

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
CRAIOVA  
ȘCOALA DOCTORALĂ**

**TEZĂ  
DE  
DOCTORAT  
STUDIUL MODIFICARILOR  
PROFILULUI MORFOLOGIC  
TUMORAL  
IN FUNCȚIE DE GRADUL DE  
DIFERENȚIERE  
IN  
CARCINOMUL PROSTATIC  
REZUMAT**

**Conducător Științific:**  
Profesor Universitar Dr. Cristiana Eugenia SIMIONESCU

**Student Doctorand:**  
Răzvan Mihail PLEȘEA

## CUPRINSUL TEZEI DE DOCTORAT

CUPRINS .....	I
ABREVIERI .....	VI
INTRODUCERE .....	1
CAPITOLUL I – PROFILUL CLINICO-EPIDEMIOLOGIC AL CARCINOMULUI PROSTATIC .....	4
Definiție, Sinonime, Termeni înrudiți .....	5
Scurt breviar epidemiologic.....	5
Factori predispozanți.....	10
Elemente de diagnostic.....	13
Factori de prognostic .....	15
Stadializarea CP .....	20
CAPITOLUL II – PROFILUL MORFOLOGIC AL CARCINOMULUI PROSTATIC .....	22
Prostata normală – Breviar morfologic.....	23
Carcinomul de prostată.....	32
Stroma în carcinomul de prostată .....	53
Analiza de imagine în patologie .....	59
Dimensiunea fractală .....	61
CAPITOLUL III – MATERIAL ȘI METODE .....	63
Obiectivele cercetării.....	64
Materialul studiat.....	64
Metode de lucru .....	64
CAPITOLUL IV – STUDIUL ARHITECTURII TUMORALE	
CU AJUTORUL DIMENSIUNII FRACTALE.....	83
Introducere.....	84
Sistemul Gleason.....	84
Sistemul Srigley .....	101
Considerații asupra comportamentului FD în sistemele de grading.....	111
Corelații între cele trei componente ale arhitecturii tumorale .....	120
CAPITOLUL V – STUDIUL COMPORTAMENTULUI BIOLOGIC	
AL POPULAȚIILOR DE CELULE TUMORALE.....	136
Introducere.....	137
Sistemul Gleason.....	137
Sistemul Srigley .....	173
Considerații asupra comportamentului biologic al celulelor tumorale.....	190
Corelații între parametrii biologici.....	206
CONCLUZII.....	233
BIBLIOGRAFIE .....	236

## CUVINTE CHEIE

Adenocarcinom de prostată, Dimensiune fractală, Comportament biologic, Sistemul Gleason, Sistemul Srigley.

## STADIUL CUNOAȘTERII

### PROFIL CLINICO-EPIDEMIOLOGIC

Carcinomul prostatic (CP) este o proliferare epitelială malignă cu punct de plecare la nivelul epiteliului acinilor și/sau ductelor prostatei care etalează o variabilitate extrem de largă a fenomenelor de diferențiere glandulară, anaplazie și a comportamentului biologic.

La ora actuală, CP este, conform statisticilor oficiale ale WHO cu datele până în 2012, a doua neoplazie ca frecvență de apariție și diagnosticare a bărbaților, devansată numai de cancerul pulmonar și a patra neoplazie ca frecvență în general, devansată de cancerul pulmonar, mamar, și colorectal [Stewart and Wild 2014].

Incidența și mortalitatea neoplaziei maligne epiteliale prostatice variază însă semnificativ de la o regiune geografică la alta. Rata de supraviețuire a CP este mai mică în țările în curs de dezvoltare față de țările dezvoltate din cauza întârzierii diagnosticului și lipsei de acces adecvate la sistemele de îngrijire a sănătății [Jemal et al 2011]. Incidența și Mortalitatea CP prezintă nu numai diferențe geografice ci și variații în timp. Wong și colaboratorii au identificat șase tipuri de profiluri ale evoluției incidenței și mortalității prin CP [Wong et al 2016].

Poziția incidenței CP în cadrul incidenței cancerului la bărbați la noi în țară este a III-a, după cancerul pulmonar și cel colo-rectal, diferit de situația la nivel european unde CP ocupă prima poziție [Ferlay et al 2013].

Cu toate că etiologia CP nu este încă pe deplin elucidată, numeroasele studii epidemiologice au conturat, de-a lungul timpului, o paletă extrem de largă și variată de factori care au fost considerați ca fiind asociați cu riscul de a dezvolta CP. Ei pot fi grupați în factori individuali, genetici și de comportament și factori de mediu. Dintre aceștia, însă, numai foarte puțini și anume vârsta, antecedentele personale familiale și rasa, au demonstrat a avea o relație directă cu apariția cancerului [Haas et al 2008; Sierra et al 2016].

O clasificare mai didactică a factorilor legați de riscul de a face CP îi împarte pe aceștia în două categorii [Sadeghi-Gandomani et al 2017] și anume:

- Factori de risc majori
- Factori cu efect mai puțin clar asupra riscului de dezvoltare a CP (minori)

Manifestările clinice nu sunt detectabile decât peste vârsta de 60-70 de ani [Abate-Shen and Shen 2000]. Se pare că unele CP pot trece printr-o perioadă de latență de până la 15-20 de ani, timp în care boala este prezentă histologic dar nu provoacă manifestări clinice [Haas et al 2008]. Cu toată marea varietate de simptome, în aproape jumătate din cazuri, pacienții cu cancer de prostată sunt asimptomatici.

Pentru a stabili un diagnostic corect și rapid, la ora actuală se folosește următorul protocol:

- Pentru diagnosticul tumorii [NCCC 2014]: Tușeu rectal (DRE), PSA, Ecografie transrectală (TRUS) și Biopsie urmată de examen histopatologic. Parcurgerea ulterioară a algoritmului depinde de stadializarea clinică stabilită în urma parcurgerii etapei de diagnosticare a tumorii.
- Pentru diagnosticul stadiului: Investigare imagistică: (Radiografie pulmonară, Urografie), Scintigrafie osoasă, Ecografie abdominală și Investigații biochimice, biologice, Markerii tumorali

Ar trebui menționat totuși că descoperirea excesivă a CP are și consecințe clinice adverse evidente, dat fiind că majoritatea pacienților tratați nu resimt beneficii

clinice directe în urma tratamentului [Hoffman et al 2014]. S-a estimat că între 42% și 66% din cancerele diagnosticate nu ar fi produs nici o suferință clinică dacă ar fi rămas nedetectate [Draisma et al 2009].

Factorii de predicție a prognosticului pot fi împărțiți în două categorii [Hayes et al 1996]:

- **Factorii predictivi** – prezic răspunsul sau rezistența la un tratament specific
- **Factorii de prognostic** – prezic recăderea sau progresia independent de efectele viitoare ale tratamentului și se împart, la rândul lor în trei categorii:  
**Categoria I** – Factori stabiliți, recomandați pentru raportarea de rutină;  
**Categoria II** – Factori care promit sau sunt recomandați, în ciuda datelor incomplete; **Categoria III** – Factori care nu sunt în prezent recomandați, datorită dovezilor insuficiente

Au fost propuse mai multe sisteme de evaluare a evoluției și prognosticului CP. În toate acestea factorii legați de tumoră utilizați au fost aceiași trei din categoria I descrisă mai sus și anume: nivelul seric al PSA în momentul diagnosticului, stadializarea clinică (TNM), stadializarea histopatologică (Scorul Gleason) la care s-a adăugat pozitivitatea marginilor tumorale [Martin et al 2011, Stephenson et al 2009, D'Amico et al 1998, Kattan et al 1999].

Deși, spre deosebire de alte tumori solide, CP nu se caracterizează prin mutații frecvente care să aibă valoare predictivă sau prognostică, au fost explorați mulți factori moleculari și genetici pentru a încerca o individualizare mai exactă a predicției riscului [Martin et al 2011, Kan et al 2010].

Cel mai utilizat sistem în practica medicală a fost sistemul TNM care folosește mai mulți parametri descriptivi [Catalona 1984; Fleming et al 1997]. În ediția a 8-a a Clasificării TNM a tumorilor maligne [Brierley et al 2017], sistemul TNM de stadializare clinică a fost completat și combinat cu cei doi factori de prognostic validați de experiența clinică practică și anume valoarea PSA și evaluarea după sistemul Gleason.

## PROFIL MORFOLOGIC

Prostata este o "înmugurire" epitelială care apare în regiunea intermediară (pelvică) a sinusului urogenital primitiv (al cărui epiteliu este derivat din endoderm), imediat sub vezica urinară [Abate-Shen and Shen 2000; Cunha et al 1986].

Embriogeneza prezintă la toate vertebraele două faze: Faza I, numită faza ambisexuală sau Indiferentă; Faza a II-a sau faza de Diferențiere sexuală

Studiile genetice asupra genei homeobox Nkx3.1 au arătat că regiunile sinusului urogenital primitiv au capacitatea de a se diferenția pentru a forma prostata [Bhatia Gaur et al. 1999]. Au fost identificate mai multe gene candidate la rolul de reglare a dezvoltării prostatei.

La ora actuală este acceptată împărțirea prostatei în patru regiuni anatomic fundamentale sau compartimente [McNeal 1981; Aumuller 1989 a și b], punctul central anatomic de referință fiind reprezentat de relația dintre fiecare din aceste regiuni și uretră: Zona Periferică; Zona Centrală; Zona de tranziție sau segmentul preprostatic; Stroma fibromusculară anterioară neglandulară

Prostata adultă este alcătuită din două componente fundamentale: parenchimul constituit din 30-50 glande individualizate și o componentă neglandulară care constituie stroma organului.

Compartimentul epitelial care formează structurile glandulare ale prostatei este alcătuit din cel puțin trei tipuri diferite de celule ce pot fi evidențiate datorită caracteristicilor morfologice, semnificației funcționale și relevanței acestora pentru

carcinogeneză. Acestea sunt: celulele secretorii exocrine, celulele bazale și celulele neuroendocrine la care se mai adaugă celulele stem, și celulele epiteliale de tip tranzițional [Abate-Shen and Shen 2000; Stamey and McNeal 1992; McNeal 1976].

Compartimentul stromal este o structură complexă care formează mediul înconjurător de susținere mecanică și trofică a celulelor epiteliale, funcționale. Ele este alcătuit, la rândul lui, din două componente de bază: componenta celulară specifică, dominată de fibrele musculare netede și matricea extracelulară [Aumuller 1983; Mawhinney 1989; Hayward 2002; Brar et al 2003; Saito and Munakata 2004; Laczko et al 2005; Long et al 2005].

La ora actuală aspectele histopatologice majore ale adenocarcinomului de prostată sunt recunoscute și acceptate de majoritatea anatomopatologilor în special când este vorba de preparate obținute prin puncție biopsie. Din toată paleta de aspecte histopatologice evaluate se detașează modificările nucleare – dimensiunile mari ale nucleului și evidențierea nucleolilor – și patternul de dispoziție arhitecturală cu caracter infiltrativ egal sau mai mare de "3" [Kumar et al 2015].

În 1966 Donald Gleason a dezvoltat sistemul de evaluare a adenocarcinomului prostatic care definește cinci pattern-uri (stadii) histologice de diferențiere. Patternul Gleason 1 reprezintă stadiul cu aspectul cel mai bine diferențiat și este corelat cu cel mai favorabil prognostic, în timp ce patternul Gleason 5 este stadiul cu aspectul cel mai slab diferențiat și este asociat cu un prognostic foarte slab [Gleason 1966]. Gleason a detaliat și rezumat modelele (gradele) de diferențiere histologică ale adenocarcinomului de prostată, analizând corelația acestora cu datele clinice precum stadializarea și prognosticul [Delahunt et al 2012; Chen and Zhou 2016].

Spre sfârșitul anului 2014 a avut loc la Chicago o întrunire internațională cu scopul de a aduce la zi sistemul Gleason, întrunire la care au participat nu doar experți din anatomie-patologică ci și urologi, oncologi și radioterapeuți [Pierorazio et al 2013; Epstein et al 2016a; Kryvenko și Epstein 2016].

În 2004, John Srigley, plecând de la realitatea mării heterogenități a aspectelor CP care poate genera foarte ușor confuzie în momentul diagnosticului cu alte foarte numeroase procese patologice, propune și el un sistem de împărțire a aspectelor arhitecturale tumorale mai simplu care să grupeze paleta largă de patternuri descrisă de Gleason. Autorul mai face și o trecere în revistă a aspectelor morfologice normale sau a proceselor patologice nonneoplazice care pot crea probleme de diagnostic diferențial cu proliferarea epitelială malignă prostatică [Srigley 2004].

Au existat, de-a lungul timpului, nenumărate încercări de definire și clasificare a variantelor histologice de CP. Una dintre aceste abordări [Humphrey 2012] împarte CP în două grupe: Adenocarcinomul acinar și variantele sale histologice și Tipuri de adenocarcinom non-acinar. Marea majoritate a cancerelor de prostată sunt adenocarcinoame acinare. Este important însă ca anatomopatologii să recunoască și variantele histologice rare ale adenocarcinomului acinar [Humphrey 2012; Li and Wang 2016].

Apariția și progresia fenotipului celular malign la nivelul populației celulelor epiteliale ale acinilor și ductelor prostatice este rezultatul unui proces dinamic de modificări dramatice genetice ale celulelor epiteliale normale și apoi ale celulelor tumorale care constau în alterări cromozomiale succesive care le eliberează de semnalele reglatorii care limitează proliferarea și invazia, probabil prin reducerea sau pierderea funcției genelor presupuse a fi supresoarele procesului tumoral [Abate-Shen and Shen 2000; Dvorak 2015]. Acest proces complex de alterare genică cuprinde mai multe etape și anume: Etapa de Inițiere, Etapa de Progresie și Etapa de progresie avansată cu apariția metastazelor.

Stroma tumorală din cancere, numită și stromă reactivă, are multe caracteristici asemănătoare cu stroma de la nivelul zonelor de vindecare a rănilor, elemente care au fost identificate în tumorile de sân sau în cele de colon sau chiar în carcinomul de prostată [Bhowmick and Moses 2005; Dvorak 1986; Rowley 1998-1999; Tuxhorn et al 2001].

Modificările morfologice de la nivel epitelial, constând în pierderea arhitecturii tisulare normale, atipia nucleară și modificările genetice [Niu and Xia 2009] sunt însoțite de următoarele modificări morfologice fundamentale la nivelul stromei reactive din țesutul malign prostatic: Scăderea semnificativă sau dispariția celulelor musculare netede pe măsură ce cancerul progresează, Proliferarea miofibroblaștilor și fibroblaștilor, Amplificarea corespunzătoare a ECM, Amplificarea angiogenezei și Modificări genetice.

Analiza de imagine reprezintă extragerea de informații utile din imaginile microscopice, achiziționate de obicei cu ajutorul unei camere video sau al unui scanner de lame histologice. Aplicațiile analizei de imagine în Anatomia Patologică, atât în zona de cercetare dar și în zona de diagnostic sunt extrem de numeroase și variate.

Fractalul este un obiect/formă geometrică alcătuit/ă din subunități care reprezintă copii reduse ale structurii originale și care au un comportament aproximativ similar cu cea originală atunci când sunt examinate la scale diferite. Această caracteristică este denumită auto-similaritate. [Chaudhuri and Sarkar 1995; Waliszewski et al 2010]. Analiza dimensiunii fractale a început să fie utilizată în multe specialități medicale precum cardiologie, neurologie, oftalmologie și radiologie deoarece analiza imaginilor cu ajutorul computerului permite o abordare realmente cantitativă și se speră reproductibilă, devenind un instrument de mare folos pentru cercetătorii experimentați [Keipes et al 1993; Baish and Jain 2000]. În patologia urogenitală masculină, analiza dimensiunii fractale a fost utilizată atât în studiul țesutului tumoral prostatic [Tambasco et al 2009; de Arruda et al 2013; Waliszewski et al 2010; 2014; 2014b; 2015; 2016a; 2016b; Tanase and Waliszewski 2015; Stepan et al 2015] precum și al rețelei vasculare din parenchimul prostatic și din tumorile prostatice [Taverna et al 2009, 2015].

## **CONTRIBUȚIA PERSONALĂ**

### **MATERIAL ȘI METODE**

Baza de studiu a prezentei lucrări a fost constituită dintr-un lot de 109 pacienți internați cu diagnosticul de carcinom de prostată la care s-a practicat prostatectomie totală.

Materialul de studiu a fost reprezentat de fragmente tisulare de parenchim prostatic incluse în parafină obținute din piesele de prostatectomie totală.

Studiul a fost de tip prospectiv întrucât a inclus numai pacienți diagnosticați cu carcinom prostatic descoperit pe piesele de prostatectomie totală după începerea sa și a cuprins două direcții majore de cercetare:

I. Evaluarea arhitecturii tumorale cu ajutorul dimensiunii fractale (FD)

II. Evaluarea comportamentului biologic (biological behaviour – BB) al populațiilor de celule tumorale maligne.

Au fost alcătuite două loturi de studiu diferite pentru cele două direcții de cercetare propuse alcătuite din 453 și respectiv 435 de câmpuri tumorale cu patternuri arhitecturale distincte. Aspectele arhitecturii tumorale au fost evaluate

separat și împărțite în subgrupuri cu ajutorul a două sisteme de stadializare a gradului de diferențiere tumorală și anume: sistemul Gleason și sistemul Srigley.

Pentru fiecare din cele două direcții de cercetare au fost luați în considerare câte un set de trei parametri, astfel: I. Pentru **arhitectura tumorală**: (1) Arhitectura populației de celule tumorale; (2) Arhitectura structurii de susținere stromală; (3) Arhitectura rețelei vasculare. II. Pentru **comportamentul biologic**: (1) Gradul de adezivitate între celulele maligne; (2) Capacitatea de degradare a matricei extracelulare; (3) Gradul de agresivitate.

Materialul biologic uman reprezentat de fragmentele de țesut prostatic a fost supus tehnicilor histologice clasice de prelucrare. Din blocurile de parafină obținute au fost efectuate patru secțiuni seriate cu grosime de 3-4  $\mu\text{m}$ . Prima secțiune a fost colorată cu Hematoxilină – Eozină (H-E) după care au fost selectate între 1 și 5 câmpuri de interes de proliferare tumorală compactă, fără necroză, conținând un pattern distinct arhitectural din clasificarea lui Gleason modificată de noi [Gleason 1977], convertit apoi și la sistemul Srigley [Srigley 2004]. Zonele au fost delimitate cu marker pe lamelă.

Blocurile de parafină primare au fost puncționate cu ajutorul unui dispozitiv cu cilindru din oțel, ascuțit pe interior, cu diametru de 2,5 mm, la nivelul zonelor de interes identificate și marcate pe lamele colorate cu Hematoxilină – Eozină. Cilindrii de parafină obținuți au fost montați în blocuri "acceptor" realizate dintr-un material compozit brevetat ce simulează proprietățile fizico-chimice ale țesuturilor animale, infiltrat cu parafină folosind metodele uzuale [Mușat 2017]. Blocurile astfel obținute au fost secționate la 5  $\mu\text{m}$  grosime, fiind selectate câte 4 secțiuni seriate de la fiecare bloc.

Cele trei secțiuni seriate obținute din blocurile primare în afara primei secțiuni colorate cu Hematoxilină - Eozină au fost colorate la fiecare caz în parte conform algoritmului din Tabelul 1.

**Tabelul 1: Algoritmul de colorare pentru evaluarea arhitecturii tumorale**

Secțiunea	Colorație	Scop
S 1	H-E	Stabilirea patternurilor Gleason/Srigley
S 2	<i>Impregnare argentică (metoda Gömöri)</i>	Evaluarea arhitecturii tumorale (GÖ)
S 3	<i>Tricromic Goldner</i>	Evaluarea arhitecturii stromale (TC)
S 4	<i>Imunomarcare CD34</i>	Evaluarea arhitecturii vasculare (VN)

Cele 4 secțiuni seriate obținute din blocurile secundare de microarray au fost marcate imunohistochimic conform algoritmului din Tabelul 2.

**Tabelul 2: Algoritmul de imunomarcare pentru evaluarea comportamentului biologic**

Secțiunea	Colorație	Scop
S 5	<i>MMP9</i>	Evaluarea capacității de degradare a matricei extracelulare
S 6	<i>MMP2</i>	
S 7	<i>ECAD</i>	Evaluarea Adeziunii intercelulare
S 8	<i>PTEN</i>	Evaluarea moleculară a agresivității/prognosticului

Toate preparatele histologice obținute atât în urma colorării cu colorațiile clasice cât și cu markerii imunohistochimici au fost transformate în lame virtuale cu ajutorul unui scanner Leica Aperio AT2, utilizând: (a) obiectivul X20 pentru cele 4 secțiuni seriate utilizate pentru evaluarea arhitecturii tumorale și (b) obiectivul X40 pentru cele

4 secțiuni seriate utilizate pentru evaluarea comportamentului biologic al proliferărilor maligne epiteliale prostatice.

**Evaluarea arhitecturii tumorale cu ajutorul FD.** Pornind de la lama de ghidaj colorată cu H-E, a fost identificat fiecare câmp de interes pe celelalte trei colorații. Din fiecare câmp de interes a fost extras un câmp pătrat conținând aceeași zonă de țesut tumoral cu dimensiuni de 512/512 pixeli pentru optimizarea algoritmului de calcul al FD. Determinarea FD pentru cele trei componente ale arhitecturii tumorale s-a realizat cu ajutorul unor algoritmi care au fost concepuți în programul MATLAB (MathWorks, USA).

Procesul de evaluare computerizată a imaginilor a parcurs două etape: I. Prelucrarea imaginilor care a constă în doi pași: (a) Segmentare și (b) Binarizare și II. Calcularea dimensiunii fractale (FD) la nivelul imaginilor binare. Pentru estimarea FD au fost testați doi algoritmi BOX-Counting. Raportarea s-a făcut cu ajutorul Algoritmului I.

**Evaluarea comportamentului biologic.** Din lamele virtuale imunomarcate, au fost selectate imagini RGB din același câmp cu pattern omogen al arhitecturii tumorale fiecare imagine având aceeași arie de 1778582 pixeli.

Algoritmii evaluării intensității imunomarcării cu cei patru anticorpi a fost aplicat în doi pași: I. Selectarea zonelor de interes (ROI – region of interest) și II. Evaluarea computațională a fiecărei caracteristici de comportament biologic.

Analiza de imagine a cuprins la rândul ei, mai multe etape: ROI a fost definită la nivelul imaginii originale ca setul de pixeli care a respectat simultan următoarele două reguli: (1) Valoarea canalului "Verde" nu a fost mai mare decât pragul fix de 220; (2) Valoarea canalului "Roșu" a fost de cel puțin 1.1 ori mai mare decât cea a canalului "Albastru". Toți ceilalți pixeli au fost marcați cu "0" pe toate canalele. Valoarea medie a versiunii "Grayscale" a ROI a fost considerată valoarea determinării colorării imunohistochemice. Deoarece tehnica de achiziție s-a bazat pe lumină transmisă, fiecare valoare determinată a fost scăzută din "255" astfel încât valoarea determinării să crească o dată cu intensitatea colorării. Scala de măsurare a intensităților imunomarcării a fost stabilită între "0" (lipsă de culoare) și "90" (prag maxim, coborât de la "255" la "90" deoarece nu au existat valori mai mari decât pragul de "90" și pentru a optimiza exprimarea grafică a rezultatelor).

Pentru culegerea datelor au fost create fișiere tip „bază de date” în calculator. Prelucrarea datelor preliminare a fost efectuată cu ajutorul modulului Microsoft Excel din pachetul de programe Microsoft Office 2010 Professional. Indicatorii statistici calculați pentru parametrii numerici au fost: Valoarea cea mai mică (VMIN); Valoarea cea mai mare (VMAX); Valoarea medie (VMEDIE); Deviația standard (STDEV). Pentru a putea face analiza statistică a valorilor numerice, a fost necesară mai întâi evaluarea normalității șirurilor de date numerice ale fiecăruia dintre parametri cu ajutorul tetului Lilliefors.

Evaluarea statistică a avut două direcții: (I) Compararea diferenței dintre valorile medii ale parametrilor studiați care a utilizat următoarele teste: Testul "t" (Two-Sample Assuming Equal Variances), Testul Mann-Whitney / Two-tailed test, Testul One-Way ANOVA – Single Factor și Testul Kruskal-Wallis; (II) Măsurarea intensității și direcției asocierii dintre valorile a câte doi dintre parametrii studiați care a utilizat testul de corelație "Pearson".

Diagramele (graficele) care ilustrează tendințele de evoluție ale diferiților parametri evaluați precum și comparațiile statistice dintre aceștia au fost executate cu ajutorul instrumentului „Graph” din modulele „Word” și „Excel” ale pachetului de programe Microsoft Office 2010, 2013 și 2016 Professional precum și programul de tip „add on” XLSTAT 2014 pentru modulul „Excel”, trial version.



## **STUDIUL ARHITECTURII TUMORALE CU AJUTORUL DIMENSIUNII FRACTALE**

În sistemul Gleason, AV a FD a **arhitecturii celulelor tumorale** a arătat o tendință de stabilizare, cu o discretă pantă descendentă dinspre patternurile bine diferențiate spre cele slab diferențiate, pe un fond de oscilare a acestor valori de la un subtip la celălalt, aparent fără nici un fel de legătură cu gradul de diferențiere.

AV a FD a **arhitecturii stromale** a arătat o tendință evidentă ascendentă de la patternurile bine diferențiate spre cele slab diferențiate, pe un fond de oscilare mai atenuată a acestor valori de la un subtip la celălalt.

AV a FD a **arhitecturii rețelei vasculare**, deși au pornit de la valori mici la nivelul paternurilor bine diferențiate, urcând către patternurile moderat diferențiate și revenind apoi la valor mici la patternurile slab diferențiate, a arătat în ansamblu un trend descendent evident dinspre patternurile bine diferențiate spre cele slab diferențiate.

În **sistemul Srigley**, probabil datorită grupării subtipurilor din sisemul Gleason, AV ale FD ale celor trei componente ale arhitecturii tumorale au arătat în general tendințe mai clare de evoluție dinspre patternul bine diferențiat spre cel slab diferențiat cu o excepție notabilă și anume la arhitectura populației celulare tumorale la care trendul a fost evident unul ascendent, față de cel discret descendent, observat la Sistemul Gleason

Compararea AV al FD ale celor trei componente ale arhitecturii tumorale atât la nivelul întregului lot cât și separat pe șirurile de valori ale fiecărui subtip al sistemelor Gleason și Srigley a relevat diferențe notabile, validate statistic ("p" foarte înalt semnificativ) între AV ale celor trei componente în ambele sisteme de evaluare a gradului de diferențiere.

Diagramele corelațiilor dintre AV ale FD ale celor trei componente ale arhitecturii tumorale pentru întregul lot au relevat că AV ale FD ale **GÖ și TC** pentru întregul lot au exprimat o tendință netă de corelare directă validată statistic (valoarea calculată a "p" – foarte înalt semnificativă). Cu alte cuvinte, dispozițiile arhitecturale ale GÖ și TC evoluează simultan fie spre modelul în suprafață, fie spre modelul liniar.

AV ale FD ale **GÖ și VN** pentru întregul lot au exprimat o tendință netă de corelare directă validată statistic (valoarea calculată a "p" – înalt semnificativă). Cu alte cuvinte, dispozițiile arhitecturale ale GÖ și VN evoluează simultan fie spre modelul în suprafață, fie spre modelul liniar.

AV ale FD ale **TC și VN** pentru întregul lot au exprimat o tendință vagă de corelare directă (valoarea calculată a "p" > 0,05 dar <0,5). Cu alte cuvinte, dispozițiile arhitecturale ale TC și VN au tendința de a evolua simultan fie spre modelul în suprafață, fie spre modelul liniar.

Diagrama corelativă a celor trei componente ale arhitecturii tumorale permite schițarea unor profiluri arhitecturale pentru cele patru tipuri de patternuri ale **sistemului Gleason** investigate. Astfel:

- Patternul Gleason 2 prezintă o tendință discretă de dispoziție după model în suprafață pentru arhitectura celulară tumorală, prezintă o tendință mai accentuată de dispoziție a arhitecturii stromale tumorale după model liniar și o tendință mai accentuată de dispoziție a arhitecturii vasculare intratumorale după model liniar
- Patternul Gleason 3 prezintă o tendință mai accentuată de dispoziție după model în suprafață pentru arhitectura celulară tumorală, prezintă o tendință de dispoziție intermediară a arhitecturii stromale tumorale și o tendință de dispoziție după model liniar a arhitecturii vasculare intratumorale

- Patternul Gleason 4 prezintă o tendință de dispoziție după model în suprafață pentru arhitectura celulară tumorală, prezintă o tendință discretă de orientare a dispoziției arhitecturii stromale tumorale după model liniar și o tendință evidentă de dispoziție a arhitecturii vasculare intratumorale după model liniar
- Patternul Gleason 5 prezintă o tendință evidentă de dispoziție după model în suprafață pentru arhitectura celulară tumorală, o tendință discretă de dispoziție a arhitecturii stromale tumorale după model în suprafață și cea mai accentuată tendință de dispoziție a arhitecturii vasculare intratumorale după model liniar.

Pentru cele patru tipuri de patternuri ale **sistemului Srigley**, schițele de profiluri arhitecturale ar fi următoarele:

- Patternul Srigley 1 prezintă cea mai accentuată tendință de dispoziție după model în suprafață pentru arhitectura celulară tumorală după patternul Srigley 4, prezintă o tendință discretă de dispoziție a arhitecturii stromale tumorale după model liniar și o tendință moderată de dispoziție a arhitecturii vasculare intratumorale după model liniar.
- Patternul Srigley 2 prezintă o tendință clară de dispoziție după model în suprafață pentru arhitectura celulară tumorală, prezintă o tendință evidentă de dispoziție intermediară a arhitecturii stromale tumorale și o tendință moderată de dispoziție după model liniar a arhitecturii vasculare intratumorale
- Patternul Srigley 3 prezintă o tendință clară de dispoziție după model în suprafață pentru arhitectura celulară tumorală, prezintă o tendință clară de dispoziție intermediară cu o vagă orientare a dispoziției arhitecturii stromale tumorale după model liniar și cea mai puțin accentuată tendință de dispoziție a arhitecturii vasculare intratumorale după model liniar dintre toate patternurile
- Patternul Srigley 4 prezintă, așa cum am arătat, o poziție aparte, cu cea mai accentuată tendință de dispoziție după model în suprafață pentru arhitectura celulară tumorală, cea mai accentuată tendință de dispoziție după model în suprafață a arhitecturii stromale tumorale dintre toate patternurile și cea mai accentuată tendință de dispoziție a arhitecturii vasculare intratumorale după model liniar.

## **STUDIUL COMPORTAMENTULUI BIOLOGIC AL POPULAȚIILOR DE CELULE TUMORALE**

În sistemul Gleason, AV a intensității **expresiei MMP9**, ca indicator al capacității de degradare a matricei extracelulare de către celulele tumorale, au arătat o tendință de stabilizare, cu o foarte discretă pantă ascendentă dinspre patternurile bine diferențiate spre cele slab diferențiate, pe un fond de oscilare a acestor valori de la un subtip la celălalt, aparent fără nici un fel de legătură cu gradul de diferențiere.

AV a intensității **expresiei MMP2** au arătat și ele un nivel de stabilizare în jurul unui prag de aproape două ori mai mic decât nivelul expresiei MMP9, fără nici o tendință de evoluție dinspre patternurile bine diferențiate spre cele slab diferențiate și cu oscilații de la un subtip la celălalt mai atenuate decât în cazul MMP9.

AV intensității **expresiei ECAD** au arătat în ansamblu un trend descendent evident dinspre patternurile bine diferențiate spre cele slab diferențiate, oscilații în general atenuate de la un subtip la celălalt.

În sfârșit, AV intensității **expresiei PTEN**, ca indicator al agresivității tumorale, au arătat și ele, ca și AV ale MMP9, o tendință de stabilizare, cu o discretă pantă ascendentă dinspre patternurile bine diferențiate spre cele slab diferențiate, pe un

fond de oscilare semnificativă a acestor valori de la un subtip la celălalt, fără nici un fel de legătură cu gradul de diferențiere.

În sistemul Srigley, probabil datorită grupării subtipurilor din sistemul Gleason, AV ale intensității expresiei celor patru parametri descriptivi ai comportamentului biologic al populațiilor celulare maligne au arătat în general aceleași tendințe de evoluție ca și la sistemul Gleason însă mai clare conturate, de stabilizare, fără nici o tendință de evoluție dinspre patternurile bine diferențiate spre cele slab diferențiate.

Și aici a existat o excepție notabilă și anume intensitatea expresiei ECAD, la care trendul a fost evident unul descendent, ca și la sistemul Gleason, dinspre patternurile bine diferențiate spre cele slab diferențiate.

Compararea AV ale expresiei intensității imunomarcării pentru fiecare din cei patru parametri descriptivi ai comportamentului biologic între ele atât la nivelul întregului lot cât și separat pe șirurile de valori ale fiecărui subtip al sistemului Gleason a relevat diferențe notabile, validate statistic ("p" foarte înalt semnificativ) între AV ale celor patru parametri.

De asemenea, au existat diferențe notabile, validate statistic ("p" foarte înalt semnificativ) la compararea AV ale expresiei intensității imunomarcării pentru fiecare din cei patru parametri descriptivi ai comportamentului biologic luate câte două atât la nivelul întregului lot cât și separat pe șirurile de valori ale fiecărui subtip al sistemului Gleason pentru: MMP9 și MMP2, MMP9 și ECAD, ECAD și PTEN, MMP2 și ECAD și MMP2 și PTEN. În cazul comparării AV ale expresiei MMP9 și PTEN au fost observate diferențe semnificative, validate statistic, cu valoarea "p" calculat pentru testul Pearson "foarte înalt semnificativă" numai pentru întregul lot și pentru patternurile GL3a, GL3C, GL4CR și GL4FU.

La sistemul Srigley, compararea AV ale expresiei intensității imunomarcării pentru fiecare din cei patru parametri descriptivi ai comportamentului biologic între ele atât la nivelul întregului lot cât și separat pe șirurile de valori ale fiecărui pattern a relevat și ea diferențe notabile, validate statistic ("p" foarte înalt semnificativă) între AV ale celor patru parametri.

De asemenea, au existat diferențe notabile, validate statistic ("p" foarte înalt semnificativ) la compararea AV ale expresiei intensității imunomarcării pentru fiecare din cei patru parametri descriptivi ai comportamentului biologic luate câte două atât la nivelul întregului lot cât și separat pe șirurile de valori ale fiecărui pattern pentru: MMP9 și MMP2, MMP9 și ECAD, ECAD și PTEN, MMP2 și ECAD și MMP2 și PTEN. Și la sistemul Srigley, în cazul comparării AV ale expresiei MMP9 și PTEN au fost observate diferențe semnificative, validate statistic, cu valoarea "p" calculat pentru testul Pearson "foarte înalt semnificativă" numai pentru întregul lot și pentru patternurile SG2 și SG3.

Diagramele corelațiilor dintre AV ale celor patru parametri descriptivi ai comportamentului biologic (MMP9, MMP2, ECAD și PTEN) luate câte două pentru întregul lot au relevat următoarele aspecte:

- Expresiile ambelor matrix metaloproteinaze au arătat o corelație puternică directă cu expresia ECAD, ambele corelații fiind validate statistic (valoarea calculată a "p" – foarte înalt semnificativă, respectiv înalt semnificativă). Cu alte cuvinte, intensitatea expresiei ambelor matrix metaloproteinaze evoluează paralel în același sens cu intensitatea expresiei adezivității celulare, fie spre accentuare fie spre reducere.
- Tot o corelație puternică directă au arătat expresia ECAD și expresia PTEN, validată statistic (valoarea calculată a "p" – semnificativă). Cu alte cuvinte, intensitatea expresiei adezivității celulare și gradul de agresivitate tumorală evoluează în același sens, fie cresc fie se reduc împreună.

- De asemenea, expresia MMP9 a arătat o corelație puternică directă cu expresia PTEN validată statistic (valoarea calculată a "p" – înalt semnificativă). Cu alte cuvinte intensitatea expresiei matrix metaloproteinazei evoluează în sens opus cu gradul de agresivitate tumorală, când prima se accentuează, a doua se reduce.
- În sfârșit, expresia PTEN a arătat o corelație directă validată statistic (valoarea calculată a "p" – semnificativă) cu valoarea raportului MMP9/MMP2. Cu alte cuvinte, agresivitatea tumorală evoluează în sens opus cu valoarea raportului dintre intensitățile celor două matrix metaloproteinaze (deoarece intensitatea imunomarcării pentru PTEN evoluează în același sens cu valoarea raportului).
- Expresiile celor două matrix metaloproteinaze a arătat o tendință la corelație directă (valoarea calculată a "p" >0,05 dar <0,5). Cu alte cuvinte, intensitățile expresiei ambelor matrix metaloproteinaze au tendința la evoluție paralelă în același sens, fie spre accentuare fie spre reducere.
- De asemenea, expresia ECAD a arătat o tendință la corelație directă (valoarea calculată a "p" >0,05 dar <0,5) cu valoarea raportului MMP9/MMP2. Cu alte cuvinte, intensitatea expresiei adezivității celulare are tendința la evoluție paralelă în același sens, fie spre accentuare fie spre reducere cu valoarea raportului dintre intensitățile celor două matrix metaloproteinaze.
- În sfârșit, expresia MMP2 a arătat numai o schiță de corelație directă cu intensitatea expresiei PTEN (valoarea calculată a "p" >0,5). Cu alte cuvinte, intensitatea expresiei matrix metaloproteinazei are o tendință discretă de evoluție divergentă cu agresivitatea tumorală.

Evaluarea parametrilor descriptivi ai comportamentului biologic al proliferării neoplazice maligne epiteliale a parenchimului prostatic a scos în evidență câteva aspecte interesante:

Expresia capacității de degradare a matricei extracelulare a fost dominată de MMP9 – Gelatinaza B. Intensitatea expresiei MMP9 a avut o tendință oscilantă însă cu un trend general discret ascendent de la patternurile bine diferențiate (Gleason 2 în sistemul Gleason și Srigley 1 în sistemul Srigley) către patternurile moderat și slab diferențiate (Gleason 3 și 4, respectiv Srigley 2 și 3).

Interesant este că expresia MMP9 s-a redus la patternurile cele mai slab diferențiate (Gleason 5, respectiv Srigley 4) însă valorile medii ale intensității expresiei s-au situat peste valorile medii înregistrate la patternurile bine diferențiate

Evaluarea expresiei MMP2 a arătat că Gelatinaza A joacă un rol secundar în degradarea matricei extracelulare în evoluția carcinomului de prostată, mediile valorilor raportului MMP9/MMP2 variind între 1,8 și 2.

Expresia ECAD, unul din principalii actori care contribuie la adezivitatea intercelulară, a arătat, deși și ea pe fondul unei evoluții oscilante, un trend evident descendent al valorilor intensității de la patternurile bine diferențiate (Gleason 2 în sistemul Gleason și Srigley 1 în sistemul Srigley) la patternurile cele mai slab diferențiate (Gleason 5, respectiv Srigley 4), trădând o scădere a coeziunii intercelulare pe măsura reducerii gradului de diferențiere.

În sfârșit, expresia PTEN, caracterizată și ea prin oscilații semnificative de la un pattern la altul, nu a părut să schițeze nici un fel de corelare cu gradul de diferențiere, deși la patternurile sistemului Gleason a schițat un trend ușor ascendent care însă s-a aplatizat la evaluarea valorilor medii ale expresiei la patternurile sistemului Srigley.

În general, tendințele evoluțiilor parametrilor analizați au fost mai clar conturate la patternurile sistemului conceput de Srigley.

## CONCLUZII

Studiul nostru, cuprinzând o analiză atât individuală cât și comparativă a arhitecturii tumorale complexe și comportamentului biologic al populațiilor de celule tumorale a condus la câteva concluzii care pot avea importanță și aplicabilitate în practica medicală:

**Componentele arhitecturii tumorale** au prezentat, în ansamblu, două categorii de tendințe ale evoluției modului de aranjare exprimat de dimensiunile fractale (FD) ale fiecăreia dintre ele în cadrul procesului de remodelare tumorală: pe de-o parte tendințele de evoluție corelate cu gradul de diferențiere tumorală iar pe de altă parte, tendințele de influență reciprocă.

- În ceea ce privește corelarea cu gradul de diferențiere, s-au desprins câteva aspecte interesante:
  - Modul de dispoziție a celulelor tumorale a arătat în ansamblu, deși pe un fond oscilant, o tendință de stabilizare în jurul unui model de aranjare a populației celulare tumorale mai mult în suprafață, cu o tendință de evoluție către modelul de dispunere în suprafață pe măsura scăderii gradului de diferențiere exprimată în sistemul Srigley.
  - Aranjamentul stromal a avut și el aceeași tendință de orientare către modelul în suprafață, mai redusă însă decât la populația de celule tumorale, însă cu o tendință exprimată de evoluție către modelul de dispunere în suprafață pe măsura scăderii gradului de diferențiere atât în sistemul Gleason cât și în sistemul Srigley..
  - Trama vasculară a arătat în general o tendință de dispunere după modelul liniar, valorile medii ale FD pentru fiecare pattern din ambele clasificări fiind inferioare valorii de 1,4. Mai mult decât atât, această tendință s-a accentuat de la patternurile bine diferențiate către cele slab diferențiate.
- În ceea ce privește posibilele influențe reciproce, datele furnizate de evaluarea statistică au arătat că:
  - Stroma tumorală se adaptează aranjamentului populației de celule tumorale urmând același mod de dispunere cu acesta fie în sensul extinderii în suprafață fie în sensul ordonării după un model liniar.
  - Rețeaua vasculară intratumorală se reconfigurează și ea după modul de aranjare a celulelor tumorale, urmând ca și componenta stromală același model arhitectural ca cel al componentei celulare.
  - În schimb, nu pare să existe nici un fel de influență sau legătură între modurile în care se configurează cele două elemente ale structurii de susținere a populației de celule tumorale, aparatul statistic dovedind că evoluțiile lor spre unul sau altul din modelele de aranjare sunt independente una de cealaltă.

Și **parametrii definatorii ai comportamentului biologic** al populațiilor de celule tumorale au prezentat aceleași două categorii de tendințe ale evoluției intensității lor de expresie și anume tendințele de evoluție corelate cu gradul de diferențiere tumorală și tendințele de influență reciprocă.

- În ceea ce privește corelarea cu gradul de diferențiere, s-a putut observa că:
  - Gradul de adeziune intercelulară a prezentat o tendință discretă de reducere dinspre patternurile bine diferențiate spre cele slab diferențiate, tendință mai bine exprimată la sistemul Srigley.
  - Capacitatea de degradare a matricei extracelulare este asigurată în principal de Gelatinaza B/MMP9. Gelatinaza A/MMP2 ocupă un rol secundar, secreția ei

fiind, independent de tipul de arhitectură tumorală, de aproape două ori mai redusă decât cea a MMP9. Valorile expresiei celor două matrix metaloproteinaze nu par însă să se coreleze cu gradul de diferențiere tumorală indiferent dacă acesta este evaluat cu ajutorul sistemului Gleason sau cu ajutorul sistemului Srigley

- Nici nivelul de agresivitate tumorală, tradus prin intensitatea expresiei PTEN, nu a etalat variații legate de gradul de diferențiere al proliferărilor tumorale indiferent dacă sistemul de evaluare a fost Gleason sau Srigley.
- În ceea ce privește posibilele influențe reciproce, datele furnizate de evaluarea statistică au arătat următoarele aspecte:
  - Adezivitatea intercelulară, exprimată de intensitatea imunomarcării cu ECAD, a fost mai accentuată la populațiile celulare care au arătat o expresie mai accentuată a PTEN, cu alte cuvinte, un grad de agresivitate mai redusă.
  - Paradoxal oarecum, populațiile celulare la care adezivitatea celulară a fost mai accentuată au produs o cantitate mai mare de enzime de degradare ale matricei extracelulare.
  - Ca o consecință firească a celor afirmate mai sus, se poate spune că populațiile celulare care au produs mai multe enzime de degradare a matricei extracelulare, au fost mai puțin agresive întrucât au arătat o expresie mai accentuată a PTEN.

În ansamblu, rezultatele obținute sugerează că.

- Populația celulară tumorală modelează și adaptează componenta stromală și componenta vasculară înconjurătoare în același sens în care evoluează dispoziția ei arhitecturală.
- Componenta stromală și trama vasculară se dezvoltă independent una de cealaltă, prima evoluând către modelul de dispoziție arhitecturală "în suprafață" o dată cu scăderea gradului de diferențiere în timp ce a doua evoluează către modelul de "liniar" de dispoziție arhitecturală o dată cu scăderea gradului de diferențiere.
- Se pare că sistemul de clasificare a modelului de distribuție a arhitecturii tumorale propus de Srigley, prin regruparea subtipurilor descrise de Gleason, oferă o descriere mai corectă și mai fidelă a corelației dintre arhitectura tumorală și gradul de diferențiere.
- Proprietățile caracteristice pentru comportamentul populațiilor de celule maligne evaluate, și anume adezivitatea intercelulară, capacitatea de degradare a matricei extracelulare și gradul de agresivitate, au arătat tenduri de evoluție sincronă. Unele dintre ele par oarecum firești, ca în cazul scăderii adezivității celulare în paralel cu scăderea expresiei PTEN. Altele însă sunt paradoxale cum este cazul creșterii capacității de degradare a matricei extracelulare în paralel cu creșterea gradului de adezivitate intercelulară și cu scăderea gradului de agresivitate (semnalat de supraexpresia PTEN). Dintre toate însă, numai scăderea adezivității intercelulare s-a corelat cu scăderea gradului de diferențiere celulară.

O ultimă remarcă ar fi aceea că pașii făcuți în cadrul acestui studiu trebuie continuați pe de-o parte prin extinderea loturilor iar pe de altă parte prin introducerea în studiu a noi parametri și prin extinderea evaluării corelațiilor dintre toți parametrii urmăriți.

## BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Abate-Shen C and Shen MM. Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev.* 2000, 14(19):2410-2434.
2. Aumuller G. Morphologic and endocrine aspects of prostatic function. *Prostate*, 1983, 4(2):195-214.
3. Aumuller G. Functional morphology of the prostate. *Urologe [A]*, 1989 a, 28(6):306-310.
4. Aumuller G. Morphologic and regulatory aspects of prostatic function. *Anat Embryol (Berl)*, 1989 b, 179(6):519-531.
5. Baish JW, Jain RK. *Fractals and Cancer.* *Cancer Res*, 2000, 60(14):3683-3688.
6. Bhatia-Gaur R, Donjacour AA, Sciavolino PJ, Kim M, Desai N, Young P, Norton CR, Gridley T, Cardiff RD, Cunha GR, Abate-Shen C, Shen MM. Roles for Nkx3.1 in prostate development and cancer. *Genes & Dev*, 1999, 13(8): 966–977.
7. Bhowmick NA, Moses HL. Tumor-stroma interactions. *Curr Opin Genet Dev*, 2005; 15(1):97–101.
8. Brar PK, Dalkin BL, Weyer C, Sallam K, Virtanen I, Nagle RB. Laminin alpha-1, alpha-3, and alpha-5 chain expression in human prepubertal [correction of prepubetal] benign prostate glands and adult benign and malignant prostate glands. *Prostate*, 2003; 55(1):65-70.
9. Brierley JD, Gospodarowicz M, Wittekind Ch, editors. *TNM Classification of Malignant Tumours.* 8th Ed. Wiley-Blackwell; 2017, 191-194.
10. Catalona WJ. *Prostate cancer.* Grune & Stratton, New York, 1984.
11. Chaudhuri BB and Sarkar N. Texture segmentation using fractal dimension. *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 1995, 17(1), 72–77.
12. Chen N and Zhou Q. The evolving Gleason grading system. *Chin J Cancer Res*, 2016, 28(1):58-64.
13. Cunha GR, Donjacour AA, Sugimura Y. Stromal-epithelial interactions and heterogeneity of proliferative activity within the prostate. *Biochem. Cell. Biol*, 1986; 64(6):608-614.
14. D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, Schultz D, Blank K, Broderick GA, Tomaszewski JE, Renshaw AA, Kaplan I, Beard CJ, Wein A. Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *JAMA*, 1998, 280(11):969–974.
15. Delahunt B, Miller RJ, Srigley JR, Evans AJ and Samaratunga H. Gleason grading: past, present and future. *Histopathology*, 2012, 60(1):75–86.
16. Draisma G, Etzioni R, Tsodikov A, Mariotto A, Wever E, Gulati R, Feuer E, de Koning H. Lead time and overdiagnosis in prostate-specific antigen screening: importance of methods and context. *Journal of the National Cancer Institute*, 2009; 101:374–383.
17. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med*, 1986; 315:1650–1659.
18. Dvorak HF. Tumors: Wounds that do not heal—Redux. *Cancer Immunol Res*, 2015, 3(1):1–11.
19. Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA; Grading Committee (Al-Hussain T, Algaba F, Aron M, Berman D, Berney D, Brimo F, Cao D, Chevillet J, Clouston D, Coicchia M, Comperat E, da Cunha IW, De Marzo A, Ertoy D, Fine S, Foster C, Grignon D, Gupta N, Gupta R, Kench J, Kristiansen G, Kunju L, Leite KR, Loda M, Lopez-Beltran A, Lotan T, Lucia M, Magi-Galluzzi C, Montironi R, McKenney J, Merrimen J, Netto G, Orozco R, Paner G, Parwani A, Pizov G, Reuter V, Ro J, Samaratunga H, Schultz L, Shanks J, Sesterhenn I, Shen S, Simko J, Suzigan S, Suryavanshi M, Tan PH, Takahashi H, Tomlins S, Trpkov K, Troncoso P, True L, Tsuzuki T, van der Kwast T, Varma M, Warren A, Wheeler T, Yang X, Zhou M, Kantoff P, Eisenberger M, Stadler W, Andriole G, Klein E, Benson M, Montorsi F, Crawford D, Loeb S, Catto J, Schaeffer E, Nacey JN, DeWeese T, Sandler H, Zietman A, Pollack A, Rodrigues G). The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. *Am J Surg Pathol*, 2016a, 40(2):244-252.
20. Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, Rosso S, Coebergh JW, Comber H, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur J Cancer*, 2013, 49(6):1374-1403.
21. Fleming ID, Cooper JJ, Henson DE, Hutter RVP, Kennedy BJ, Murphy GP, O'Sullivan B, Sobin LH and Yarbro JW. . *AJCC Cancer Staging Manual*, 5th edition. American Joint Committee on Cancer. Lippincott-Raven, Philadelphia, 1997, 219 – 224.
22. Gleason DF. Classification of prostatic carcinoma. *Cancer Chemother Rep* 1966; 50:125–128.

23. Gleason DF. The Veterans Administration Cooperative Urological Research Group. Histologic grading and clinical staging of prostatic carcinoma. In: Tannenbaum M (ed). *Urologic Pathology: The Prostate*. Lea & Febiger, Philadelphia, 1977, pp 171–197; (Chapter 9).
24. Haas GP, Delongchamps N, Brawley OW, Wang CY, de la Roza G. The worldwide epidemiology of prostate cancer: perspectives from autopsy studies. *Can J Urol*, 2008, 15(1):3866–3871.
25. Hayes DF, Bast RC, Desch CE, Fritsche H Jr, Kemeny NE, Jessup JM, Locker GY, Macdonald JS, Mennel RG, Norton L, Ravdin P, Taube S, Winn RJ. Tumor marker grading system: a framework to evaluate clinical utility of tumor markers. *J Natl Cancer Inst*, 1996, 88(20):1456–1466.
26. Hayward SW. Approaches to modeling stromal-epithelial interactions. *J Urol*, 2002, 168(3):1165-1172.
27. Hoffman KE, Niu J, Shen Y, Jiang J, Davis JW, Kim J, Kuban DA, Perkins GH, Shah JB, Smith GL, Volk RJ, Buchholz TA, Giordano SH, Smith BD. Physician Variation in Management of Low-Risk Prostate Cancer: A Population-Based Cohort Study. *JAMA Intern Med*, 2014, 174(9):1450-1459.
28. Humphrey P. Histological variants of prostatic carcinoma and their significance. *Histopathology*, 2012, 60(1):59-74
29. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61(2): 69-90.
30. Kan Z, Jaiswal BS, Stinson J, Janakiraman V, Bhatt D, Stern HM, Yue P, Haverty PM, Bourgon R, Zheng J, Moorhead M, Chaudhuri S, Tomsho LP, Peters BA, Pujara K, Cordes S, Davis DP, Carlton VE, Yuan W, Li L, Wang W, Eigenbrot C, Kaminker JS, Eberhard DA, Waring P, Schuster SC, Modrusan Z, Zhang Z, Stokoe D, de Sauvage FJ, Faham M, Seshagiri S. Diverse somatic mutation patterns and pathway alterations in human cancers. *Nature*, 2010, 466(7308):869–873.
31. Kattan MW, Wheeler TM, Scardino PT. Postoperative nomogram for disease recurrence after radical prostatectomy for prostate cancer. *J Clin Oncol*, 1999, 17(5):1499–1507.
32. Keipes M, Ries F, Dicato M: Of the British coastline and the interest of fractals in medicine. *Biomed Pharmacother* 1993, 47(9):409–415.
33. Kryvenko ON, Epstein JI. Changes in prostate cancer grading: Including a new patient-centric grading system. *Prostate*, 2016, 76(5):427-433.
34. Kumar A, Marla NJ, Fernandes H, Kallingal P. Usefulness and significance of morphological criteria with regard to Gleason grade in the diagnosis of adenocarcinoma prostate. *Muller J Med Sci Res*, 2015, 6(2):147-153
35. Laczkó I, Hudson DL, Freeman A, Feneley MR, Masters JR. Comparison of the zones of the human prostate with the seminal vesicle: Morphology, immunohistochemistry, and cell kinetics. *Prostate*, 2005, 62(3):260-266.
36. Li J and Wang Z. The pathology of unusual subtypes of prostate cancer. *Chin J Cancer Res*, 2016, 28(1):130-143.
37. Long RM, Morrissey C, Fitzpatrick JM, Watson RW: Prostate epithelial cell differentiation and its relevance to the understanding of prostate cancer therapies. *Clin Sci (Lond)*, 2005, 108(1):1-11.
38. Martin NE, Mucci LA, Loda M and DePinho RA. Prognostic Determinants in Prostate Cancer *Cancer J*, 2011, 17(6):429–437.
39. Mawhinney M. The extracellular matrix and cellular proliferation in etiology of benign prostatic hyperplasia. In: Ackermann R. and Schröder FH (Editors) *Prostatic Hyperplasia: Etiology, Surgical and Conservative Management*. New Dev Biosci, 1989, 5:55-62.
40. McNeal JE. Developmental and comparative anatomy of the prostate. In: Grayhack J., Wilson J., Scherbenske M., eds. *Benign Prostatic Hyperplasia*. DHEW publication no. (NIH)76-1113. Washington, DC: Department of Health, Education and Welfare; 1976 , 1-10.
41. McNeal JE. The zonal anatomy of the prostate. *Prostate*, 1981, 2(1):35-49.
42. Musat Sorin. Matrix for receiving a tissue sample and use thereof. United States Patent #9,851,349, 2017.
43. NCCC (National Collaborating Centre for Cancer). *Prostate Cancer: diagnosis and treatment*. 2014, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK248398/>, 73-80.
44. Niu Y-N, Xia S-J. Stroma–epithelium crosstalk in prostate cancer. *Asian Journal of Andrology*, 2009, 11(1):28–35.
45. Pierorazio PM, Walsh PC, Partin AW, Epstein JI. Prognostic Gleason grade grouping: data based on the modified Gleason scoring system. *BJU Int*, 2013, 111(5):753-760.
46. Rowley DR. What might a stromal response mean to prostate cancer progression? *Cancer Metastasis Rev*, 1998-1999, 17 (4):411-419.



47. Saito A, Munakata H. Detection of chondroitin sulfate-binding proteins on the membrane. *Electrophoresis*, 2004, 25(15):2452-2460.
48. Srigley JR, Benign mimickers of prostatic adenocarcinoma, *Modern Pathology*, 2004, 17:328–348.
49. Stamey T.A, McNeal J.E.: Adenocarcinoma of Prostate (Vol. 2, Ch 29). in Walsh P.C., Retik A.B., Stamey T.A., Vaughan E.D. Jr. (eds): *Campbell's Urology*. Sixth Edition W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1992, 1159-1221.
50. Stepan A, Simionescu C, Pirici D, Ciurea R, Margaritescu C. Fractal Analysis and the Diagnostic Usefulness of Silver Staining Nucleolar Organizer Regions in Prostate Adenocarcinoma. *Anal Cell Pathol (Amst)*, 2015, 2015:250265.
51. Stephenson AJ, Kattan MW, Eastham JA, Bianco FJ Jr, Yossepowitch O, Vickers AJ, Klein EA, Wood DP, Scardino PT. Prostate cancer-specific mortality after radical prostatectomy for patients treated in the prostate-specific antigen era. *J Clin Oncol*. 2009, 27(26):4300–4305.
52. Stewart BW and Wild CP. *World Cancer Report 2014*, International Agency for Research on Cancer, WHO Press, Lyon, 2014.
53. Tambasco M, Costello BM, Kouznetsov A, Yau A, Magliocco AM: Quantifying the architectural complexity of microscopic images of histology specimens. *Micron*, 2009, 40(4):486–494.
54. Tanase M, Waliszewski P. On complexity and homogeneity measures in predicting biological aggressiveness of prostate cancer; Implication of the cellular automata model of tumor growth. *J Surg Oncol*, 2015, 112(8):791-801.
55. Taverna G, Colombo P, Grizzi F, Franceschini B, Ceva-Grimaldi G, Seveso M, et al: Fractal analysis of two-dimensional vascularity in primary prostate cancer and surrounding non-tumoral parenchyma. *Pathol Res Pract* 2009, 205(7):438–444.
56. Taverna G, Grizzi F, Colombo P, Seveso M, Giusti G, Proietti S, Fiorini G, Lughezzani G, Casale P, Buffi N, Lazzari M, Guazzoni G. Two-dimensional neovascular complexity is significantly higher in nontumor prostate tissue than in low-risk prostate cancer. *Korean J Urol*, 2015, 56(6):435-442.
57. Tuxhorn JA, Ayala GE, Rowley DR. Reactive stroma in prostate cancer progression. *J. Urol*. 2001; 166 (6): 2472-2483.
58. Waliszewski P, Abu Eid R, Kribus S, Schafhauser W, Stenzl A. Fractal dimension as a novel measure of prostate cancer grading. *Eur Urol Suppl*, 2010, 9(2):67-68.
59. Waliszewski P, Wagenlehner F, Gattenlöhner S, Weidner W. Fractal geometry in the objective grading of prostate carcinoma. *Urologe A*, 2014b, 53(8):1186-1194.
60. Waliszewski P, Wagenlehner F, Gattenlöhner S, Weidner W. On the relationship between tumor structure and complexity of the spatial distribution of cancer cell nuclei: a fractal geometrical model of prostate carcinoma. *Prostate*, 2015, 75(4):399-414.
61. Waliszewski P, Wagenlehner F, Kribus S, Schafhauser W, Weidner W, Gattenlöhner S. Objective grading of prostate carcinoma based on fractal dimensions: Gleason 3 + 4 = 7a ≠ Gleason 4 + 3 = 7b. *Urologe A*, 2014a, 53(10):1504-1511.
62. Waliszewski P. Computer-Aided image Analysis and Fractal Synthesis in the Quantitative Evaluation of Tumor Aggressiveness in prostate Carcinomas. *Front Oncol*, 2016a, 6:110 (1-4).
63. Waliszewski P. The quantitative criteria based on the fractal dimensions, entropy and lacunarity for the spatial distribution of cancer cell nuclei enable identification of low or high aggressive prostate carcinomas. *Front Physiol*, 2016b, 7:34.
64. Wong MC, Goggins WB, Wang HH, Fung FD, Leung C, Wong SY, Ng CF, Sung JJ. Global Incidence and Mortality for Prostate Cancer: Analysis of Temporal Patterns and Trends in 36 Countries. *Eur Urol*, 2016, 70(5):862-874.