4.1 Expresia actinei mușchiului neted-alpha (α -SMA) în leziunile proliferative benigne și adenocarcinomul de prostată

Numărul celulelor SMA+ în stroma leziunilor proliferative benigne a variat în funcție de ariile studiate. Astfel că, proporția cea mai mare de celule SMA+ a fost observată în ariile perinodulare ale leziunilor benigne. Analizând populația celulară α -SMA+ din stroma, au fost identificate 2 tipuri celulare morfologic diferite. Celulele cu morfologie miofibroblastică, în raport cu epiteliul glandular, au prezentat un comportament cu caracter infiltrativ. În aceeași ordine de idei, notăm că, în 17,6% am observat acini glandulari care, bazal, exprimau α -SMA. Expresia bazală a fost datorată numărului mare de celule epiteliale bazale SMA+, dar și a extensiilor citoplasmice ale miofibroblastelor din jurul acinului.

Analizând densitatea celulelor α -SMA+ în stroma leziunilor proliferative maligne au fost observate variații numerice nu doar în funcție de arie, dar și legate de gradul de diferențiere a leziunii. Numărul cel mai mare de celule α -SMA+ a fost în adenocarcinoamele bine și moderat diferențiate, atât în ariile peritumorale, cât și cele intratumorale. Distribuția celulelor α -SMA+ în tumorile slab-diferențiate avea caracter heterogen.

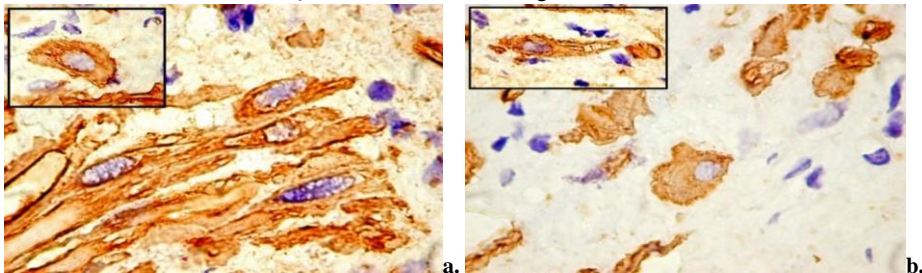


Fig. 3. Expresia markerului α -SMA de către celule din stroma hiperplaziei benigne de prostată: a) celule cu caracter morfologic de miocit, $\times 40$; b) celule cu caracter morfologic miofibroblastic $\times 40$; Imunoreacție pentru anti- α -SMA, DAB

Frecvent, a fost observată creșterea intensității de exprimare a markerului de către celulele stromale în ariile de invazie a tumorii. Populația celulară pozitivă la actina de tip mușchi neted din stroma a fost dominată de miofibroblaste, printre care erau localizate rare miocite. O reacție cu pattern granular citoplasmatic, iar uneori și membranar a fost observată în unele celule tumorale, în adenocarcinoamele slab diferențiate (23,3%) și carcinoamele cu celule mici (41,7%). Intensitatea expresiei în celulele tumorale a variat de la intens la slab.

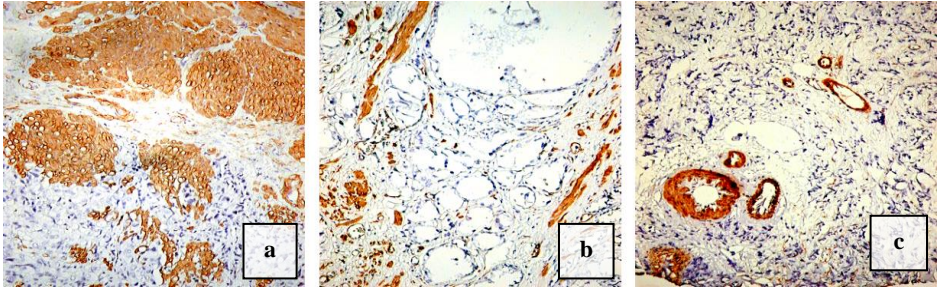


Fig. 4. Distribuția celulelor SMA+ în ariile intratumorale și peritumorale: a) adenocarcinom bine diferențiat, $\times 10$; b) adenocarcinom moderat diferențiat, $\times 10$; c) adenocarcinom slab diferențiat $\times 10$. Imunoreacție pentru anti- α -SMA, DAB

4.2 Studiul mastocitelor în leziunile proliferative benigne și maligne

Densitatea mastocitelor în leziunile hiperplazice benigne a fost crescută în ariile perinodulare. Expresia triptazei pentru mastocitele din ariile intranodulare și perinodulare s-a corelat semnificativ statistic ($r_p=0,65$, $p=0,001$). Același tip de corelație a fost obținut și în expresia chimazei ($r_p=0,39$, $p=0,024$) și CD117 ($r_p=0,44$, $p=0,009$). Perinodular mastocitele CD117 pozitive a corelat semnificativ statistic cu mastocitele MCT+ ($r_p=0,39$, $p=0,022$), și cu mastocitele CHY+ ($r_p=0,53$, $p=0,001$). În același timp nu a fost obținută corelație statistic semnificativă între expresia triptazei și chimazei. Intranodular nu au fost obținute corelații statistic semnificative între cei trei markeri. Astfel, perinodular au fost identificate 2 fenotipuri de mastocite: TRYP+CD117+CHY- și TRYP-CD117+CHY+. Ariile intratumorale au fost caracterizate prin heterogenitate fenotipică a mastocitelor.

În leziunile hiperplazice maligne, intratumoral, numărul mastocitelor MCT+ a fost redus comparativ cu zonele peritumorale. Distribuția mastocitelor a fost neuniformă, în majoritatea cazurilor, acestea fiind localizate izolat printre celulele tumorale. Datele despre densitatea mastocitelor în leziunile proliferative de prostată în funcție de tipul anticorpului au fost ogândite în tabelul 4.

În 15,1% de adenocarcinoame de prostată s-a observat expresia citoplasmatică a triptazei în celulele tumorale. Expresia citoplasmatică a CD117 de către celulele tumorale a fost observată în 20,5%. În leziunile maligne mastocitele MCT+ intratumorale au corelat statistic semnificativ cu mastocitele MCT+ peritumorale ($r_p=0,58$, $p=0,001$). Același tip de corelație a fost obținută pentru CD117 ($r_p=0,51$, $p=0,001$) și chimază ($r_s=0,37$, $p=0,001$). Intratumoral a fost obținută corelație statistic semnificativă între expresiile triptazei și chimazei ($r_p=0,36$, $p=0,002$), precum și între expresiile triptazei și CD117 ($r_p=0,65$, $p=0,001$), în același timp nu a fost obținută corelație statistic semnificativă între expresia chimazei și CD117 ($r_p=0,085$,

p=0,473). Peritumoral s-au observat corelații statistic semnificative între triptază și chimază ($r_p=0,33$, $p=0,005$), triptază și CD117 ($r_p=0,38$, $p=0,001$).

Tabelul 4. Densitatea* mastocitelor în stroma leziunilor proliferative de prostată

Imunomarcraj		HBP (n=34)	Adenocarcinomul acinar			Carcinom non acinar (n=12)
			Gleason 3-5 (n=14)	Gleason 6-7 (n=17)	Gleason 8-10 (n=30)	
McMCT+	IT	23,6±0,9	15±2,3	14,3±1,7	15,1±1,6	4,4±0,4
	PT	27±0,8	20,5±1,8	17±1,0	16,6±1,0	14,1±0,8
	<i>p</i>	< 0,001	< 0,001	0,092**	0,297**	< 0,001
McCHY+	IT	3,9±0,3	3,1±0,4	3,9±0,5	3±0,4	1,8±0,4
	PT	27,9±1,1	10,9±0,5	11,4±0,5	9,8±0,7	2,2±0,6
	<i>p</i>	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,483**
McCD117+	IT	7,1±0,5	6,4±1,9	6,8±1,5	6,8±1,2	2,5±0,3
	PT	23,6±1,4	9,6±0,8	12,2±1,5	12,1±0,9	11,7±0,8
	<i>p</i>	< 0,001	0,109**	< 0,001	< 0,001	< 0,001

HBP – hiperplazia benignă de prostată; McMCT+ mastocite triptază pozitive, McCHY+ mastocite chimază pozitive, McCD117+ mastocite CD117 pozitive, IT – aria intratumorală, PT – aria peritumorală, *p* – valoare obținută prin test Student, * $M \pm ES$, ** între grupele comparate nu au fost stabilite deosebiri veridice

Peritumoral, au fost obținute corelații statistic semnificative între scorul Gleason și mastocitele MCT+ ($r_p=-0,31$, $p=0,007$), precum și mastocitele CHY+ ($r_p=-0,41$, $p=0,001$). Intratumoral, au fost obținute corelații semnificative între scorul Gleason și mastocitele CD117+ ($r_s=-0,28$, $p=0,019$), precum și mastocitele CHY+ ($r_s=-0,24$, $p=0,039$). În leziunile maligne, intratumoral au fost identificate 2 fenotipuri de mastocite: TRYP+CD117+CHY- și TRYP+CD117-CHY+. Ariile peritumorale au fost populate doar de imunofenotipul TRYP+CD117+CHY+.

4.3 Mastocitele și relația lor cu vasele sanguine CD34+

În leziunile proliferative benigne au fost descrise două tipuri de vase sanguine. Majoritatea vaselor imature erau localizate intratumoral. Acestea prezentau perete subțire, lumen neregulat, erau ramificate, cu aspect de "înmugurire". Deseori au fost observate grupuri mici de celule CD34+, care formau cordoane scurte neperforabile. În majoritatea cazurilor, celulele CD34+ au prezentat aspecte de activare: citoplasmă abundentă, contur neregulat, nucleu oval eucromatic. Vasele cu caracter matur erau localizate peritumoral. Densitatea vaselor a variat între 12 și 42 vase/cîmp. Numărul vaselor CD34+ a variat în funcție de ariile studiate, astfel că densitatea maximă a fost în ariile intratumorale. Densitatea medie a mastocitelor în stromă a fost 27,2±1,2. Acestea contrar vaselor CD34+ au dominat ariile peritumorale.

Cea mai mare densitate vasculară a fost prezentă în adenocarcinoamele acinare slab și moderat diferențiate. Peritumoral, vasele s-au caracterizat cu lumen larg, ușor colabate, cu un aspect de mozaic al peretelui vascular la expresia imunomarkerului CD34. Remarcăm că, în carcinoamele prostatice nu doar peritumoral, dar și intratumoral s-a observat o heterogenitate a reacției pozitive pentru CD34, fapt care sugerează includerea în peretele vaselor de neoformație a celulelor maligne din tumoră. În stroma peritumorală au fost observate și vase CD34-.

Frecvent, vasele peritumorale prezentau ramificații cu caractere morfologice de intususcepție, vectorul cărora era orientat spre aria tumorală.

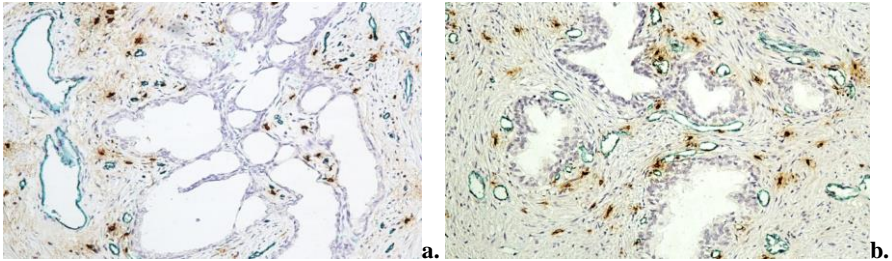


Fig. 5. Aspecte morfologice ale vaselor din ariile: a) perinodulare, $\times 10$; b) intranodulare, $\times 10$. Imunoreacție pentru CD34/Triptază, Vina Green /DAB.

Au fost obținute corelații statistice semnificative între mastocitele MCT+ și vasele CD34+ din ariile peritumorale atât în hiperplazia nodulară benignă ($r_p=0,58$, $p=0,001$), cât și în carcinomul de prostată ($r_s=0,26$, $p=0,027$). Densitatea vaselor CD34+ nu a corelat cu scorul Gleason, în timp ce densitatea celulelor MCT+ a realizat o corelație semnificativă ($r_p=-0,29$, $p=0,014$), ceea ce dovedește implicarea mastocitelor MCT+ în transformarea malignă. Un aspect particular și extrem de interesant a fost corelația directă dintre vasele CD34+ intratumoral și mastocitele MCT+ peritumoral ($r_p=0,32$, $p=0,006$), mai ales în lipsa unei corelații dintre CD34 peritumoral și MCT intratumoral ($r_p=0,047$, $p=0,695$).

Tabel 5. Densitatea* vaselor CD34+ și a mastocitelor din stroma leziunilor proliferative benigne și maligne de prostată

Imuno marcaj	HBP (n=34)	Adenocarcinomul acinar			Carcinom non-acinar (n=12)	
		Gleason 3-5 (n=14)	Gleason 6-7 (n=17)	Gleason 8-10 (n=30)		
McMCT+	IT	23,9 \pm 1,2	18,5 \pm 1,8	17,6 \pm 1,4	15,5 \pm 1,8	2,7 \pm 0,4
	PT	30,5 \pm 1,9	24,3 \pm 1,6	19,3 \pm 1,6	22,8 \pm 1,8	12,5 \pm 1,4
	<i>p</i>	< 0,001	0,002	0,291**	< 0,001	< 0,001
Vase CD34+	IT	28,9 \pm 1,0	25,4 \pm 1,9	40,9 \pm 3,4	38,6 \pm 2,8	15,0 \pm 1,3
	PT	19,1 \pm 0,8	13,7 \pm 1,2	13,1 \pm 0,9	15,2 \pm 1,1	14,4 \pm 4,1
	<i>p</i>	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,866**

McMCT+ - mastocite triptază pozitive; IT - aria intratumorală; PT - aria peritumorală; *p* - valoare obținută prin test Student, * M=ES, ** între grupele comparate nu au fost stabilite deosebiri veridice.

4.4 Expresia CD68 în leziunile proliferative benigne și maligne de prostată

În hiperplaziile benigne, macrofagele CD68+ din stroma ariilor intranodulare erau distribuite neomogen, majoritatea acestora fiind localizate în stroma subepitelială. În 32,3% au fost observate celule CD68+ în lumenul glandelor. Densitatea celulelor în ariile perinodulare a variat de la 8 până la 45celule/câmp, iar în ariile intranodulare între 21 și 75celule/câmp. În leziunile proliferative maligne, celulele CD68+ au fost distribuite neomogen atât peritumoral, cât și intratumoral. Acestea au fost localizate preferențial în trei zone distincte: de-a lungul marginii de invazie a tumorii, în stroma asociată tumorii, precum și în aria celulelor canceroase, inclusiv în lumenul acinilor glandulari modifi cați (Figura 6).

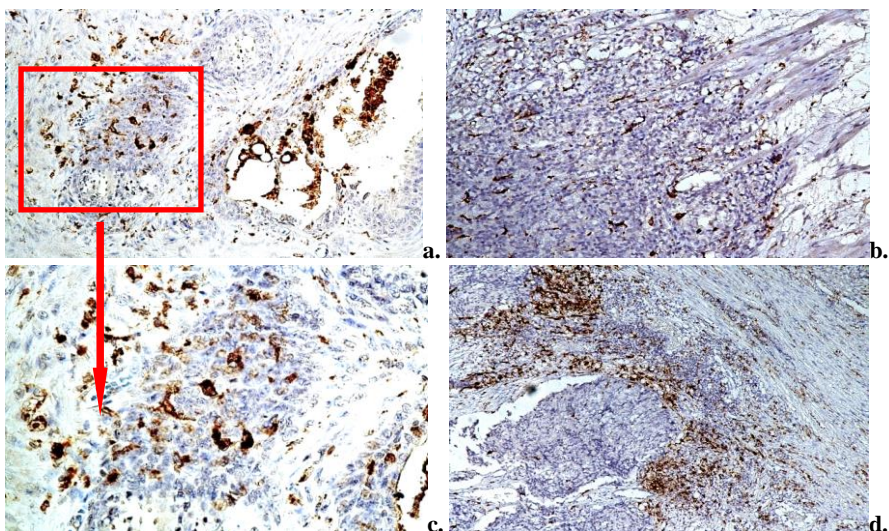


Fig. 6. Distribuția celulelor CD68+ în carcinomul de prostată $\times 10$, $\times 40$; Imunoreacție pentru anti-CD68, DAB

Pentru majoritatea adenocarcinoamelor densitatea maximă a fost în ariile intratumorale. A fost observată creșterea exponențială a numărului de macrofage CD68+ în raport cu gradul histologic al adenocarcinomului, atât intratumoral, cât și peritumoral (Figura 7).

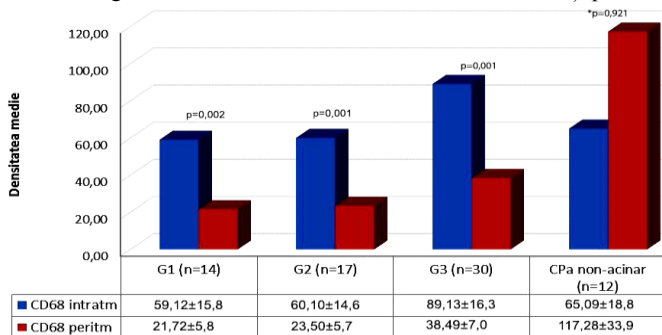


Fig. 7. Distribuția celulelor CD68+ pe grupele de carcinom de prostată, unde, G1 –carcinom bine diferențiat, G2 –carcinom moderat diferențiat, G3 –carcinom slab diferențiat, CaP non-acinar–carcinom de prostată non-acinar; * nu au fost stabilite deosebiri veridice

Macrofagele din stroma adenocarcinoamelor s-au prezentat ca populație celulară morfologic heterogenă, fiind evidențiate două tipuri distincte: celule de dimensiuni mici (predominant în stroma peritumorală) și celule de dimensiuni mari (intraepitelial). Distribuția celulelor CD68 de dimensiuni mici, avea un caracter de masă infiltrativă comparativ cu celulele de dimensiuni mari, care erau frecvent localizate solitar printre alte celule stromale sau formau grupări mici celulare. Un aspect particular observat în speciunile cu adenocarcinom de prostată a fost circumscrierea de către macrofage a simpexioanelor prostatice, aspect care nu a

fost observat în hiperplazia benignă de prostată. Aceste date ar putea sugera, indirect, modificări în compoziția secretului glandular.

Tabelul 6. Densitatea* celulelor CD68+ din stroma speciemenelor cu leziuni proliferative benigne și maligne ale prostatei

Leziunea	n	Intratumoral	Peritumoral	p
Hiperplazia nodulară benignă	34	39,1±1,9	15,6±1,2	<0,001
Carcinomul acinar/non-acinar	73	72,7±4,7	44,7±5,0	<0,001

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

Pentru evaluarea impactului prognostic al macrofagelor în adenocarcinoame s-a realizat corelația dintre numărul total de celule CD68+ și scorul Gleason, obținându-se o corelație statistic semnificativă ($r_p=0,43$, $p=0,001$). La defalcarea corelației pe zone intratumorale și peritumorale au fost obținute corelații statistic semnificative atât intratumoral ($r_s=0,31$, $p=0,008$), cât și peritumoral ($r_p=0,44$, $p=0,001$). Pentru evidențierea interrelațiilor dintre celulele din stroma adenocarcinoamelor au fost corelate densitățile macrofagelor și a mastocitelor. Astfel au fost obținute următoarele corelații:

<i>celule CD68+ peritim</i>	<i>mastocite MCT+ peritim</i>	$r_p=-0,26$, $p=0,037$
<i>celule CD68+ peritim</i>	<i>mastocite MCT+ intratm</i>	$r_p=-0,41$, $p=0,001$
<i>celule CD68+ peritim</i>	<i>mastocite CHY+ peritim</i>	$r_p=-0,58$, $p=0,001$
<i>celule CD68+ peritim</i>	<i>mastocite CHY+ intratm</i>	$r_s=-0,27$, $p=0,022$
<i>celule CD68+ intratm</i>	<i>mastocite CD117+ intratm</i>	$r_p=0,25$, $p=0,033$

Notă: r_p – coeficientul de corelație Pearson, r_s – coeficientul de corelație Spearman, *p* – pragul de semnificație statistică.

4.5 Expresia S100 în leziunile proliferative benigne și maligne

În leziunile hiperplazice benigne a prevalat densitatea celulelor S100+ din ariile stromale. Astfel, în stromă numărul celulelor S100+ varia de la 19 până la 65 celule/cîmp, iar la nivel epitelial de la 5-35 celule/cîmp.

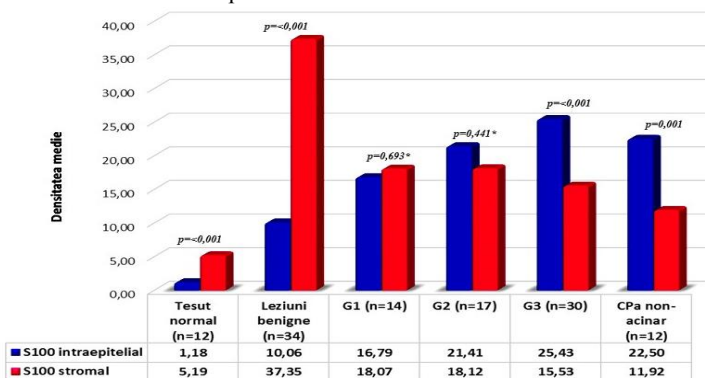


Fig. 8. Aspectul comparativ al distribuției celulelor dendritice S100+ intraepiteliale și stromale în normă, leziuni proliferative benigne și maligne, unde: G1 – adenocarcinom bine diferențiat, G2 – adenocarcinom moderat diferențiat, G3 – adenocarcinom slab diferențiat, CaP non-acinar – carcinom cu celule mici; *p* – valoare obținută prin test Student; * între grupele comparate nu au fost stabilite deosebiri veridice.

Distribuția celulelor dendritice atât la nivel epitelial, cât și stromal a fost neomogenă. Această diferență poate fi considerată una esențială și semnificativă, în special, în legătură cu prognosticul favorabil al leziunii, fapt confirmat și prin obținerea unei corelații statistice semnificative între densitățile celulelor dendritice intraepiteliale și celulelor dendritice stromale ($r_p=0,55$, $p=0,001$). În 20,6% markerul a fost exprimat de către celulele bazale ale acinilor glandulari. Cel mai înalt grad de infiltrare cu celule dendritice S100+ intraepiteliale a fost asociat cu adenocarcinoamele slab diferențiate. Densitatea celulelor dendritice intraepiteliale a avut o creștere liniară, astfel identificându-se asocierea semnificativă între densitatea celulelor dendritice și gradul de diferențiere al tumorii.

Celulele dendritice S100+ au fost caracterizate ca o populație celulară heterogenă, determinată atât de intensitatea de exprimare a imunomarcajului, cât și morfologia celulară. Au fost obținute corelații statistice semnificative între numărul total de celule S100+ din ariile studiate și scorul Gleason, atât intraepitelial ($r_p=0,25$, $p=0,036$), cât și stromal ($r_p=-0,24$, $p=0,042$). În 16,4% carcinoame slab diferențiate a fost observată expresia markerului în unele celule tumorale. Pentru evidențierea interrelațiilor dintre celulele din stroma adenocarcinoamelor au fost corelate densitățile celulelor dendritice cu a mastocitelor și macrofagelor. Astfel au fost obținute următoarele corelații:

<i>celule dendritice S100+ intraepiteliale</i>	<i>macrofage CD68+ intratm</i>	$r_p=0,28$, $p=0,018$
<i>celule dendritice S100+ stromale</i>	<i>mastocite CHY+ intratm</i>	$r_s=0,34$, $p=0,003$
<i>celule dendritice S100+ stromale</i>	<i>mastocite CD117+ intratm</i>	$r_s=0,25$, $p=0,034$
<i>celule dendritice S100+ stromale</i>	<i>mastocite CHY+ peritm</i>	$r_p=0,23$, $p=0,047$

Notă: r_p – coeficientul de corelație Pearson, r_s – coeficientul de corelație Spearman, p – pragul de semnificație statistică.

4.6 Expresia receptorilor androgeni în leziunile proliferative de prostată

Epitelial, expresia receptorilor androgeni (AR), în toate speciemenle cu hiperplazie benignă, a fost evidențiată în celulele luminale. O particularitate aparte a fost expresia AR de către celulele bazale. Majoritatea celulelor stromale au fost AR+. Distribuția celulelor AR+ în stromă a prezentat anumite particularități, astfel, în stroma subepitelială s-a observat scăderea numerică a celulelor AR+, aspect care, nu avea un caracter comun pentru toți acinii, iar uneori purta un caracter focal. Analizând detaliat secțiunile, s-a evidențiat că celulele fibroblast-like au fost preponderent AR-, iar, celulele musculare netede au fost AR+ (Figura 9).

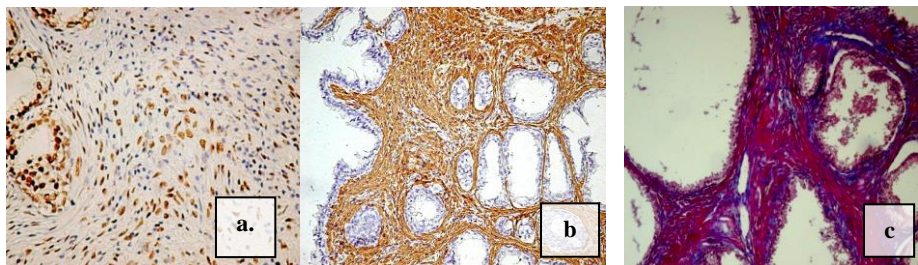


Fig. 9. Evidențierea celulelor AR+ în stroma leziunilor benigne: a) imunoreacție pentru AR, $\times 10$; b) imunoreacție pentru α -SMA, $\times 10$; c) colorația tricrom Masson, $\times 20$; Imunoreacții pentru anti-AR, pentru anti- α -SMA, DAB

Studiind speci­me­nele cu leziuni proli­ferative ma­lign­e de pro­stată au fost iden­ti­fi­cate trei pattern-uri ai ex­presiei AR de către celulele epi­te­liale și stromale: colorarea nucleară difuză, colorarea nucleară regională și colorarea nucleară focală. Toate trei tipuri de pattern-uri au fost con­si­derate drept răspuns pozitiv la imu­noreacția cu anti-AR. În carci­noamele moderat și slab diferențiate, celulele tumorale au exprimat AR nu doar nuclear dar și citoplasmatic. Ex­presia AR în celulele tumorale, cât și în cele stromale a fost mult mai heterogenă decât în speci­me­nele cu leziuni proli­ferative benigne. A fost observată o scădere semnificativă a ex­presiei AR stromal în speci­me­nele de carci­nom de pro­stată comparativ cu pro­stata hiperplazică benignă. Scăderea nivelurilor de AR din stroma tumorală a fost direct proporțională cu scorul Gleason.

Tabelul 7. Ex­presia AR de către celulele stromale în leziunile proli­ferative benigne și ma­lign­e de pro­stată

Leziunea	Pro­por­ția de celule stromale AR+	p	Scorul pentru intensitatea celulelor AR +			
			0	1	2	3
HBP (n=34)	79,1%	<0,001	0	0	15	19
G1 (n=14)	38,5%	<0,001	0	3	7	4
G2 (n=17)	25,7%	<0,001	0	8	9	0
G3 (n=30)	7%	<0,001	9	13	8	0
CaP non-acinar (n=12)	4,81%	<0,001	0	10	2	0

HBP – hiperplazie benignă, G1 – adenocarcinom bine diferențiat, G2 – adenocarcinom moderat diferențiat, G3 – adenocarcinom slab diferențiat, CaP – carci­nom de pro­stată, p - valoarea obținută prin test Student

Densitatea scăzută a celulelor AR+ în stroma carci­nomului pare să fie legată de scăderea numărului de miocite și de creșterea numărului celulelor fibroblastice, în special al miofibroblastelor, care sunt frecvent AR-. Totodată a fost observată pierderea ex­presiei AR în speci­me­nele în care densitatea miocitelor nu a suferit modificări cantitative drastice. A fost obținută corelație totală ($r_p = -0,86$, $p = 0,001$) la compararea scorului total al ex­presiei AR și scorul Gleason. La compararea densității generale ale celulelor stromale AR+ cu densitatea totală a altor celule stromale au fost obținute corelații cu densitatea mastocitelor MCT+ ($r_s = 0,32$, $p = 0,005$) și cu macrofagele CD68+ ($r_p = -0,41$, $p = 0,001$) din ariile peritumorale. Majoritatea vaselor intratumorale de dimensiuni mici sau medii au fost tapetate de celule endoteliale AR+. Ex­presia AR de către celulele endoteliale purta caracter omogen și intensitate înaltă.

5. Analiza comparativă a componentelor stromale ale prostatei și rolul acestora în tumorigeneză

Stroma asociată tumorii nu este doar un element de suport pentru celulele tumorale, dar reprezintă o componentă importantă implicată în creșterea, invazia și metastazarea tumorilor. Celulele stromale joacă un rol important în tumorigeneză, acționând prin diverse mecanisme. În cadrul lucrării date am stabilit că, stroma în țesuturile normale ale prostatei, precum și în leziunile hiperplazice benigne conținea fibre de colagen de grosimi variabile, cu caracter ondulat, dispuse în direcții diferite, astfel, realizând rețele tridimensionale. Birefringența și dicroismul fibrelor de colagen a demonstrat integritatea lor fibrilară. Variația crescută a distribuției fibrelor de colagen, și, în special a proprietăților anizotropice a fost

observată în stroma carcinoamelor de prostată. Încă în 1981, Muntzing [24] a relatat despre asocierea între creșterea în volum a prostatei și conținutul de collagen, sugerând ipoteza că, collagenul ar avea un rol de limitare a creșterilor hiperplazice în prostată. În condiții de homeostazie tisulară, fibrele de collagen prezintă un *turnover* metabolic lent, dar, în condiții de remodelare tisulară, acest proces este crescut [16]. Scindarea collagenului de tip I din stroma tumorală, descrisă în multiple lucrări, reprezintă un proces important pentru proliferarea tumorală, deoarece proteoliza duce la formarea de peptide de collagen I, care facilitează proliferarea și angiogeneza [25, 29]. În adenocarcinoamele cu grad înalt de dediferențiere, fibrele de collagen au fost subțiri și disociate, iar în zonele de invazie tumorală au fost detectate fibre de collagen birefringente. Considerăm că, prezența plăcilor cu aspect hialinizat în ariile de invazie tumorală sau zonele cu un grad crescut de proliferare celulară reprezintă stigmatul ale degradării matricei sau a procesului de remodelare.

Densitatea fibrelor reticulare odată cu progresia adenocarcinomului a scăzut comparativ cu densitatea fibrelor de collagen I [10]. Totuși în literatura de specialitate sunt studii care raportează nu doar despre scăderea cantității de fibre reticulare dar și a fibrelor de collagen I [64]. Astfel, evaluarea modificărilor componentelor fibrilare ale stromei din cancerul de prostată poate servi la stabilirea gradului anaplasiei și agresivității tumorale.

Dominarea numerică a miocitelor și vecinătatea apropiată a acestora cu fibrele de collagen, atât în normă, cât și în HBP, sugerează implicarea activă a acestor celule în procesul de organizare și reorganizare a matricei extracelulare, de-a lungul proceselor fiziologice și patologice. Stroma tumorală a fost caracterizată prin reducerea expresiei markerului celulei musculare netede – α -SMA, iar componenta celulară principală a fost reprezentată de miofibroblaste. Aceste miofibroblaste activate, deseori numite fibroblaste cancer asociate (CAF) joacă un rol central în progresia carcinomului de prostată și metastazarea acestuia [17].

Celulele musculare netede, sub influența androgenilor, mențin diferențierea și rata proliferativă a celulelor epiteliale, în același timp celulele epiteliale participă în menținerea diferențierii mușchiului neted. Interacțiunile între stromă și epitelii sunt mediate de factori de creștere sintetizați de celulele stromale. Odată cu creșterea gradului de dediferențiere a tumorii, celulele musculare netede devin mici, cu conținut citoplasmatic redus considerabil și treptat pierd vecinătatea cu celulele epiteliale [7]. În același timp se stabilesc interacțiuni reciproce între celulele canceroase și miofibroblaste. Aceste contacte realizate fie direct sau prin semnale paracrine, sunt esențiale pentru creșterea capacității invazive a tumorii și clinic se traduce într-un prognostic nefavorabil [7].

Un aspect interesant observat de noi prin metoda de impregnare argentică Gordon-Sweet a fost prezența unor zone optice dense, în special, în ariile intratumorale, atât în speciamele cu HBP, cât și CaP. Prezența conglomeratelor de celule active în stromă, indirect, demonstrează reactivitatea stromei la proliferarea epitelială exprimat printr-un proces intens, anormal de sinteză. Probabil, aceste schimbări sunt rezultatul apariției unei noi populații de celule stromale sau a unui proces de transformare a miocitelor netede la agresiunea hiperplazică a epiteliului.

Creșterea numărului de celule fibroblastice odată cu progresia adenocarcinomului de prostată a fost identificat și prin colorarea tricrom Masson, precum și prin metoda

imunohistochimică utilizând anticorpi pentru actină mușchi neted. Creșterea numărului de celule fibroblastice a fost invers proporțională cu gradul de diferențiere a carcinomului. Multiple studii sugerează că, pierderea celulelor musculare netede, cuantificate imunohistochimic prin intensitatea schimbărilor stromale și apariția fibroblastelor în număr crescut indică o evoluție fulminantă a carcinomului și un pronostic nefavorabil pentru pacient [3, 32].

Stroma reactivă reprezintă un amestec nu doar de fibroblaste/miofibroblaste, dar și alte celule, precum, celulele endoteliale, mastocitele, macrofagele și celule imune. Conform datelor noastre, densitatea totală a mastocitelor crește în hiperplazia benignă de prostată. Practic a fost înregistrată dublarea numărului de mastocite comparativ cu țesuturile normale și adenocarcinomul de prostată pentru toți markeri incluși în studiu. În schimb, distribuția mastocitelor în funcție de ariile studiate a fost neomogenă pentru cei trei markeri. După părerea lui Abe și colab. [2], Aydin și colab. [4] densitatea fibrilară crescută predominant în ariile stromale poate fi atribuită potențialului fibrinogen al triptazei secretate de mastocite. Astfel triptazei i-a fost atribuit rolul central în dezvoltarea HBP. Contrar acestor opinii datele studiului nostru sugerează implicarea activă a chimazei și CD117 în geneza HBP. Considerăm că, heterogenitatea fenotipică stă la baza gamei variate de răspunsuri generate de mastocite în diferite condiții patologice. În baza datelor obținute, susținem că, scăderea densității mastocitelor, în special în ariile peritumorale, determină un pronostic nefavorabil în adenocarcinomul de prostată. Considerăm important să notăm că, a existat o variabilitate considerabilă a numărului de mastocite de la un specimen la altul, precum și în cadrul aceluiași specimen, comportament regăsit și în hiperplazia benignă nodulară.

În ariile peritumorale expresiile triptazei și chimazei au corelat semnificativ cu scorul Gleason, ceea ce demonstrează implicarea acestor proteaze în influența procesului tumorigen din zonele periferice ale adenocarcinomului. Intratumoral a fost evidențiată o corelație slabă ca intensitate între expresia chimazei și scorul Gleason, pe fundalul corelației puternice dintre CD117 și Gleason, ceea ce sugerează implicarea mastocitelor CD117 în inițierea și menținerea procesului malign. Datele devin și mai convingătoare odată cu detectarea expresiei proteinei c-kit de către celulele tumorale, în special, în adenocarcinoamelor slab diferențiate.

În prezent, una din funcțiile principale ale mastocitului, recunoscută pe larg, este capacitatea de a induce formarea de vase noi. Distribuția prioritară a mastocitelor a fost, în principal, în jurul vaselor, izolate sau asociate cu procesele inflamatorii. Rezultatele noastre au demonstrat, de asemenea, o densitate vasculară crescută în adenocarcinomul de prostată în comparație cu leziunile proliferative benigne, asemănător cu datele regăsite în literatura de specialitate [7]. Aceste rezultate sugerează că densitatea vasculară crescută se datorează neoangiogenezei. Notăm că, nu am găsit diferențe semnificative, între grupurile de adenocarcinom, pentru densitatea medie a mastocitelor. În schimb, au fost constatate diferențe esențiale în densitatea medie microvasculară, în special pentru ariile intratumorale, unde numărul de vase, practic, a fost dublu. Un aspect particular, dar care prezintă interes, a fost corelația strânsă între vasele CD34+ intratumorale și mastocitele MCT+ peritumorale, are a sugerat implicarea mastocitelor în inițierea și susținerea angiogenezei din cadrul adenocarcinomului de prostată. Acest aspect s-a dovedit a fi și mai convingător în lipsa unei corelații între vasele CD34 peritumorale și celulele MCT intratumorale.

Numărul macrofagelor a crescut aproape de două ori comparativ cu țesuturile normale și leziunile benigne, creștere care, în mare parte, a fost realizată pe contul macrofagelor intratumorale. De asemenea, a fost observată o creștere liniară a numărului de macrofage CD68+, atât intratumoral, cât și peritumoral, în raport cu gradul histologic de diferențiere a adenocarcinoamelor. Gollapudi și colab. [12] au raportat despre niveluri crescute de TAM în neoplazia intraepitelială prostatică comparativ cu densitatea din țesuturile cu leziuni benigne, în același timp ei demonstrează că, pacienți cu scor Gleason mare conțin un număr crescut de TAM opus celor cu scor Gleason mic. De asemenea, foarte important este faptul că, TAM-urile din diferite compartimente tumorale, aparent, au efecte opuse asupra progresiei cancerului de prostată [20].

Multiple studii demonstrează rolul important al DC în imunitatea antitumorală. Rezultatele studiului nostru au arătat o creștere a densității celulelor dendritice în țesuturile cu leziuni de prostată față de țesuturile în normă. Diferența numerică față de lotul de control a fost una semnificativă. La defalcarea rezultatelor pe tipul leziunii am constatat că densitatea cea mai mare de celule dendritice a fost înregistrată în specișenele cu hiperplazie benignă de prostată. Notăm că, cel mai înalt grad de infiltrație cu celule dendritice S100+ intraepiteliale a fost asociat cu adenocarcinoamele slab diferențiate. Astfel, datele noastre demonstrează că creșterea numărului de celule dendritice S100+ intraepiteliale în adenocarcinomul de prostată este asociat cu un pronostic nefavorabil [11]. Există dovezi, legate de pierderea capacității de activare a limfocitelor T după expunerea celulelor dendritice în contact cu celulele tumorale și/sau legate de pierderea capacității lor de maturizare cu absența migrării în ganglioni limfatici [8]. În asemenea cazuri creșterea numărului de celule dendritice în ariile tumorale poate fi asociată cu un pronostic nefavorabil. Creșterea numărului de celule dendritice intraepiteliale poate fi asociată cu creșterea toleranței imune la mecanismele antitumorale.

Este stabilit că expresia AR în celulele epiteliale persistă pe tot parcursul evoluției canceroase. Creșterea expresiei AR în celulele epiteliale a fost asociată cu agresivitatea tumorii și scăderea supraviețuirii pacientului [21]. Considerăm că, determinarea nivelurilor de expresie AR doar într-un singur compartiment al organului reprezintă o posibilă cauză a rezultatelor eronate sau neconcludente despre cancerogeneza prostatică. Proporția de celule AR pozitive pentru stromă a fost mare (84,6%), iar distribuția celulelor AR pozitive stromale a fost uniformă. Scăderea numărului de celulele stromale AR+ a fost caracteristică și stromei din carcinoamele de prostată. Alți cercetători, de asemenea, au raportat că, amploarea pierderii AR stromal este direct proporțională cu gradul crescut al scorului Gleason [18, 19, 34]. În 1999, Olapade-olaopa E. și colab., [27] au raportat despre scăderea expresiei AR în stroma peri-epitelială încă din stadiul de neoplazie prostatică intraepitelială de grad înalt. Importante, sunt și datele raportate de unii cercetători despre asocierea pierderii expresiei AR stromal cu rezultatele clinice la pacienții cu carcinom de prostată. Credem că, pierderea AR stromal poate fi considerat un marker al agresivității bolii. Unele studii, deja, au asociat nivelul scăzut de receptori AR în stroma tumorală (numită și peritumorală) cu un risc crescut de recidivă al carcinomului prostatic după prostatectomiile parțiale și terapia de castrare [30, 34]. Evaluarea amănunțită a compartimentului stromal de-a lungul progresiei carcinomului de prostată reprezintă căile de evidențiere a noilor terapii.

CONCLUZII GENERALE

1. Adenocarcinomul de prostată este însoțit de diminuarea expresiei receptorilor androgenici în stroma tumorală concomitent cu scăderea numărului miocitelor α -SMA+ și creșterea populației de fibroblaste/miofibroblaste α -SMA-.
2. Creșterea densității celulelor dendritice S100+ intraepiteliale și scăderea numărului macrofagelor CD68+ peritumorale în stroma leziunilor hiperplazice de prostată sunt particularități histologice ale malignizării.
3. Mastocitele din zonele peritumorale dezvoltă un fenotip imunohistochimic particular: TRYP+CHY+CD117+ în adenocarcinomul de prostată spre deosebire de TRYP-CHY+CD117+ în hiperplazia benignă de prostată.
4. Adenocarcinoamele de prostată implică cooperarea celulelor CD68+, S100+, MCT+, CHY+ și CD117+ atât în ariile tumorale, cât și peritumoral, contribuind la secreția de substanțe biologice active cu rol reglator al proceselor proliferativ și angiogenic.
5. Progresia adenocarcinomului de prostată este însoțită de scăderea densității fibrelor de colagen tip I și tip III. Ariile intratumorale și zonele de invazie tumorală se caracterizează prin degradarea componentei fibrilare ale stromei. Fenotipului reactiv al stromei se dezvoltă începând cu hiperplaziile benigne de prostată; modificările ulterioare ale componentei fibrilare a matricei extracelulare sunt direct dependente de evoluția procesului tumoral.
6. Epiteliul glandular al prostatei, independent de caracterul leziunii, expresează combinația de markerii CD117+, CD68+, S100+, MCT+, CHY-, α -SMA+. Astfel, modificările epiteliale generează reacții adaptive din partea tuturor componentelor stromei, inclusiv rețelei de vase intratumorale.
7. Carcinogeneza induce angiogeneza predominant intratumoral, susținută atât de mastocitele peritumorale MCT+, cât și de macrofagele peritumorale CD68+.

RECOMANDĂRI

1. Drept repere pentru diagnosticul histologic în leziunile hiperplazice ale prostatei, recomandăm estimarea numărului celulelor stromale α -SMA+ și expresiei receptorilor androgenici în stromă.
2. În evaluarea prognosticului adenocarcinoamelor de prostată, recomandăm determinarea expresiei AR concomitent în epiteliu și stromă.
3. Pentru determinarea rolului mastocitelor, recomandăm stabilirea fenotipului celular în baza unui set minim de 3 markeri: anti-triptaza mastocitară (MCT), anti-chimaza mastocitară (CHY) și CD117.
4. La evaluarea prognosticului în adenocarcinoamele de prostată, recomandăm compararea densităților celulelor dendritice S100+ intraepiteliale *versus* celulelor dendritice S100+ stromale.

5. Pentru a permite extinderea timpului de examinare a preparatelor histologice colorate imunohistochimic prin metodă de dublu imunomarcaj, recomandăm utilizarea cromogenului Vina Green.

BIBLIOGRAFIA

1. AARON, L.T., FRANCO, O., HAYWARD, S.W. Review of Prostate Anatomy and Embryology and the Etiology of BPH. In: *Urol Clin North Am*. 2016 Aug; 43(3): 279–288.
2. ABE M, et al. Mast cell tryptase stimulates both human dermal fibroblast proliferation and type I collagen production. *Clin Exp Allergy*, 1998. 12: 1509–1517.
3. AYALA G., et al. Reactive stroma as a predictor of biochemical-free recurrence in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9(13):4792-4801.
4. AYDIN, O., et al. Immunohistological Analysis of Mast Cell Numbers in the Intratumoral and Peritumoral Regions of Prostate Carcinoma Compared to Benign Prostatic Hyperplasia. *Pathology - Research and Practice*, 2002,198(4), 267–271.
5. BARRON D.A., ROWLEY D.R. The reactive stroma microenvironment and prostate cancer progression. *Endocr Relat Cancer*. 2012 Oct 30;19(6):R187-204.
6. BERRY P.A., MAITLAND N.J., COLLINS A.T. Androgen receptor signaling in prostate: Effects of stromal factors on normal and cancer stem cells. *Mol Cell Endocrinol* 2008;288:30–37.
7. BIGLER, S. A., DEERING, R. E., BRAWER, M. K. Comparison of microscopic vascularity in benign and malignant prostate tissue. *Hum. Pathol*. 1993, 24: 220-226.
8. ENK A.H., JONULEIT H., SALOGA J., KNOP J. Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma. *Int J Cancer*, 1997; 73(3): 309-316.
9. FAVARO W.J., et al. Periacinar retraction clefting in nonneoplastic and neoplastic prostatic glands: artifact or molecular involvement. *Pathol Oncol Res* 2012;18(2):285-292.
10. **GLOBALA T.**, si colab. Caracteristica fibroarhitecturala a stromei în carcinomul de prostată. *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale, Ediție specială dedicată aniversării 20 de ani de la fondarea academiei de Științe Medicale din RM*, 2018; p. 82-90;
11. **GLOBALA T.**, et al. Macrophages and dendritic cells density correlates with depth of invasion in the prostate carcinoma. *Moldovan Medical Journal*. 2020;63(4):27-34.
12. GOLLAPUDI K., 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.
13. HAYWARD S.W. Approaches to modeling stromal-epithelial interactions. *J Urol*, 2002; 168:1165-1172.
14. HILLY O., et al. The Role of S100-Positive Dendritic Cells in the Prognosis of Papillary Thyroid Carcinoma. *American Journal of Clinical Pathology*. 2013;139:87-92.
15. ISAACS J.T. Prostate stem cells and benign prostatic hyperplasia. *Prostate*. 2008; 68:1025–1034.
16. IZUMIYA K, NAKADA T. Inhibitors of collagen synthesis and hypophysectomy: effects on androgen induced growth of ventral prostate in rats. *Arch Androl* 1997;38:231–241.
17. JIAN-PING W., et al. Intensity of stromal changes is associated with tumor relapse in clinically advanced prostate cancer after castration therapy. *Asian Journal of Andrology*. 2014; 16, 710–714.

18. LEACH D.A., et al. Stromal androgen receptor regulates the composition of the microenvironment to influence prostate cancer outcome. *Oncotarget*. 2015 Jun 30; 6(18):16135-50.
19. LI Y, et al. Decrease in stromal androgen receptor associates with androgen-independent disease and promotes prostate cancer cell proliferation and invasion. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2008b; 2790-2798.
20. LISSBRANT I.F., et al. Tumor associated macrophages in human prostate cancer: relation to clinicopathological variables and survival. *Int J Oncol*. 2000;17:445–451.
21. MALTBY, S., KHAZAIE, K., MCNAGNY, K. M. Mast cells in tumor growth: Angiogenesis, tissue remodelling and immunomodulation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009,1796, 19–26.
22. MING Z. High-grade prostatic intraepithelial neoplasia, PIN-like carcinoma, ductal carcinoma, and intraductal carcinoma of the prostate. *Modern Pathology* ,2018;31, S71–S79.
23. MIYAMOTO, K. K., et al. Immunohistochemistry of the androgen receptor in human benign and malignant prostate tissue. *The Journal of Urology*, 1993, 149(5), 1015–1019.
24. MUNTZING J. Androgen and collagen as growth regulators of the rat ventral prostate. *Prostate* 1981;1:71–78.;
25. NARUNSKY, L., OREN, R., BOCHNER, F., NEEMAN, M. Imaging aspects of the tumor stroma with therapeutic implications. *Pharmacology & Therapeutics*,2014,141(2), 192–208.
26. OHNO S., et al. Role of Tumor-associated Macrophages (TAM) in Advanced Gastric Carcinoma: The Impact on FasL-mediated Counterattack. *Anticancer Research*. 2005;25: 463-470.
27. OLAPADE-OLAOPA E. O., et al. Malignant transformation of human prostatic epithelium is associated with the loss of androgen receptor immunoreactivity in the surrounding stroma. *Clinical Cancer Research*. 1999; 5(3):569-76.
28. OLUMI AF, et al. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Research*. 1999,595002–5011.
29. RICARD-BLUM S., BALLUT L. Matricryptins derived from collagens and proteoglycans. *Frontiers in Bioscience* 2011;16, 674-697.
30. RICCIARDELLI C., et al. Androgen receptor levels in prostate cancer epithelial and peritumoral stromal cells identify non-organ confined disease. *Prostate* 2005;63:19–28.
31. SCHAUER I.G., ROWLEY D.R. The functional role of reactive stroma in benign prostatic hyperplasia. *Differentiation*. 2011.82;200–210.
32. TOMAS D., et al. Intensity of stromal changes predicts biochemical recurrence-free survival in prostatic carcinoma. *Scand J Urol Nephrol* 2010;44(5):284-290.
33. WEIDNER N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors. In: *Breast Cancer Res Treat*. 1995, vol. 36, nr. 2, p. 169-180.
34. WIKSTRÖM P., MARUSIC J., STATIN P., BERGH A. Low stroma androgen receptor level in normal and tumor prostate tissue is related to poor outcome in prostate cancer patients. *The Prostate*. 2009;69: 799-809.

LISTA PUBLICAȚIILOR AUTORULUI LA TEMA TEZEI
Lucrări științifice

❖ **Articole în reviste științifice**

✓ **în reviste din bazele de date Web of Science și SCOPUS**

1. **GLOBA, T.** ș.a. Mast cell phenotype in benign and malignant tumors of the prostate. In: *Polish Journal of Pathology*. 2014, 66 (2), 147-153. doi: [10.5114/pjp.2014.43965](https://doi.org/10.5114/pjp.2014.43965). (IF: 0.832).

✓ **în reviste din Registrul Național al revistelor de profil, cu indicarea categoriei**

- categoria B+

2. **GLOBA, T.** ș.a. Macrophages and dendritic cells density correlates with depth of invasion in the prostate carcinoma. In: *Moldovan Medical Journal*. 2020;63(4):27-34. doi: 10.5281/zenodo.4016808. ISSN 2537-6373 (Print); ISSN 2537-6381 (Online).

- categoria B

3. **GLOBA, T., MAZURU, V., ȘAPTEFRAȚI, L., PELIN, E.** Analiza morfometrică a populației mastocitelor din prostata umană. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei. Științe Medicale*. Chișinău, 2012, nr. 1(33), pp. 54-58. ISSN 1857-0011.
4. **GLOBA, T.** ș.a. Caracteristica fibroarhitecturală a stromei în carcinomul de prostată. În: *Buletinul Academiei de Științe a Moldovei, Științe Medicale*. Ediție specială dedicată aniversării 20 de ani de la fondarea Academiei de Științe Medicale din RM. 2018, pp.82-90. ISSN 1857-0011.

- categoria C

5. **GLOBA, T.** Aspecte morfologice și morfometrice ale mastocitelor din prostata umană. În: *Anale științifice ale USMF „Nicolae Testemițanu”*. Ediția VI. Chișinău, 2005, vol. I, pp. 74-78. ISSN 1857-1719.
6. **GLOBA, T.** Există oare legătură spațială și de timp între hiperplazia și carcinomul de prostată? În: *Anale științifice ale USMF „Nicolae Testemițanu”. Probleme medicobiologice, farmaceutice, de sănătate publică și management*. Chișinău, 2008, vol. I, pp. 65-68. ISSN 1857-1719.

❖ **Articole în culegeri științifice**

✓ **în lucrările conferințelor științifice naționale cu participare internațională**

7. **GLOBA, T., GLOBA, L., PELIN, E., ȘAPTEFRAȚI, L.** Aspecte structurale ale stromei din prostata normală. În: *Probleme actuale ale morfologiei. Materialele Conferinței științifice internaționale dedicată celor 70 de ani de la fondarea Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”*. Chișinău: Ed.: Sirius, 2015, pp. 59-63. ISBN 978-9975-57-194-4.
8. **GLOBA, T.** Angiogeneza și mastocitele în leziunile proliferative benigne de prostată. În: *Probleme actuale ale morfologiei. Materialele Conferinței științifice internaționale*

dedicată celor 70 de ani de la fondarea Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”. Chișinău: Ed.: Sirius SRL, 2015, pp. 64-70. ISBN 978-9975-57-194-4.

9. **GLOBA, T., GLOBA, L., PELIN, E., GLOBA, P.,** ș.a. Analiza imunohistochimică a macrofagelor CD68+ din stroma carcinomului de prostată. În : *Probleme actuale ale morfologiei. Materialele Conferinței Științifice Internaționale dedicată celor 75 de ani de la fondarea Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”*. Chișinău: Ed.: Sirius, 2020, pp. 63-67. ISBN 978-9975-57-281-1.

❖ **Teze în culegeri științifice**

✓ **în lucrările conferințelor științifice internaționale (peste hotare)**

10. **GLOBA, T., FULGA, V.** Caracteristica morfologică și morfometrică a mastocitelor din prostată. În: *Al XXXV-lea Simpozion Național de Morfologie, al IV-lea Simpozion de Morfologie Microscopică*. Craiova, România, 2004, p. 78.
11. **GLOBA, T.** ș.a. Prostate stromal mast cell. In: *The 6th Conference of PhD Students, The 3rd Conference of Post-Doc Students*. Craiova, România, 2013, p. 41.

✓ **în lucrările conferințelor științifice naționale**

12. **CERNÎI, A., GLOBA, T., EȘANU, N.** Aspectele structurale și de vârstă ale proceselor tumorale de prostată. În: *Actualități în diagnosticul și tratamentul contemporan al tumorilor organelor reproductive la femei. Simpozion național dedicat memoriei profesorului I. V. Bohman*. Chișinău, 2008, p.127, ISBN: 978-9975-67-022-7.

❖ **Brevete de invenții și alte obiecte de proprietate intelectuală, materiale la saloanele de invenții**

1. **GLOBA, T., PELIN, E., GLOBA, L., DAVID, V.** Utilizarea imunocolorării anti-CD68 drept criteriu de prognostic în leziunile proliferative de prostată. Certificat de inovator nr. 5745; 02.03.2020.
2. **GLOBA, T., PELIN, E., GLOBA, L., DAVID, V.** Utilizarea imunocolorării anti-S100 pentru evidențierea celulelor dendrite - un nou marker de prognostic în leziunile proliferative. Certificat de inovator nr. 5754; 17.03.2020.
3. **GLOBA, T.** ș.a. Evaluarea angiogenezei prin utilizarea dublei imunocolorării anti-CD34/anti-triptază mastocitară. Certificat de inovator nr. 5755; 17.03.2020.
4. **GLOBA, T.** ș.a. Dubla imunocolorare anti-CD34/anti-triptază mastocitară cu aplicarea cromogenului Vina Green. Certificat de inovator nr. 5756; 17.03.2020.
5. **DAVID, V.** s.a. Actul nr. 14 de implementare a inovației. ”Procedul de procesare histochimică cu utilizarea colorației tricrom pentru aprecierea țesutului conjunctiv fibros” nr. 5360.

ADNOTARE
Globa Tatiana

”Profilul molecular al stromei în proliferările benigne și maligne ale prostatei”
Teză de doctor în științe medicale, Chișinău, 2022

Structura tezei: introducere, 5 capitole, concluzii generale și recomandări, bibliografie din 236 titluri, 119 pagini de text de bază, 77 figuri, 23 tabele, 3 anexe. Rezultatele obținute sunt publicate în 12 lucrări științifice.

Cuvinte-cheie: carcinom de prostată, adenom de prostată, stromă reactivă, matrice extracelulară, celulele α -SMA+, macrofage CD68+, celule S100+, mastocite, angiogeneză, receptori androgeni.

Scopul lucrării: Studiarea componentelor stromale ale prostatei prin evaluarea rolului factorilor stromali în carcinogeneză, în vederea îmbunătățirii diagnosticului histologic.

Obiectivele cercetării: Studiul histologic și imunohistochimic al modificărilor stromale (componentele celulare și extracelulară) în leziunile proliferative benigne și maligne de prostată; studiul rețelei vasculare sanguine (densității vasculare și tipurilor de vase) raportată la severitatea leziunilor hiperplazice de prostată; estimarea intensității de exprimare a receptorilor androgenici de către celulele stromale și glandulare.

Noutatea și originalitatea științifică: Pentru prima dată a fost efectuat un studiu complex și comparativ al modificărilor stromale în cele două leziuni hiperplazice de prostată. Aplicarea unui panel de trei anticorpi pentru mastocite a permis imunofenotipizarea lor, precum și stabilirea unui imunofenotip unic mastocitar în ariile peritumorale din adenocarcinoamele de prostată. A fost stabilit că expresia stromală AR în carcinomul de prostată scade proporțional cu creșterea gradului tumorii, ceea ce poate fi interpretat ca o selecție naturală a celulelor stromale AR negative față de celulele AR pozitive. A fost stabilit că celulele dendritice stromale pot fi considerate elemente de prognostic.

Problema științifică importantă soluționată: Fenotipului reactiv al stromei apare deja în leziunile proliferative cu caracter benign; macrofagele, mastocitele și celulele dendritice se reprogreamază reciproc, contribuind la secreția unor substanțe biologice active cu rol reglator în procesele de proliferare și angiogeneză; scăderea numărului celulelor dendritice stromale în adenocarcinomul de prostată este un factor de prognostic nefavorabil.

Semnificația teoretică și valoarea aplicativă a lucrării: Prin analizarea evoluției modificărilor cantitative și calitative ale populațiilor celulare, și a componentelor matricei extracelulare a fost posibilă completarea cunoștințelor existente cu informații noi despre implicarea stromei în procesele proliferative a parenchimului prostatei, confirmarea utilității metodelor histologice și imunohistochimice în diagnosticarea și evaluarea severității proliferărilor de prostată.

Implementarea rezultatelor științifice: Rezultatele studiului dat au fost implementate în activitatea didactică și științifică a Catedrei de histologie, citologie și embriologie și a Laboratorului de morfologie al USMF “Nicolae Testemițanu”.

АННОТАЦИЯ

Глоба Татьяна

«Молекулярный профиль стромы при доброкачественной и злокачественной пролиферации предстательной железы», Диссертация на соискание учёной степени кандидата медицинских наук, Кишинев, 2022

Структура диссертации: введение, 5 глав, общие выводы и рекомендации, 236 библиографических источников, 119 страниц основного текста, 77 рисунков, 23 таблицы, 3 приложения. Полученные данные опубликованы в 12 научных статьях.

Ключевые слова: карцинома простаты, аденома простаты, реактивная строма, межклеточный матрикс, α -SMA+ клетки, CD68+ макрофаги, S100+ клетки, тучные клетки, ангиогенез, андрогенные рецепторы.

Цель исследования: Изучить стромальные компоненты предстательной железы, оценив роль стромальных факторов в канцерогенезе, с целью улучшения гистологической диагностики.

Задачи исследования: Гистологическое и иммуногистохимическое изучение изменений стромы (клеточного и внеклеточного компонентов) при доброкачественных и злокачественных пролиферативных поражениях предстательной железы; исследование кровеносной сети, плотности сосудов и типов сосудов в зависимости от тяжести гиперпластического поражения предстательной железы; определение интенсивности экспрессии рецепторов андрогенов стромальными и железистыми клетками.

Новизна и оригинальность исследований: Впервые проведено комплексное и сравнительное исследование стромальных изменений при двух гиперпластических поражениях предстательной железы. Использование трех антител для тучных клетках позволило провести их иммунофенотипирование, а также установить единый иммунофенотип тучных клеток в перитуморальных зонах аденокарциномы предстательной железы. Было установлено, что стромальная экспрессия AP в раке предстательной железы снижается с увеличением гистологической степени опухоли, что можно интерпретировать как естественный отбор AP- стромальных клеток по сравнению с AP+ клетками. Установлено, что стромальные дендритные клетки можно рассматривать как прогностические элементы.

Решённая научная задача: Реактивная строма уже появляется при доброкачественных пролиферативных поражениях простаты; макрофаги, тучные клетки и дендритные клетки перепрограммируют друг друга, способствуя секреции биологически активных веществ, играющих регулируемую роль в процессах пролиферации и ангиогенеза; снижение числа стромальных дендритных клеток при карциноме предстательной железы является неблагоприятным прогностическим фактором.

Теоретическая и практическая значимость работы: Анализируя эволюцию количественных и качественных изменений клеточных популяций, компонентов внеклеточного матрикса, удалось дополнить имеющиеся знания новыми сведениями об участии стромы в пролиферативных процессах простаты, а также подтвердить полезность гистологических и иммуногистохимических методов в диагностике и оценке тяжести гиперпластических поражениях предстательной железы.

Внедрение научных результатов: Результаты данного исследования были внедрены в научно-учебном процессе на Кафедре гистологии, цитологии и эмбриологии и в Лаборатории морфологии УГМФ им. Николае Тестемицану.

ANNOTATION

Globa Tatiana

"Molecular profile of the stroma in benign and malignant proliferations of the prostate" PhD, Thesis in medical sciences, Chişinau, 2022

Thesis structure: introduction, 5 chapters, general conclusions and recommendations, bibliography of 236 titles, 119 pages of the main text, 77 figures, 23 tables, 3 annexes. The obtained results have been published in 12 scientific papers.

Keywords: prostate carcinoma, prostate adenoma, reactive stroma, extracellular matrix, α -SMA+ cells, CD68+ macrophages, S100+ cells, mast cells, angiogenesis, androgen receptors.

The aim of the research: To study the stromal components of the prostate by evaluating the role of stromal factors in the carcinogenesis, in order to improve the histological diagnosis.

The research objectives: The histological and immunohistochemical studying of stromal changes (cellular and extracellular components) in benign and malignant proliferative lesions of the prostate; studying of the blood vessels network, vascular density and vessel types in relation to the severity of hyperplastic prostate lesions; evaluation of the intensity of androgen receptor expression by stromal and glandular cells.

The scientific novelty and originality: For the first time, has been performed a complex and comparative study of stromal changes of the two prostatic hyperplastic lesions. The usage of three mast cell antibodies allowed their immunophenotyping, as well as the establishment of a unic mast cell immunophenotype in the peritumoral areas of prostate adenocarcinomas. It has been established that AR stromal expression in the prostate carcinoma decreases with increasing tumor histological degree, that can be interpreted as a natural selection of negative AR stromal cells versus positive AR cells. It has been established that stromal dendritic cells can be considered a prognostic elements.

The scientific solved problem: The reactive stroma already appears in the benign prostate proliferative lesions; macrophages, mast cells and dendritic cells reprogram each other, contributing to the secretion of biologically active substances with a regulatory role in the processes of proliferation and angiogenesis; decreased stromal dendritic cell count in the prostate carcinoma is an unfavorable prognostic factor.

The theoretical significance and applicative value of the research: Analyzing the evolution of quantitative and qualitative changes of cell populations, and extracellular matrix components, it was possible to supplement the existing knowledge with new data about the involvement of stroma in the prostate proliferative processes, as well as to confirm the usefulness of histological and immunohistochemical methods in the diagnosis and assessment of the severity of hyperplastic lesions of the prostate gland.

The implementation of scientific results: The obtained results of this research were implemented in the teaching and scientific processes of the Department of Histology, Cytology and Embryology and the Laboratory of Morphology of "Nicolae Testemitanu" SUMPh.

Foaia privind datele de tipar

GLOBA TATIANA

**PROFILUL MOLECULAR AL STROMEI ÎN PROLIFERĂRILE
BENIGNE ȘI MALIGNNE ALE PROSTATEI**

311.02 – ANATOMIE PATOLOGICĂ

Rezumatul tezei de doctor în științe medicale

Aprobat spre tipar: 27.07.2022	Formatul hârtiei 60x84 1/16
Hârtie ofset. Tipar ofset.	Tiraj 50 ex.
Coli de autor: 1.9	Comanda nr. 1112

SRL Tipografia "Sirius"
MD-2004, Chișinău, str.Lăpușneanu, 2
Tel. (022) 23 23 52