

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Приволжский исследовательский медицинский университет»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

*На правах рукописи*

**Коровин Олег Александрович**

**Уровень мРНК *FOXP3* и *IL-10* у больных раком и доброкачественной  
гиперплазией предстательной железы**

**Специальность: 3.1.6. Онкология, лучевая терапия  
3.2.7. Иммунология**

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

**Научные руководители:**

доктор медицинских наук, профессор  
Алясова Анна Валерьевна

доктор биологических наук, профессор  
Новиков Виктор Владимирович

Донецк - 2024

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	4
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	12
1.1. Современные методы диагностики рака и доброкачественных опухолей предстательной железы.....	12
1.2. Прогнозирование течения и оценка эффективности терапии рака предстательной железы.....	15
1.3. Новые биомаркеры рака предстательной железы.....	19
1.4. Иммунологические нарушения у больных раком предстательной железы.....	22
1.5. Роль генов <i>FOXP3</i> и <i>IL-10</i> при опухолевом росте.....	26
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ</b> .....	31
2.1. Материалы исследований.....	31
2.2. Методы исследования.....	37
2.2.1. Клиническое обследование.....	37
2.2.2. Инструментальные методы диагностики.....	37
2.2.3. Лабораторные методы.....	37
2.2.3.1. Выделение суммарной фракции нуклеиновых кислот.....	38
2.2.3.2. Обработка смеси нуклеиновых кислот дезоксирибонуклеазой I (ДНКазой I).....	38
2.2.3.3. Реакция обратной транскрипции.....	39
2.2.3.4. Полимеразная цепная реакция в реальном времени.....	39
2.3. Статистическая обработка данных.....	41
<b>ГЛАВА 3. ХАРАКТЕРИСТИКА УРОВНЕЙ мРНК <i>FOXP3</i> И <i>IL-10</i> У БОЛЬНЫХ РАКОМ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ</b> .....	42
3.1. Определение уровня мРНК <i>FOXP3</i> в периферической крови здоровых лиц и больных раком предстательной железы.....	42
3.2. Определение уровня мРНК <i>IL-10</i> в периферической крови здоровых лиц и больных раком предстательной железы.....	59

3.3. Определение уровня мРНК <i>FOXP3</i> в опухолях больных раком предстательной железы.....	76
3.4. Определение уровня мРНК <i>IL-10</i> в опухолях больных раком предстательной железы.....	84
<b>ГЛАВА 4. ХАРАКТЕРИСТИКА УРОВНЕЙ мРНК <i>FOXP3</i> И <i>IL-10</i> У БОЛЬНЫХ ДОБРОКАЧЕСТВЕННОЙ ГИПЕРПЛАЗИЕЙ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ.....</b>	<b>90</b>
4.1. Определение уровня мРНК <i>FOXP3</i> в периферической крови здоровых лиц и больных доброкачественной гиперплазией предстательной железы... ..	90
4.2. Определение уровня мРНК <i>IL-10</i> в периферической крови здоровых лиц и больных доброкачественной гиперплазией предстательной железы.....	97
4.3. Определение уровня мРНК <i>FOXP3</i> в опухолях больных доброкачественной гиперплазией предстательной железы.....	103
4.4. Определение уровня мРНК <i>IL-10</i> в опухолях больных доброкачественной гиперплазией предстательной железы.....	110
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>116</b>
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>125</b>
<b>ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....</b>	<b>127</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....</b>	<b>128</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>129</b>

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Онкологические заболевания представляют большую группу патологий, сопровождающуюся образованием доброкачественных и злокачественных опухолей в организме.

В 2022 г. в Российской Федерации выявлено более 624 835 тысяч случаев злокачественных новообразований. Прирост данного показателя по сравнению с 2021 г. составил 7,6%. Чаще поражаются молочные железы, кожа и предстательная железа [21]. Рак предстательной железы (РПЖ) – это злокачественное новообразование, развивающееся из клеток предстательной железы, является самым распространённым новообразованием у мужчин старше 50 лет и характеризуется значительной летальностью (свыше 16%). Новообразование чаще диагностируется у лиц в возрасте 60 – 70 лет, ежегодно от него погибает почти 7000 пациентов (4,1%). В России РПЖ занимает 5 место по смертности. Доброкачественная гиперплазия предстательной железы (ДГПЖ) – это доброкачественное образование, развивающееся из железистого эпителия, либо стромального компонента простаты. Согласно статистическим данным, каждый четвертый мужчина в возрастной категории 40 – 50 лет страдает аденомой предстательной железы, в возрасте 50 – 60 лет – каждый второй, мужчины старше 70 лет страдают данным заболеванием еще чаще [18].

Существуют различные методы дифференциальной диагностики РПЖ и ДГПЖ, главным из которых является гистологическое исследование опухолевой ткани, представляющее собой инвазивное вмешательство. В предоперационном периоде судить об истинной природе заболевания достаточно сложно, особенно в случаях, когда уровень простат-специфического антигена (PSA) находится в диапазоне 4 – 20 нг/мл [(2)]. Представляется актуальным поиск новых маркеров, позволяющих характеризовать РПЖ и ДГПЖ с целью раннего выявления данной патологии

и своевременного проведения дифференциальной диагностики заболеваний предстательной железы.

### **Степень разработанности темы**

В развитии РПЖ и ДГПЖ важную роль играют иммунные нарушения, связанные со смещением равновесия противовоспалительных реакций. Патогенетическую значимость имеют механизмы иммуносупрессии, реализуемые с помощью *FOXP3*<sup>+</sup> Т-регуляторов и продуцируемого ими цитокина *IL-10*. Транскрипционный фактор FOXP3 регулирует развитие и функции Т-регуляторов, угнетающих иммунный ответ. IL-10 является плеiotропным цитокином, обладает иммуномодулирующими свойствами и может ингибировать развитие и прогрессирование опухоли или стимулировать ее рост.

IL-10 экспрессируется широким спектром типов клеток как врожденного, так и адаптивного звена иммунной системы, кератиноцитами, эпителиальными клетками и некоторыми опухолевыми клетками. Диапазон клеток-респондеров также довольно широк, что обуславливает многофункциональность и разнонаправленность действия *IL-10*. Уровень FOXP3 клеток и IL-10 в ряде случаев коррелирует с тяжестью течения и стадией онкологических заболеваний [118].

Исследование экспрессии генов, кодирующих *FOXP3* и *IL-10* в периферической крови и опухолях, позволит получить дополнительную информацию о молекулярных механизмах иммунного ответа при онкологических заболеваниях, в том числе при РПЖ и ДГПЖ.

### **Связь исследований с научными программами, планами, темами**

Тема диссертации соответствует приоритетным направлениям государственной программы «Научно-технологическое развитие Нижегородской области до 2030 года», утвержденной постановлением Правительства Нижегородской области. Диссертационное исследование проводилось в рамках приоритетных направлений научно-технической деятельности, утвержденных Указами Губернатора Нижегородской области.

Диссертационное исследование выполнено в соответствии с планами НИИ Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации «Уровень мРНК *FOXP3* и *IL-10* у больных раком и доброкачественной гиперплазией предстательной железы», шифр РК 208.006.06, где соискатель является ответственным исполнителем.

**Цель работы:** оценить уровни мРНК *FOXP3* и *IL-10* у больных раком и доброкачественной гиперплазией предстательной железы в периферической крови и опухолевой ткани для выявления их диагностической и возможной прогностической значимости.

**Задачи:**

1. Охарактеризовать уровень мРНК генов *FOXP3* и *IL-10* в крови больных раком предстательной железы с разными клиническими и патологоанатомическими факторами, влияющими на прогноз заболевания.
2. Оценить уровень мРНК генов *FOXP3* и *IL-10* в опухолевой ткани больных раком предстательной железы.
3. Определить уровень мРНК генов *FOXP3* и *IL-10* в крови больных доброкачественной гиперплазией предстательной железы с различными клинико-морфологическими факторами, определяющими особенности течения заболевания.
4. Оценить уровень мРНК генов *FOXP3* и *IL-10* в опухолевой ткани больных доброкачественной гиперплазией предстательной железы.
5. Сопоставить уровни мРНК генов *FOXP3* и *IL-10* у больных раком предстательной железы и доброкачественной гиперплазией предстательной железы в периферической крови и опухолевой ткани.
6. Оценить возможность применения данных об уровне мРНК *FOXP3* и *IL-10* в предоперационном периоде у пациентов с РПЖ и ДГПЖ для определения объема оперативного вмешательства.

**Объект исследования:** относительные уровни мРНК *FOXP3* и *IL-10* у пациентов с РПЖ и ДГПЖ.

**Предмет исследования:** образцы крови и опухолевой ткани.

#### **Научная новизна исследования**

1. Впервые показано, что развитие рака и доброкачественной гиперплазии предстательной железы сопровождается повышением уровня мРНК *FOXP3* в крови пациентов на фоне снижения содержания в крови мРНК *IL-10* по отношению к нормальному.

2. В образцах опухолевой ткани рака и доброкачественной гиперплазии предстательной железы уровень мРНК *FOXP3* выше, чем в крови больных, а содержание мРНК *IL-10* – ниже при раке и не имеет достоверных отличий при доброкачественной гиперплазии предстательной железы.

3. Развитие рака предстательной железы сопровождается значимым повышением уровня мРНК *FOXP3* в крови пациентов и снижением содержания мРНК *IL-10* в крови и опухолевой ткани по сравнению с соответствующими значениями у пациентов с доброкачественной гиперплазией простаты.

4. Выявлены факторы, оказывающие влияние на изменение уровней мРНК *FOXP3* и мРНК *IL-10* в крови и опухолевой ткани больных раком простаты и доброкачественной гиперплазией предстательной железы.

#### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Полученные результаты вносят вклад в картину экспрессии таких иммуносупрессорных генов, как гены, кодирующие *FOXP3* и *IL-10*, при злокачественной и доброкачественной патологии предстательной железы. Данные об уровнях мРНК *FOXP3* и *IL-10* дополняют существующие представления об особенностях транскриптома клеток периферической крови и клеток опухолей больных РПЖ и ДГПЖ. Проведенные исследования позволили получить результаты, которые могут быть рекомендованы для применения в медицинских учреждениях с лабораториями, оснащенными

соответствующим оборудованием, с целью мониторинга состояния иммунной системы больных раком предстательной железы и доброкачественной гиперплазией простаты в предоперационный период. Полученные теоретические данные могут быть использованы в составлении обучающих программ для студентов и аспирантов медицинских и биологических вузов. Результаты исследования внедрены в научно-практическую деятельность в ГУЗ ОКОД «Областной клинический онкологический диспансер» г. Ульяновска (акт внедрения от 07.09.24. Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Нижегородской области «Городецкая центральная районная больница, г. Городец (акт внедрения от 20.09.2024).

#### **Личный вклад соискателя**

Диссертация является самостоятельным научным трудом соискателя. Автором под руководством научных руководителей сформулирована идея работы, обоснована актуальность и необходимость проведения исследования, определены цель и задачи исследования. Соискателем лично проведен отбор пациентов в исследование с учетом критериев включения и исключения, собраны, проанализированы и обобщены их клинические данные. Автором выполнена оценка инструментальных, лабораторных, патогистологических, цитологических методов исследования. Диссертантом проведена статистическая обработка результатов, проанализированы результаты исследования, написаны все разделы диссертации, сформулированы ее основные положения, выводы и практические рекомендации, оформлен автореферат.

При написании диссертации не использованы идеи и научные разработки соавторов. В работах, написанных в соавторстве, реализованы идеи диссертанта.

## **Методология и методы исследования**

При проведении исследования были использованы: клиническое обследование – для изучения анамнеза и подтверждения диагноза; инструментальные методы диагностики – для наблюдения при плановых и профилактических обследованиях, при выявлении заболеваний, для контроля над их течением; лабораторные методы – для определения уровней мРНК исследуемых генов; статистические – для обработки полученных результатов с применением пакетов компьютерных программ «Rest», «Excel» версия 2007, «Statistica» версия 8.0 и «GraphPadPrism» версия 7.0.

## **Основные положения диссертации, выносимые на защиту**

1. У больных раком предстательной железы наблюдается статистически значимое повышение уровня мРНК *FOXP3* и снижение содержания мРНК *IL-10* в периферической крови по сравнению с нормой, в опухолевой ткани уровень мРНК *FOXP3* статистически значимо выше, а содержание мРНК *IL-10* ниже, чем в образцах крови этих пациентов.

2. В случаях доброкачественной гиперплазии предстательной железы в образцах периферической крови уровень мРНК *FOXP3* статистически значимо выше, содержание мРНК *IL-10* – достоверно ниже, чем в контрольной группе, в опухолевой ткани содержание мРНК *FOXP3* статистически значимо выше, чем в крови, а уровень мРНК *IL-10* в образцах крови и ткани не имеет отличий.

3. Уровень РНК *FOXP3* в крови был выше у больных раком по сравнению с показателем пациентов с доброкачественной гиперплазией простаты, в опухолевой ткани содержание мРНК *FOXP3* статистически значимо не отличалось у лиц с доброкачественной и злокачественной патологией предстательной железы. Уровень мРНК *IL-10* в крови и опухолевой ткани больных доброкачественными новообразованиями выше, чем у лиц, страдающих раком предстательной железы.

4. Содержание мРНК *FOXP3* и мРНК *IL-10* в крови больных РПЖ и ДГПЖ в предоперационном периоде обладает информативностью в

определении целесообразности выполнения оперативного вмешательства в виде проведения трансуретральной резекции, радикальной простатэктомии или биопсии.

### **Степень достоверности, апробация результатов**

Достоверность и обоснованность полученных результатов диссертационного исследования подтверждается достаточным объемом обследованных пациентов (63 больных РПЖ и 52 ДППЖ) и выполненными лабораторными исследованиями, а также выбором адекватных, соответствующих задачам исследования современных методов статистической обработки полученных данных с применением программ «Excel» версия 2007, «Statistica» версия 8.0 и «GraphPadPrism» версия 7.0. Положения, изложенные в диссертации, базируются на полученных данных и соответствуют материалу, представленному в публикациях.

Апробация работы проведена на заседании проблемной комиссии «Сердечно – сосудистая хирургия, лучевая диагностика и лучевая терапия» 15 ноября 2023 г.

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на Межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные вопросы урологии» (Нижний Новгород, 16.10.2019; 13.10.22); Online мероприятиях цикла «Прием уролога. Вопросы и ответы» (Нижний Новгород, 27.08.20); XVII Всероссийской научно-практической конференции им. А.Ю. Барышникова с международным участием (Москва, 20-21.04.23); Форуме РОУ «Научные аспекты урологической практики» (Нижний Новгород, 27.10.23).

### **Публикации**

Основные результаты диссертации опубликованы в 8 печатных работах, в том числе 2 статьи в научных журналах, которые включены в перечень рецензируемых периодических научных изданий, рекомендованных ВАК РФ, и 6 публикаций в материалах международных конгрессов и конференций.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертационная работа имеет традиционное построение, изложена на русском языке на 149 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, 3 разделов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка использованной литературы. Работа иллюстрирована 8 таблицами и 42 рисунками. Список использованной литературы содержит 164 научных публикаций, из которых 26 изложены кириллицей и 138 – латиницей, и занимает 21 страницу.

## ГЛАВА 1

### ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

#### 1.1. Современные методы диагностики рака и доброкачественных опухолей предстательной железы

В настоящее время отмечается рост заболеваемости раком предстательной железы мужчин сравнительно молодого и работоспособного возраста. Часто выявляемые случаи бессимптомного течения заболевания, особенно на ранних стадиях, требуют поиска новых и совершенствования существующих скрининговых подходов к раннему выявлению заболевания [19, 83].

Пальцевое ректальное исследование (ПРИ) остается до сих пор одним из важных методов диагностики рака предстательной железы (РПЖ) и доброкачественной гиперплазии предстательной железы (ДГПЖ). Однако специфичность в отношении выявления РПЖ невелика, заболевание обнаруживается только у 26 – 34% мужчин с аномальными результатами ПРИ [17].

Еще одним методом, по-прежнему используемым в качестве скринингового для выявления РПЖ, является определение уровня сывороточного PSA. Условно верхней границей нормы PSA принято считать 4,0 нг/мл, а средним нормальным уровнем PSA считают 2,5 нг/мл [19]. Это достаточно чувствительный, но относительно неспецифичный и неточный биомаркер для скрининга, поскольку и доброкачественные, и злокачественные процессы в предстательной железе (ПЖ) сопровождаются увеличением PSA. Инфекция, травма, воспаление ПЖ также способны повлиять на уровень PSA [144]. Показано, что определение PSA намного превосходит ПРИ и трансректальное ультразвуковое исследование простаты

(ТРУЗИ) для выявления раннего РПЖ. При РПЖ к росту уровня PSA, более 4 нг/мл в сыворотке крови приближается по специфичности к 91%, а аномальные данные ПРИ выявляются всего 59% случаев [95]. Поскольку у подавляющего большинства мужчин с ранним РПЖ клинические симптомы заболевания отсутствуют, повышение уровня PSA является наиболее частым отклонением, определяемым в лабораторных анализах пациентов [19, 83, 112]. По данным [66] скрининговое тестирование уровня PSA значительно превосходит ПРИ, при этом уровень смертности от РПЖ уменьшается на 45 – 70%. В исследовании [32] с участием более 400 000 пациентов, показано, что в возрастном диапазоне 55 – 75 лет ежегодный скрининг с определением уровня PSA уменьшает смертность от РПЖ на 64% (95% доверительный интервал 50 – 78%,  $p < 0,001$ ) и в целом, смертность на 24% (95% доверительный интервал 15 – 34%,  $p < 0,001$ ). Согласно исследованию Roberts M.J. et al. среди 2950 мужчин с PSA менее 4,0 нг/мл, распространенность РПЖ составила только 15,2% [123]. Однако до 86% людей с ДППЖ также могут иметь повышенный уровень ПСА в сыворотке крови [139]. В существующих руководствах содержится ряд рекомендаций и ограничений по использованию данного теста у мужчин разного возраста [83].

Биопсию ПЖ обычно выполняют для уточнения гистологического типа новообразования у лиц с высоким уровнем PSA или выявлением опухоли при выполнении ПРИ. Наиболее распространенным подходом является трансректальная биопсия простаты под ультразвуковым контролем (ТРУЗИ) [123]. Чувствительность, специфичность, точность ТРУЗИ составили 76%, 59% и 72% соответственно. Предсказуемость положительного и отрицательного тестов – 67% и 61% [25]. Однако сложность выявления клинически значимых опухолей ПЖ при ТРУЗИ связана с изоэхогенностью большинства новообразований и их мультифокальной локализацией, что обуславливает необходимость проведения оптимального количества и выбора локализации пункционных вколов при выполнении исследования [19, 83, 78].

В последнее время внимание исследователей все чаще привлекают возможности использования жидкостной биопсии (ЖБ) в качестве минимально инвазивного диагностического метода [82]. В широком смысле, тесты ЖБ включают анализ крови, мочи или спермы пациента на наличие опухолевого материала либо в корпускулярной форме, в виде циркулирующих опухолевых клеток и внеклеточных везикул, либо в молекулярной форме, такой как циркулирующая опухолевая ДНК и РНК.

Показано, что использование ЖБ позволяет избежать в 26% наблюдений ненужных биопсий с отрицательной прогностической ценностью [104]. Однако при использовании данного метода в клинической практике остается много нерешенных вопросов, включая возможность гипердиагностики заболевания [111 – 114].

К новым методам лучевой диагностики новообразований предстательной железы относится мультипараметрическое МРТ-сканирование (мпМРТ). Основными показаниями к его выполнению является случаи отрицательных результатов биопсии в анамнезе или повышение уровня ПСА [60]. МпМРТ может дополнять стандартное клиническое обследование, но не информативно при небольших по размеру опухолях и в тех случаях, когда незначительно изменяется плотность ткани новообразования. Выполнение мпМРТ позволяет избежать ненужных биопсий ПЖ в 27% случаев.

Судить о жесткости тканей ПЖ в реальном режиме времени позволяет эластография. Этот метод визуализации менее субъективен, чем ПРИ, и облегчает выполнение целевой биопсии при подозрении на новообразования, особенно те, что расположены в передней части ПЖ и недоступны при пальпации [19, 83]. Кроме того, диапазон исследуемой области позволяет исследовать весь объем предстательной железы. Согласно исследованию [154] у больных РПЖ по сравнению с пациентами, страдающими ДГПЖ, были выявлены более высокие значения максимальной ( $p < 0,05$ ) и средней эластичности ( $p < 0,05$ ) ткани ПЖ, причем максимальная эластичность

положительно коррелировала с оценкой опухоли по шкале Глисона у пациентов с РПЖ. К ограничениям метода относится зависимость качества визуализации деформации тканей от навыков специалиста, проводящего исследование, размера очага поражения (>5 мм) и локального распространения рака, включая инфильтрацию за пределы капсулы предстательной железы [165].

Оценка риска развития РПЖ должна основываться на использовании комбинации ПРИ, исследовании уровня ПСА, биопсии ПЖ и методов визуализации [83]. Подход, основанный на использовании нескольких методов диагностики, представлен и в рекомендациях Российского общества онкологов [8]. В литературе возможность прогнозирования развития опухоли в ПЖ рассматривается также на основе анализа экспрессии некоторых генов, показавших свое значение в отношении прогноза стадии pT после выполнения радикальной простатэктомии: *GOLM1*, *GBX2*, *XPO6*, *SSTR1*, *TOP2A* и *CDCA5* [21]. По мнению авторов, предложенная ими прогностическая модель обладает точностью 75% в отношении определения pT-стадии РПЖ при локализованном заболевании. Однако нужны дальнейшие исследования, чтобы внедрять данный подход в широкую клиническую практику.

Таким образом, существующие методы диагностики рака предстательной железы имеют ряд ограничений, что обуславливает необходимость проведения дальнейших исследований, направленных на диагностику опухолей простаты.

## **1.2. Прогнозирование течения и оценка эффективности терапии рака предстательной железы**

На данный момент времени существует несколько подходов к оценке прогноза РПЖ, ни один из которых нельзя назвать действительно комплексным из-за малого количества оцениваемых параметров. Некоторые

авторы изучали взаимосвязь между уровнями циркулирующего тестостерона (ТС), агрессивностью РПЖ и прогнозом заболевания. Так, по данным [52] на ранних стадиях РПЖ уровень тестостерона в сыворотке не имеет прогностического значения для общей выживаемости пациентов (ОР=1,03; 95% ДИ, 0,99 – 1,08;  $p=0,19$ ) и вероятности развития биохимического рецидива (ОР=0,99; 95% ДИ, 0,87 – 1,13;  $p=0,93$ ). При распространенном РПЖ более высокие уровни ТС до начала андроген депривационной терапии (АДТ) связаны со снижением риска смерти от РПЖ (ОР=0,58; 95% ДИ, 0,45 – 0,74;  $p < 0,0001$ ). Во время проведения АДТ более низкие уровни ТС были связаны со снижением риска смерти (ОР=0,48; 95% ДИ, 0,28 – 0,81;  $p=0,006$ ) и прогрессирования РПЖ (ОР=0,59; 95% ДИ, 0,46 – 0,77;  $p < 0,0001$ ). У пациентов с резистентным к кастрации РПЖ более высокие уровни ТС предсказывали снижение риска прогрессирования заболевания (ОР=0,33; 95% ДИ, 0,11 – 0,97;  $p=0,04$ ), но не смерти (ОР=0,86; 95% ДИ, 0,69 – 1,07 ;  $p=0,18$ ).

К. Ando et al. считают, что высокий уровень ТС в сыворотке связан с появлением висцеральных метастазов, большим объемом ПЖ и высоким уровнем ПСА. На основании трех прогностических факторов (высокий ТС, большой объем ПЖ, высокий уровень PSA) авторы предлагают классифицировать РПЖ на группы с разным уровнем риска. Согласно этой классификации группа больных высокого риска (3 фактора риска) показывает значительно меньшую общую выживаемость по сравнению с группами умеренного риска (2 фактора риска) и низкого риска (0-1 фактор риска) ( $p < 0,0001$ ). По мнению исследователей, высокий уровень ТС в сыворотке крови ( $\geq 13$  нг/дл) является значимым прогностическим фактором у пациентов с резистентным к кастрации РПЖ, получающих терапию доцетакселом [33].

Согласно исследованию N. Miura et al., более высокие уровни ТС достоверно связаны с лучшей общей выживаемостью (ОВ) больных (объединенный ОР=0,74, 95% ДИ 0,58 – 0,95) и лучшей выживаемостью без

прогрессирования (объединенный ОР=0,51, 95% ДИ 0,30 – 0,87). Анализ подгрупп, основанный на типе лечения, показал, что более низкие уровни ТС – плохой прогностический фактор для ОВ у пациентов, получавших гормонотерапию, но не у тех, кто получал химиотерапию, что позволяет осуществлять на основании определения уровня ТС в крови пациентов выбор для них определенного метода лечения [109].

Для оценки прогноза заболевания продолжают использоваться и классические гистологические методы оценки, такие как классификация Tumor Node Metastasis (TNM) и шкала Глисона, их комбинируют для более точного прогноза течения заболевания. Патологическая стадия РПЖ по системе TNM определяется после простатэктомии и зависит от таких факторов, как опухолевая нагрузка, состояние хирургических краев, экстракапсулярное заболевание, поражение семенных пузырьков и тазовых лимфатических узлов. Она соответствует распространенности заболевания и позволяет лучше прогнозировать его исходы [19]. Патоморфологическая оценка биопсийного образца позволяет определить сумму баллов по шкале Глисона, показывающую агрессивность РПЖ [4, 46].

Исследование уровня PSA в сыворотке крови больных может использоваться для выявления рецидивов и метастазов опухоли, прогнозирования течения злокачественного процесса, а также контроля за эффективностью проводимого лечения [21]. Повышение PSA в сыворотке крови на 8–18 недель предшествует клиническому выявлению прогрессирования заболевания, а понижение уровня PSA, определяемое в процессе противоопухолевого лечения, свидетельствует о его терапевтическом эффекте. Выявлена обратная зависимость между средним уровнем PSA и степенью дифференцировки опухоли и прямая зависимость этого показателя от стадии заболевания при PSA-продуцирующих опухолях. Большую ценность имеет анализ динамики концентрации PSA во времени (удвоение уровня PSA). Скорость удвоения PSA может рассматриваться в качестве критерия степени агрессивности РПЖ. Для прогнозирования

вероятности развития метастазов РПЖ времени удвоения уровня PSA учитывается совместно со степенью злокачественности опухоли (баллы по Глиссону) и временем проявления лабораторных маркеров рецидива [83].

В литературе для выбора тактики лечения рака простаты высокого и крайне высокого рисков рассматривается возможность использования таких показателей, как плотность PSA, доля свободного PSA к общему PSA, скорость нарастания уровня PSA за год, анализ содержания proPSA [19]. Простым и часто применяемым методом прогнозирования является определения индекса здоровья простаты (показателя PHI) – анализа крови, объединяющего свободный PSA, общий PSA и 2 proPSA, с выраженной специфичностью для клинически значимого РПЖ [98]. Определение индекса PHI помогает дифференцировать ДГПЖ и РПЖ у пациентов в диапазоне общего PSA 2 – 10 нг/мл и отрицательном («нормальном») результате ПРИ [8]. По данным национальной комплексной онкологической сети (NCCN), индекс PHI выше 35 связан с высокой вероятностью развития РПЖ [72]. В исследовании Claps M. et al., 2019 показано, что использование показателя PHI может помочь выявить пациентов высокого риска РПЖ и значительно уменьшить количество ненужных биопсий железы для диагностики РПЖ. Показана корреляция величины PHI со степенью злокачественности (агрессивности) РПЖ по шкале Глиссон [52].

Для дифференциальной диагностики РПЖ и ДГПЖ было предложено также использовать метод бинарной логистической регрессии у пациентов с подозрением на РПЖ [9]. Показано, что этот метод обладает высокой специфичностью (97,5%) и позволяет на основе математического анализа клинических признаков заболевания отобрать пациентов для выполнения биопсии ПЖ и тем самым снизить частоту напрасных биопсий, а также определить группы больных с высоким или низким риском развития РПЖ.

Таким образом, прогнозирование течения рака предстательной железы остается нерешенной задачей, требующей поиска новых маркеров,

отражающих биологические особенности опухолевого роста новообразований простаты.

### **1.3. Новые биомаркеры рака предстательной железы**

С целью улучшения диагностики и оценки риска развития РПЖ, а также решения вопросов персонализации лечения пациентов рассматривается возможность использования новых молекулярных маркеров сыворотки (PSA, PHI, 4Kscore®), мочи (Progenesa®, SelectMDx®, MiPS) и тканевых маркеров (Ki-67, Prolaris®, ConfirmMDx®, Oncotype Dx®, Decipher®, Promark®). Предполагается их использование совместно с клиническими и гистопатологическими характеристиками, а также данными визуализационной диагностики для изучения особенностей течения РПЖ [45,90].

Например, тест Oncotype Genomic Prostate Score DX (GPS) – геномный тест на основе биопсии, который измеряет экспрессию мРНК 17 генов, ответственных за рост и выживание опухолевых клеток. Этот анализ был апробирован у 4500 пациентов [158]. На этапе разработки этого теста использовались анализы на основе ПЦР с обратной транскрипцией образцов, полученных в ходе радикальной простатэктомии от 441 пациента с низким и средним риском развития РПЖ. Из 732 выбранных генов, 288 предсказывали клинический рецидив (локальный рецидив или отдаленный метастаз) и 198 генов были связаны с агрессивным течением заболевания после коррективки на PSA, балльную оценку Глисона и клиническую стадию. За этим последовало определение прогностической сигнатуры экспрессии 17 генов GPS. В валидационном исследовании, основанном на материале 395 тонкоигольных биопсий от пациентов, находящихся под активным наблюдением, использование теста GPS позволило предсказать высокую степень риска развития РПЖ (отношение шансов (ОШ) на 20 единиц GPS: 2,3;  $p < 0,001$ ) и распространенную стадию заболевания (ОШ на 20 единиц GPS: 1,9;  $p = 0,003$ ).

Тест Decipher также является геномным тестом, который измеряет уровни экспрессии РНК 22 различных генов. Эти гены были отобраны на основе уникальных паттернов дифференциальной экспрессии для 192 случаев метастазирования РПЖ (в течение 5 лет после повышения ПСА) по сравнению с 271 контролем в ретроспективном исследовании «случай-контроль» [86]. Тест Decipher позволяет вычислить вероятность клинического метастазирования в течение 5 лет после радикальной простатэктомии (РП) и 10-летнюю смертность от РПЖ у мужчин с патологией высокого риска (низкодифференцированным РПЖ) или клиническими признаками высокого риска (рецидив, метастазирование) после РП. Тест показал высокое различие в прогнозировании клинического метастазирования (площадь под кривой (ППК) 0,75 – 0,83) и смертности от рака (ППК 0,78) в валидационных исследованиях, которые значительно превосходили доступные клиничко-патологические характеристики (ППК 0,69) [110]. Тест Decipher также оказался единственным независимым предиктором клинического метастазирования у пациентов с биохимическим рецидивом после операции [124].

МикроРНК (miR) – класс малых некодирующих одноцепочечных РНК длиной около 23 нуклеотидов, которые комплементарны 3' - нетранслируемой области (3' UTR) гена-мишени, вызывающий деградацию мРНК или ингибирование трансляции [37]. Установлено, что циркулирующие miR обладают высокой стабильностью и могут быть использованы в качестве биомаркеров для улучшения диагностики и лечения заболеваний [30], в том числе РПЖ [67]. Различная экспрессия miR-424 и miR-572 может быть использована в качестве новых биомаркеров для прогнозирования прогрессии РПЖ [140]. Показано, что miR-141, miR - 205, miR-484 и miR-1825 являются высокоспецифичными для РПЖ, в частности, miR-205 может быть использована в качестве биомаркера костных метастазов РПЖ, а miR-1825 может помочь в классификации метастазов лимфатических узлов, оценке терапевтических эффектов и прогноза [77].

Описано существование синергизма при лечении препаратами miR-23b, miR-27b и флутамидом, что увеличивает скорость апоптоза и снижения экспрессии CCNG1 в кастрированных и резистентных к лекарственным препаратам клетках РПЖ [119].

РПЖа-3 – молекулярный маркер, одобренный FDA для обнаружения РПЖ [54]. РПЖа-3 – это длинная некодирующая простатспецифическая РНК, которая высоко экспрессируется при новообразованиях ПЖ, но не при доброкачественных заболеваниях – ДППЖ, простатите и простатической интраэпителиальной неоплазии [62]. РПЖа-3 участвует в контроле выживаемости клеток РПЖ, регулируя рецептор андрогена (РА) и маркеры эпителиально-мезенхимального перехода [96]. Анализ РПЖа-3 (отношение транскрипции РПЖа-3 к транскрипции PSA) может дополнить результаты анализа сывороточного PSA и другую клиническую информацию, для принятия решения о необходимости повторной биопсии у мужчин старше 50 лет [76]. Оценка РПЖа-3 <25 указывает на низкий риск РПЖ, а более высокая оценка РПЖа-3 – на повышенную вероятность выявления РПЖ после выполнения биопсии опухоли. Специфичность метода – 71%, чувствительность – 68% [56].

Циркулярные РНК (цРНК, circ) – эндогенные РНК, образованные обратным сплайсингом пре-мРНК. Связываясь с miR, цРНК способны разблокировать ингибирование miR своих целевых генов и увеличить их экспрессию. Показано, что circ-102004 имеют высокую экспрессию в образцах опухолевой ткани пациентов с РПЖ и играют канцерогенную роль в развитии опухоли, стимулируя инвазию раковых клеток [137]. Повышенная регуляция circMYLK способствует пролиферации клеток РПЖ, инвазии и миграции [55]. Circ-SMARCA5- играет онкогенную роль в РПЖ, стимулирует клеточный цикл и ингибирует клеточный апоптоз [91].

Таким образом, внедрение новых молекулярных методов диагностики рака предстательной железы расширяет возможности выявления заболеваний

предстательной железы, однако не используется широко в клинической практике вследствие сложности выполнения представленных методов.

#### **1.4. Иммунологические нарушения у больных раком предстательной железы**

Высказанное ранее предположение о том, что иммунный статус пациента может коррелировать с риском развития РПЖ не нашло обоснования в большинстве ранее проведенных исследований [22]. Однако в работе N. Murrayetal показано, что снижение абсолютного количества лимфоцитов является важным прогностическим фактором течения болезни после выполнения РП, может выявляться за 18 месяцев до рецидива заболевания, сопровождаться появлением в крови циркулирующих опухолевых клеток и является фактором риска неэффективности лечения [43]. По мнению у пациентов с метастатическим кастрационно-резистентным раком простаты имеет место взаимосвязь между наличием циркулирующих клеток РПЖ и иммунной дисфункцией, что связано с худшим прогнозом заболевания [50]. Согласно исследованию, у большинства пациентов с раком простаты наблюдалось иммунологическая несостоятельность (89,8%), повышенная экспрессия антигена, ассоциированного с Т-лимфоцитами (CTLA-4) (58,8%), нарушения презентации антигена и повышенный уровень экспрессии рецептора-ловушки 3 (DcR3) (51,6%), причем в 11,4% случаев имеет место комбинация механизмов уклонения опухоли от иммунного ответа [43].

При появлении первичных опухолей супрессия иммунного ответа может быть частично обусловлена их инфильтрацией регуляторными Т-клетками (Treg), которые играют важную роль во многих иммунологических процессах, в том числе снижают противоопухолевый иммунитет и иммунитет к инфекциям [58]. Оценена распространенность популяций Treg в стромальных и эпителиальных компартментах нормальной,

постатрофической гиперплазии, простатической интраэпителиальной неоплазии (ПИН) и опухолевых тканях у мужчин с РПЖ и без него. Показано, что в случаях РПЖ повышенное количество эпителиальных CD4<sup>+</sup>Treg в нормальной ткани ПЖ ассоциировано с оценкой опухоли по шкале Глисона и со стадией РПЖ.

Выявлено значительное (в 4 раза) возрастание риска РПЖ у мужчин с повышением CD4<sup>+</sup>Treg в нормальной ткани ПЖ [16]. У мужчин с большим числом M2-макрофагов в опухолевой ткани предстательной железы увеличивается возможность летального исхода от РПЖ, причем обуславливать иммуносупрессию у этих больных могут M2-макрофаги и Treg [65]. Накопленные данные о роли Treg при РПЖ свидетельствуют, что эти клетки проникают в опухолевую ткань ПЖ, подавляют противоопухолевый иммунный ответ, обуславливая агрессивное течение заболевания и низкую выживаемость [64]. Причем каждая дополнительная CD4<sup>+</sup>Treg-клетка способствует повышению смертности от рака простаты на 12%, независимо от других клинических факторов [65]. Повышенное внутриопухолевое количество Treg у больных РПЖ указывает на плохой прогноз заболевания и низкую выживаемость пациентов [87].

Показано, что даже у пациентов с хорошими прогностическими критериями (опухоли T1 или T2, низкие уровни PSA до лечения, низкие показатели Глисона, отсутствие лимфатических узлов или отдаленных метастазов) до начала противоопухолевого лечения наблюдается снижение пула CD4<sup>+</sup> T-клеток и изменение их жизнеспособности (повышение экспрессии CD39 на CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>17 клетках и компенсаторное увеличение их пролиферативной способности), значительное снижение общего количества NK-клеток и перераспределение циркулирующих NK-клеток в пользу менее функциональной анергической субпопуляции, увеличение фракции Treg-клеток и фракции лимфоидных дендритных клеток. По мнению авторов, все эти факторы свидетельствуют о наличии системного подавления иммунного ответа у больных РПЖ. Отмечено, что доля Treg с эффективным

иммуносупрессивным фенотипом была выше у пациентов с РПЖ по сравнению со здоровыми людьми [36].

Сходные данные приводятся в исследовании [73]. Показано относительное обогащение ткани ПЖ и периферической крови Tregs у пациентов с РПЖ по сравнению со здоровыми донорами, а также значимая связь между количеством Treg и плохим прогнозом при РПЖ. Авторы отмечают, что уровень Treg снижается после андрогенной абляции и повышается в периферической крови пациентов с метастатическим кастрационно-резистентным раком предстательной железы (мКРРПЖ). Механизмы подавления, опосредованные Treg, включают CTLA-4, лиганд программируемой смерти (PD-L)-1, ген активации лимфоцитов (LAG-3), нейропилин (Nrp)-1, и экспрессию CD39/73 [68].

Напротив, наблюдалась стимуляция иммунного ответа при РПЖ, о чем также свидетельствуют гистологические данные, показывающие наличие CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, NK-клеток, дендритных клеток и макрофагов в опухолях. Вероятно, прогрессирование РПЖ связано с изменениями клеточно-опосредованного иммунитета, а плотная инфильтрация лимфоцитов в опухоли коррелирует с более длительной выживаемостью пациентов [136]. Аденокарциномы предстательной железы высокой степени злокачественности имеют значительно меньшую инфильтрацию Т-клетками и макрофагами по сравнению с ДГПЖ [131].

На основании алгоритма не негативной матричной факторизации (non-negative matrix factorization – NMF) предложена иммуногеномная система классификации РПЖ и определены субиммунофенотипы РПЖ. Авторы выделили иммунный тип опухолей (40,4%), который характеризуется высоким обогащением Т-клеток, В-клеток, NK-клеток, макрофагов, и подразделяется на иммунно-активированные и иммунно-ингибированные подтипы, определяемые статусом активации *WNT/TGF-β*, *TGF-β1* и сигнатур *C-ECM*, и неиммунный тип. По мнению исследователей к подгруппе с активированным иммунитетом принадлежат 14,9% – 24,3% больных, у

которых имеют место благоприятные результаты безрецидивной выживаемости и потенциальные лечебные эффекты в ответ на терапию иммуноонкологическими препаратами [105].

В исследованиях, связанных с изучением состава и функциональной активности субпопуляций лимфоцитов периферической крови, показано, что в предоперационном периоде состояние иммуносупрессии у больных РПЖ характеризуется снижением функциональной активности нейтрофилов, повышением в циркуляции субпопуляции моноцитов  $CD14^+CD16^+$ , снижением выработки лимфоцитами интерлейкина (IL-2), интерферона гамма и некоторым повышением концентрации IL-10 [2]. По данным [6] у больных с локализованными формами РПЖ выявлено значительное снижение абсолютного количества Т-лимфоцитов ( $CD3^+$ ,  $CD5^+$ ,  $CD7^+$ ) и их субпопуляций  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ,  $CD38^+$ , В-лимфоцитов ( $CD22^+$ ,  $HLA-DR^+$ ), а также  $CD50^+$ ,  $CD45^+$ ,  $HLA-I^+$  клеток, что, возможно, свидетельствует о нарушениях дифференцировки лимфоидных клеток на уровне ранних предшественников. В случаях диссеминации опухоли, по сравнению с локализованной формой РПЖ, еще более снижается уровень  $CD45^+$ ,  $CD38^+$  клеток, что указывает на нарушение межклеточных взаимодействий. В исследовании отмечено значимое увеличение числа  $CD8^+$  клеток у больных РПЖ, по сравнению с пациентами с ДППЖ. Одновременно у лиц, страдающих РПЖ, имеет место снижение числа  $CD4^+$  клеток [15].

Таким образом, в большинстве проведенных исследований описано ингибирование иммунного ответа в ткани предстательной железы и периферической крови больных, причем подобные нарушения наблюдаются у большинства обследованных пациентов. Получены данные о том, что подавлению противоопухолевого иммунного ответа могут способствовать регуляторные Т-клетки, а повышенное количество этих клеток у пациентов с раком предстательной железы является предиктором его агрессивного течения и уменьшения выживаемости.

### 1.5. Роль генов *FOXP3* и *IL-10* при опухолевом росте

Белки Forkhead box (FOX) образуют большое семейство факторов транскрипции (TF). У людей идентифицированы пятьдесят различных белков FOX, которые разделены на 19 подсемейств (от *FOXA* до *FOXJ*) на основе гомологии их белковых последовательностей [94]. Семейство белков FOX играет важную роль в течение различных биологических процессов – клеточной пролиферации, дифференцировки, миграции, инвазии, апоптозе клеток, репарации повреждений ДНК. Семейство белков FOX дифференцированно представлено при РПЖ, а нарушение регуляции некоторых белков FOX вносит вклад в патогенез рака простаты [102]. В ранее проведенных исследованиях показано, что каждый ген *FOXP* выполняет свою функцию при РПЖ. Отмечено, что *FOXP2* играет роль онкогена [145, 101], причем активация *FOXP2* связана с плохим прогнозом заболевания. Напротив *FOXP1*, *FOXP3* и *FOXP4* действуют как супрессоры опухоли, например [145] *FOXP1* ингибирует клеточную пролиферацию и миграцию клеток, а уменьшение его экспрессии в образцах опухолевой ткани связано с неблагоприятным прогнозом заболевания. Нуклеотидные полиморфизмы (SNP) в генах *FOXP3* (rs3761548) и *FOXP4* (rs1983891) могут быть связаны с предрасположенностью к РПЖ [101, 49]. Стабильная экспрессия гена *FOXP3* или отсутствие таковой в нормальных условиях или при воспалении – важные детерминанты иммунного равновесия [18].

Известно, что *FOXP3* располагается внутриклеточно и является главным регулирующим геном для развития и функционирования Treg, а также наиболее точным маркером для их идентификации. *FOXP3* также препятствует дифференцировке предшественников Treg в эффекторные T-клетки. Уровень продукции *FOXP3* в Treg очень важен для выполнения супрессорной функции, поскольку искусственное снижение экспрессии *FOXP3* негативно влияет на нее, причем *FOXP3*<sup>+</sup> Treg клетки в основном

проявляют свою супрессивную активность посредством синтеза IL-10 и TGF- $\beta$  [41]. В отсутствие *FOXP3* большое число предшественников аутореактивных клеток, которые в норме становятся Treg, не элиминируются и не претерпевают функциональную инактивацию, а превращаются в активированные эффекторные Т-клетки, которые участвуют в развитии связанного с нежелательным иммунным ответом воспаления. Согласно экспериментальным данным, потеря *FOXP3* происходит в Treg под действием TNF- $\gamma$ , IL-6 или OX40 [80]. Изменять экспрессию *FOXP3* могут некоторые цитокины, секретируемые опухолями предстательной железы, например TGF- $\beta$  [4]. Однако могут существовать и независимые от *FOXP3* модули транскрипционной программы Treg [18,26], в реализации биологических эффектов которых также важную роль играет IL-10. Прямыми мишенями действия *FOXP3* является многочисленная группа сиквенс-специфических факторов транскрипции и микроРНК, участвующих в функционировании Treg и отвечающих за контроль уровня различных мРНК и белков в Treg [18].

Кроме РПЖ, повышенная экспрессия *FOXP3* отмечена у больных раком молочной железы (РМЖ) [26] и является маркером более высокой активности Treg клеток у этих пациенток, что может играть важную роль в формировании и развитии опухоли, соответственно и влиять на прогноз заболевания [89]. Судить об уровне экспрессии *FOXP3* можно на основании определения мРНК *FOXP3* в крови и/или опухолевой ткани больных [87]. Описано повышение экспрессии мРНК *FOXP3* у больных грибовидным микозом (первичной эпидермотропной Т-клеточной лимфомой кожи) [14], РМЖ [13], колоректальным раком [4].

Интерлейкин-10 (ИЛ-10) – противовоспалительный цитокин, в основном продуцируемый моноцитами и в меньшем количестве лимфоцитами, такими как CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клетки, макрофаги и дендритные клетки [128]. Он подавляет продукцию цитокинов клетками Th1, усиливает пролиферацию В-клеток, тимоцитов и тучных клеток, а также стимулирует

выработку антител [160]. Цитокин IL-10 у человека кодируется геном интерлейкина-10, который расположен на хромосоме 1 (1q31-32) и содержит 5 экзонов. В литературе представлены исследования, связанные с оценкой полиморфизма гена *IL-10* при различных типах рака, например РМЖ [99], шейки матки [57, 118], яичников [5] и некоторых других опухолях. Вероятно, *IL-10* может стимулировать развитие опухоли, так как он подавляет противоопухолевый иммунный ответ [128]. Однако значение полиморфизма *IL-10* в отношении развития солидных опухолей является спорным, поскольку он обладает не только иммуносупрессивными, но и антиангиогенными свойствами, угнетая рост и метастазирование новообразования и, следовательно, оказывая противоопухолевое действие. Возможно, преобладание определенных про- или анти-туморогенных эффектов этого цитокина связано с различной архитектурой межклеточного матрикса и тканевого микроокружения опухоли. Остается неясной роль *IL-10* в предрасположенности к РПЖ и ДГПЖ и патогенезе заболеваний.

Оценка экспрессии цитокина IL10 иммуногистохимическим методом показала, что в 62,3% экспрессия IL10 выше ( $p < 0,001$ ) в опухолевой ткани карциномы предстательной железы, чем в ткани доброкачественной гиперплазии предстательной железы (23,7%). Причем, экспрессия цитокина IL-10 более высока у лиц с опухолями G3, высоким коэффициентом Глисона и при более распространенном опухолевом процессе, что, возможно, указывает на роль IL-10 в качестве маркеров опухолевой прогрессии при карциноме предстательной железы. Однако существование умеренной положительной корреляции между уровнем IL-10 и развитием ДГПЖ указывает, по мнению авторов, на определенную роль этого цитокина в патогенезе ДГПЖ [35]. Сходные данные приводятся в исследовании [31], где наиболее высокие уровни IL-10 были зарегистрированы у пациентов с опухолями G3 и коэффициентом Глисона 8 и более. Напротив, в работе [15]

отмечено преимущественное повышение уровня IL-10 в крови больных ДГПЖ.

Увеличение содержания IL-10 в крови и опухолевых тканях пациентов с различной патологией (раке яичников, легкого, ободочной кишки) по мнению некоторых исследователей [115] связано с тем, что возможным его источником являются сами опухолевые клетки. Возможно, IL-10 принимает участие в реализации механизмов ускользания опухоли от иммунного надзора. Например, выявлено существование положительной корреляции между уровнем IL-10 и содержанием раково-эмбрионального антигена (РЕА) (онкомаркером, косвенно указывающим на распространенность опухолевого процесса) у больных колоректальным раком [27]. Отмечено, что пациенты с факторами неблагоприятного прогноза заболевания (опухоль T3 или T4, G3, более четырех пораженных лимфатических узлов, уровень РЕА > 5 пг/мл) имели более высокий уровень IL-10, чем пациенты с благоприятным прогнозом. Показана ассоциация с плохим прогнозом высокого уровня IL-10 у больных раком шейки матки [152] и раком яичников [163].

Обладая ауторегуляторной активностью IL-10 способен ингибировать синтез мРНК *IL-10*. Высокая экспрессия мРНК *IL-10* также тесно коррелирует с плохим прогнозом заболевания при некоторых солидных опухолях, например при РМЖ, повышение уровня мРНК *IL-10* наблюдается преимущественно у женщин с отрицательным статусом рецепторов эстрогена или рецепторов прогестерона, при большей распространенности опухолевого процесса [10]. В доступной литературе мы не встретили исследований, посвященных изучению уровня мРНК *IL-10* в крови и тканях больных РПЖ и ДГПЖ.

Таким образом, несмотря на значительные возможности диагностики рака предстательной железы и доброкачественной гиперплазии простаты не выявлено надежных маркеров раннего выявления этой патологии, позволяющих дифференцировать опухолевые изменения предстательной железы. Изучение возможностей тестирования мРНК *FOXP3* и мРНК *IL-10* в

крови и тканях больных с наличием различных клинико-морфологических факторов, характеризующих течение заболевания, представляется весьма перспективным подходом для понимания особенностей опухолевого роста, характеризующих ту или иную патологию.

## ГЛАВА 2

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

#### 2.1. Материалы исследований

Материалом исследований служили образцы крови и опухолевой ткани 115 больных с опухолями предстательной железы (ПЖ), из них у 63 человек (54,8%) гистологически подтвержден рак предстательной железы (РПЖ) и у 52 пациентов (45,2%) – доброкачественная гиперплазия предстательной железы (ДГПЖ). Биологический материал был предоставлен «Нижегородским областным клиническим онкологическим диспансером». Возраст больных составлял в обеих подгруппах 56 – 82 года. В качестве контроля для сравнения полученных результатов использовали периферическую кровь от 35 доноров, прошедших медицинское обследование и сдавших собственную кровь в «Нижегородский областной центр крови имени Н.Я. Климовой», что позволило охарактеризовать группу как «здоровые лица». От каждого участника получено информированное согласие на включение в исследование. Исследование проводилось согласно этическим принципам, установленным Хельсинской декларацией (принятой в июне 1964 г. (Хельсинки, Финляндия) и пересмотренной в октябре 2013 г. (Форталеза, Бразилия)

У больных РПЖ на основании клинико-инструментального обследования и данных постхирургической классификации РПЖ была диагностирована II стадия в 54,0% (34/63), III стадия – у 36,5% (23/63). У 9,5% больных (6/63) имела место IV стадия РПЖ. Все пациенты с РПЖ и ДГПЖ впервые поступили и ранее не получали противоопухолевое лечение.

У больных РПЖ было проведено оперативное вмешательство в объеме радикальной простатэктомии (РПЭ) – 66,7% (42/63) случаев,

трансуретральной резекции предстательной железы (ТУР ПЖ) – 19,0% (12/63) или биопсии простаты – 14,3% (9/63). У всех пациентов имела место аденокарцинома предстательной железы. Клиническая характеристика больных РПЖ в зависимости от стадии заболевания представлена в Таблице 2.1.

Таблица 2.1 - Клиническая характеристика больных раком предстательной с учетом стадии заболевания

Показатели	Стадии заболевания		
	II стадия, n=34	III стадия, n=23	IV стадия, n=6
Возраст пациентов:			
до 60 лет	3 (8,8%)	5 (21,8%)	0
61 – 70 лет	8 (23,5%)	4 (17,4%)	3 (50,0%)
71 – 80 лет	11 (32,4%)	10 (43,4%)	3 (50,0%)
старше 80 лет	12 (35,3%)	4 (17,4%)	0
Коэффициент Глисона:			
до 6 баллов	5 (14,7%)	0	0
6 – 7 баллов	24 (70,6%)	16 (69,5%)	3 (50,0%)
более 7 баллов	5 (14,7%)	7 (30,5%)	3 (50,0%)
Уровень простатспецифического антигена (PSA) до операции:			
до 4 нг/мл	6 (17,6%)	0	0
4 – 10 нг/мл	16 (47,1%)	7 (30,5%)	3 (50,0%)
более 10 нг/мл	12 (35,3%)	16 (65,5%)	3 (50,0%)
Уровень тестостерона до операции:			
до 5 ммоль/л	8 (23,5%)	0	0
5 – 15 ммоль/л	26 (76,5%)	20 (87,0%)	3 (50,0%)

более 15 ммоль/л	0	3 (13,0%)	3 (50,0%)
Преимущественная локализация опухоли:			
в левой доле	20 (58,8%)	10 (43,4%)	0
	9 (26,5%)	6 (26,1%)	0
в обеих долях	5 (14,7%)	7 (30,5%)	6 (100%)
Поражение регионарных лимфоузлов:			
есть,	0	5(21,8%)	6 (100%)
нет	34 (100%)	18 (78,2%)	0
Размер опухоли по классификации TNM:			
опухоли, соответствующие T2	34 (100%)	0	3 (50,0%)
опухоли, соответствующие T3	0	23 (100%)	3 (50,0%)
Объем предстательной железы:			
до 25 см <sup>3</sup>	5 (14,7%)	0	0
25 – 50 см <sup>3</sup>	22 (64,7%)	11 (47,8%)	3 (50,0%)
более 50 см <sup>3</sup>	7 (20,6%)	12 (52,2%)	3 (50,0%)
Коэффициент жесткости (КЖ) ткани:			
до 4 Нм	0	0	0
4 – 10 Нм	18 (53,0%)	3 (13,0%)	0
более 10 Нм	16 (47,0%)	20 (87,0%)	6 (100%)

Коэффициент Глисона менее 6 баллов был выявлен у 5/63(7,9%) пациентов, 6 – 7 баллов – у 42/63 (66,7%), более 7 баллов – у 16/63 (25,4%). Уровень PSA до операции менее 4 нг/мл зарегистрирован в 6/63 (9,5%)

случаях, от 4 до 10 нг/мл – в 24/63 (38,1%), более 10 нг/мл – 33/63 (52,4%). Уровень тестостерона до операции составлял до 5 нг/мл у 8/63 пациентов (12,7%), 5 – 15 нг/мл – у 51/63 (81,0%), более 15 нг/мл – у 4/63 (6,3%).

В большинстве случаев опухолевый процесс был локализован в левой доле предстательной железы (ПЖ) 30/63 (47,6%), реже в обеих долях 18/63 (28,6%) или справа 15/63 (23,8%). Поражения регионарных лимфоузлов (ЛУ) не было выявлено у 52/63 пациентов (82,5%), имело место у 11/63 (17,5%). По данным трансуретрального ультразвукового исследования (ТУЗИ), выполненного при поступлении в стационар, объем предстательной железы составлял до 25см<sup>3</sup> у 5/63 больных (7,9%), 25 – 50см<sup>3</sup> – 34/63(54,0%), более 50 см<sup>3</sup> – 24/63 (38,1%). Коэффициент жесткости ткани ПЖ, по данным сонографии, соответствовал 4 – 10 Нм в 33,3% наблюдений (21/63) и был больше 10 Нм в 66,7% (42/63).

У больных ДГПЖ наиболее частым оперативным вмешательством было ТУР ПЖ, выполненное у 38/52 (73,1%), реже выполнялись аденомэктомия – у 8/52 (15,4%) и биопсия простаты – 6/52 (11,5%). Диагноз ДГПЖ во всех случаях был подтвержден гистологически. Клиническая характеристика больных ДГПЖ представлена в Таблице 2.2. Если у больных РПЖ преобладающим до операции был уровень PSA более 10 нг/мл, то у больных ДГПЖ преобладали значения PSA до 4 нг/мл. Уровень тестостерона до хирургического вмешательства при РПЖ и при ДГПЖ чаще всего находился в диапазоне 5 – 15 ммоль/л.

Таблица 2.2 - Клиническая характеристика больных доброкачественной гиперплазией предстательной железы

<b>Показатели</b>	<b>Пациенты, n=52</b>
Возраст больных:	
до 60 лет	15 (28,9%)
61 – 70 лет	23 (44,2%)
71 – 80 лет	14 (26,9%)

старше 80 лет	0
Уровень PSA до операции: до 4 нг/мл 4 – 10 нг/мл более 10 нг/мл	37 (71,2%) 9 (17,3%) 6 (11,5%)
Уровень тестостерона до операции: до 5 ммоль/л 5 – 15 ммоль/л более 15 ммоль/л	10 (19,3%) 36 (69,2%) 6 (11,5%)
Преимущественная локализация опухоли: в левой доле в правой доле в обеих долях	8 (15,4%) 0 44 (84,6%)
Объем предстательной железы: до 25 см <sup>3</sup> 25 – 50 см <sup>3</sup> более 50 см <sup>3</sup>	5 (9,6%) 22 (42,3%) 25 (48,1%)
Коэффициент жесткости ткани предстательной железы: до 4 Нм 4 – 10 Нм более 10 Нм	37 (71,2%) 15 (28,8%) 0
Размер опухолевого узла: до 3,5 см более 3,5 до 5 см более 5 см	31 (59,6%) 15 (28,8%) 6 (11,5%)

Преимущественная локализация опухоли в ПЖ у больных РПЖ соответствовала левой доле, а у пациентов ДППЖ чаще всего в процесс были

вовлечены обе доли ПЖ. Объем железы, по данным ТРУЗИ, в случаях РПЖ, чаще всего находился в пределах 25 – 50 см<sup>3</sup>, а у больных ДГПЖ – более 50 см<sup>3</sup>, что вероятно связано с доброкачественным течением заболевания и более поздним обращением за медицинской помощью. Коэффициент жесткости ткани ПЖ по данным сонографии при РПЖ составлял преимущественно более 10 Нм, а у пациентов, страдающих ДГПЖ, чаще всего не превышал 4 Нм. Выявленные отличия связаны с особенностями течения опухолевого процесса в ПЖ при доброкачественной и злокачественной патологии, а результаты инструментальных исследований позволяют дифференцировать данные заболевания в клинической практике [19].

Сопутствующей патологией в обеих исследованных подгруппах являлись различные заболевания сердечно-сосудистой системы – 86/115 (74,8%), мочевыводящих путей – 79/115 (68,7%), реже встречались патология желудочно-кишечного тракта – 56/115 (48,7%) и бронхо-легочной системы – 46/115 (40,0%). У 82/115 (71,3%) имела место сочетанная патология. В качестве контроля для сравнения полученных результатов использовали периферическую кровь от 35 доноров, сопоставимых по возрасту с обследованными пациентами, прошедших медицинское обследование и сдавших собственную кровь в «Нижегородский областной центр крови имени Н.Я. Климовой», что позволило охарактеризовать группу как «здоровые лица». Таким образом, состав и количество обследованных больных и здоровых лиц, вошедших в контрольную группу, было достаточным для получения достоверных результатов клинических и лабораторных исследований.

От каждого участника получили информированное согласие на включение в исследование. Исследование проводилось согласно этическим принципам, установленным Хельсинской декларацией ( принятой в июне 1964 г. ( Хельсинки, Финляндия) и пересмотренной в октябре 2013 г. (Форталеза, Бразилия)), и Федеральному закону от 05.07.1996 №86-ФЗ (ред.

от 19.07.2011) «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности».

## **2.2. Методы исследования**

### **2.2.1. Клиническое обследование**

Врач начинал клиническое обследование с беседы, во время проведения которой выяснял жалобы пациента, получал анамнестические данные, а также знакомился с медицинской документацией, относящейся к данному пациенту. При проведении соматического обследования использовался системный подход. Оценивалась функциональная активность пациента по шкале Карнавского. Осуществлялась пальпация предстательной железы через прямую кишку, оценка состояния периферических ЛУ, аускультация и перкуссия органов грудной клетки, пальпация и перкуссия органов брюшной полости. Результаты обследования регистрировались в формализованной карте.

### **2.2.2. Инструментальные методы диагностики**

Инструментальные методы диагностики включали ультразвуковое исследование предстательной железы (115/100%), магнитно-резонансную томографию малого таза (100/86,9%), сонографию предстательной железы (115/100%), рентгенографию грудной клетки (115/100,0%), компьютерную томографию (69/60%) и/или ультразвуковое исследование органов брюшной полости (115/100%).

### **2.2.3. Лабораторные методы**

Образцы периферической крови пациентов в объеме 8 мл забирали натощак за 1 день до выполнения оперативного вмешательства. Уровень простат-специфического антигена и тестостерона определяли с использованием наборов реагентов «ОнкоИФА-общий ПСА» и

«СтероидИФА-тестостерон» (АлкорБио, Санкт-Петербург) с помощью анализатора Alisei Q.S. (RadimDiagnostic, Italy). Образцы опухолевой ткани забирали в день выполнения любого вида хирургического вмешательства, помещая их в физиологический раствор, объем ткани для выполнения исследования 3 мм<sup>3</sup>.

### **2.2.3.1. Выделение суммарной фракции нуклеиновых кислот**

Уровень матричной рибонуклеиновой кислоты (мРНК) в периферической крови определяли с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени в соответствии с предложенным ранее методом [113]. Для выделения суммарной фракции нуклеиновых кислот из периферической крови и образцов опухоли использовали коммерческий набор «Рибо-преп» («ИнтерЛабСервис», Россия) согласно рекомендациям производителя.

### **2.2.3.2. Обработка смеси нуклеиновых кислот дезоксирибонуклеазой I (ДНКазой I)**

Перед исследованием уровней мРНК препарат нуклеиновой кислоты обрабатывали ДНКазой I (RNase-free) («Fermentas», EU) до постановки реакции обратной транскрипции согласно рекомендациям производителя. Для этого к 17 мкл препарата нуклеиновой кислоты, разведенного в воде, добавляли 2 мкл реакционного буфера (100 mM Tris-HCl pH 7,5, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>) и 1 мкл (1 ед. ак.) ДНКазы I (RNase-free) («Fermentas», EU). Полученную смесь инкубировали 30 мин при 37°C. Для остановки реакции, в смесь добавляли 2 мкл 50мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты и инкубировали 10 мин при 65°C. Полученный препарат мРНК использовали в реакции обратной транскрипции.

### 2.2.3.3. Реакция обратной транскрипции

К 12 мкл мРНК добавляли 1 мкл (50 нг) статистических затравок, смесь инкубировали 5 мин при 70°C и помещали на лед на 5 мин. К смеси добавляли 6 мкл раствора, содержащего 4 мкл 5×реакционного буфера (250 mM Tris-HCl pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 1 мкл 10 mM смеси динуклеозидтрифосфатов, 1 мкл 0,1 M дитиотриитола, 1 мкл (200 ед. ак.) обратной транскриптазы вируса лейкемии мышей (MMLV ревертаза) («Invitogen», США) и снова инкубировали 30 мин при 37°C. Реакцию останавливали нагреванием до 70°C в течение 10 мин. Полученную комплементарную дезоксирибонуклеиновую кислоту (кДНК) использовали в полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ).

### 2.2.3.4. Полимеразная цепная реакция в реальном времени

В ходе выполнения ПЦР-РВ в пробирку объемом 200 мкл с оптически прозрачной крышкой вносили 23 мкл реакционной смеси содержащей 20 mM Tris-HCl pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM смеси дезоксинуклеотидтрифосфатов, по 10 пг прямого, обратного праймеров и флуоресцентно меченых зондов, для мРНК каждого исследуемого гена и для мРНК гена домашнего хозяйства, 5 ед. ак. полимеразы TaqF («Amplysens», Россия). В качестве гена домашнего хозяйства использовали ген убиквитин-лигазы С (UBC) [28]. Для устранения погрешности, вносимой дозаторами при смешивании микрообъемов, общую смесь готовили из расчета на одну пробу больше, чем необходимо. Первичная структура используемых праймеров и зондов представлена в Таблице 2.3. Олигонуклеотиды синтезировали в ЗАО «Синтол» (Россия).

В реакционную смесь вносили 2 мкл кДНК. Пробирки помещали в амплификатор DTrime5 («ДНК технология», Россия) и инкубировали при следующих температурных условиях: 94°C – 10 мин, 45 циклов амплификации (94°C – 30 с, 55°C – 30 с, 72°C – 30 с).

Уровень мРНК рассчитывали в относительных единицах методом  $\Delta\Delta Ct$  с учетом эффективности реакции, которая определялась методом последовательных разбавлений, относительно генов домашнего хозяйства по формуле  $2\Delta Ct$ .

Таблица 2.3 - Олигонуклеотиды, использованные для определения уровней мРНК исследуемых генов.

Ген	Олиго- нуклеотид	Первичная структура (5' - 3')	Размер (н.о.)
<i>FoxP3</i>	FoxP3 F	GAGAAGCTGAGTGCCATGCA	20
	FoxP3 R	GGAGCCCTTGTCGGATGAT	19
	FoxP3 Z	ROX- TGCCATTTTCCCAGCCAGGTGG- BHQ2	22
<i>IL-10</i>	IL-10 F	GAGATGCCTTCAGCAGAGTGA	21
	IL-10 R	GTCTTCAGGTTCTCCCCCAG	20
	IL-10 Z	ROX- CAACCCAGGTAACCCTTAAAGT CCTCCAGC-BHQ2	30
<i>UBC</i>	UBC F	GCACAGCTAGTTCGTCGCA	20
	UBC R	TGCATTGTCAAGTGACGAT	19
	UBC Z	Cy5- ATTTGGGTTCGCAGTTCTTGTTTG TGGAT-BHQ2	28

### 2.3. Статистическая обработка данных

При статистической обработке полученных данных использовали методы непараметрического анализа, предварительно проведя проверку на нормальное распределение результатов исследования. Исследованные количественные показатели представлены в виде Me (25% – 75%), где Me – медиана, Q1 (25%) – нижний квартиль, Q3 (75%) – верхний квартиль. Корреляционный анализ проводили методом ранговой корреляции Спирмена. Для сопоставления двух независимых групп по количественным признакам использовали двусторонний U-критерий Манна-Уитни, при сравнении трех и более независимых групп использовали H-критерий Краскела - Уоллиса. При сравнении двух зависимых групп применяли Sign test. Различия между группами полагали статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Обработку полученных результатов проводили с помощью пакетов компьютерных программ «Excel» версия 2007, «Statistica» версия 12.0 и «GraphPad Prism» версия 9.0.

Таким образом, клинический материал исследования включал данные 115 пациентов, страдающих раком или доброкачественной гиперплазией предстательной железы, и 35 мужчин без онкологических заболеваний, сопоставимых по возрасту с обследованными больными. При получении лабораторных анализов использовались реакции обратной транскрипции и полимеразная цепная реакция в режиме реального времени. Полученные результаты были обработаны с помощью современных пакетов статистических программ. Все это позволяет считать представленный материал исследования достаточным, а результаты – достоверными.

## ГЛАВА 3

ХАРАКТЕРИСТИКА УРОВНЕЙ мРНК *FOXP3* И *IL-10* У БОЛЬНЫХ  
РАКОМ ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ3.1. Определение уровня мРНК *FOXP3* в периферической крови  
здоровых лиц и больных раком предстательной железы

Исследование образцов крови больных раком предстательной железы (РПЖ) показало, что мРНК *FOXP3* детектировалась во всех исследованных образцах. Содержание тестируемой мРНК было многократно выше ( $p < 0,05$ ), чем у здоровых лиц (Рис. 3.1). Уровень тестируемого показателя в крови у здоровых лиц составил  $Me = 0,001279$  ( $0,0004792 - 0,002014$ ) отн. ед.

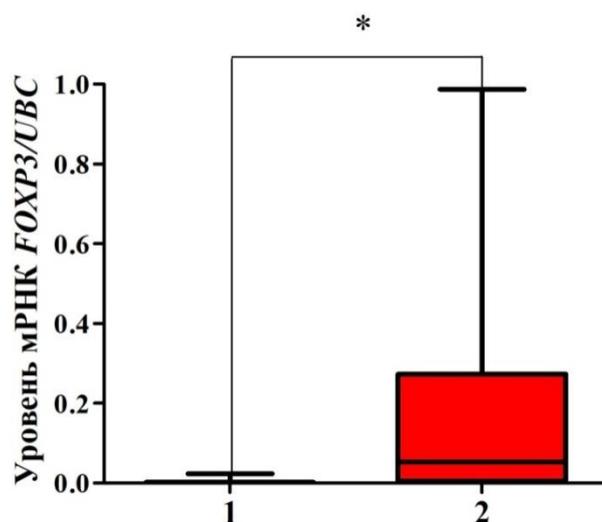


Рисунок 3.1 - Уровень мРНК *FOXP3* в периферической крови здоровых лиц и больных раком предстательной железы

1 – здоровые лица,  $n=35$ ,

2 – РПЖ,  $n=63$ ,

\* – статистически значимые различия ( $p < 0,05$ )

Фактор транскрипции *FOXP3* служит молекулярным маркером регуляторных Т-клеток (Treg), которые контролируют аутоотолерантность,

аутоиммунные процессы, толерантность к пище, комменсальным микроорганизмам и реакцию на аллергены. Изменение экспрессии FOXP3 обнаружено при ряде карцином и доброкачественных опухолях [67]. Показано, что мутации гена FOXP3 могут способствовать канцерогенезу, связанному с нарушениями иммунного ответа. По данным J.Yokokawa et al. в периферической крови больных РПЖ присутствует большое количество регуляторных Т-лимфоцитов, особенно при метастатическом заболевании. Эти клетки являются активными иммуносупрессорами *in vitro*, проявляют повышенную способность подавлять антигензависимую пролиферацию Т-лимфоцитов, супернатант РПЖ оказывает хемотаксическое действие на Treg [44]. По мнению Jiang, L.L., Ruan, L.W. FOXP3 является ключевым фактором в патофизиологических механизмах, при помощи которых опухоль ускользает от иммунного ответа [105]. Имеющаяся в литературе информация соответствует полученным нами результатам о повышении уровня мРНК FOXP3 в периферической крови больных РПЖ. Развитие злокачественного новообразования сопровождается активным угнетением иммунного ответа пациентов, в результате возникает иммунологический дисбаланс, приводящий к возникновению условий для роста опухоли.

Наряду с общим повышением уровня мРНК FOXP3 в крови больных РПЖ обнаружены также различия в уровне мРНК FOXP3 у больных разного возраста. В возрастной группе до 60 лет уровень мРНК FOXP3 был выше нормы в 69 раз ( $p < 0,0001$ ) (Me=0,1494 (6,774 – 0,2988) отн. ед.), у лиц в возрасте 61 – 70 лет – в 132 раза ( $p < 0,0001$ ) (Me=0,4520 (0,1828 – 0,6677) отн. ед.), у больных в возрасте 71 – 80 лет – в 34 раза ( $p < 0,0001$ ) (Me=0,03376 (0,005219 – 0,07105) отн. ед.), в возрасте старше 80 лет – в 29 раз ( $p < 0,0001$ ) (Me=0,03197 (0,0007196 – 0,1164) отн. ед.). Наиболее высоких значений тестируемый показатель достигал в возрастной группе 61 – 70 лет и затем снижался с увеличением возраста (Рис. 3.2). У пациентов в возрасте 71 – 80 лет он был ниже, чем у лиц до 60 лет в 2 раза ( $p < 0,05$ ) и в 3,9 раза ( $p < 0,001$ ) ниже, чем в возрастной группе 61 – 70 лет. При достижении возраста старше

80 лет уровень мРНК *FOXP3* снижался соответственно в 2,4 раза ( $p<0,05$ ) и в 4,6 раза ( $p<0,001$ ).

В настоящее время центральным звеном в патогенезе многих болезней, связанных со старением, считается недостаточность иммунных реакций, что приводит к появлению характерных иммунопатологических синдромов: иммунодефициту, аутоагрессии, гиперчувствительности [97]. По-видимому, у лиц старше 70 лет менее высокие уровни мРНК *FOXP3* по сравнению с больными в возрасте менее 70 лет, связаны с возрастным дисбалансом иммунологических реакций.

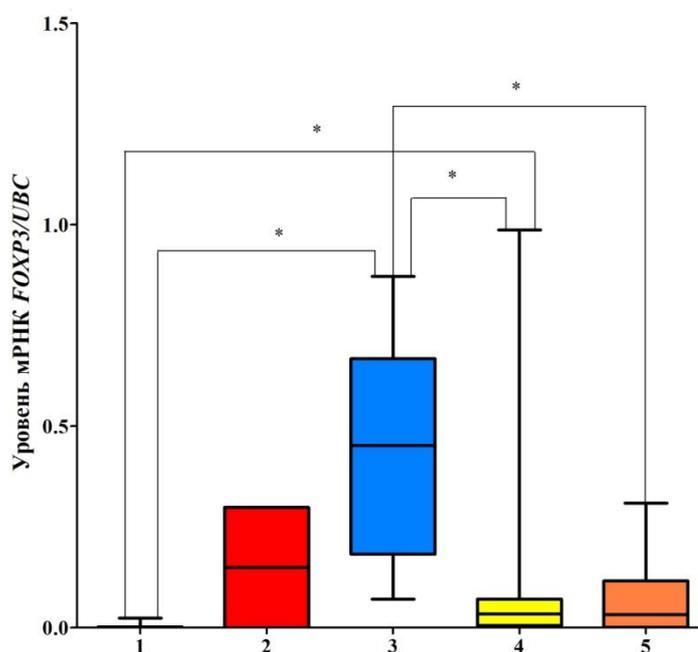


Рисунок 3.2 - Уровень мРНК *FOXP3* в периферической крови здоровых лиц и больных раком предстательной железы разного возраста

1 – здоровые лица, n=35,

2 – пациенты возрастом до 60 лет, n=9,

3 – пациенты возрастом 61 – 70 лет, n=39,

4 – пациенты возрастом 71 – 80 лет, n=12,

5 – пациенты возрастом старше 80 лет, n=3

\* – статистически значимые различия ( $p<0,05$ )

Представленные в литературе данные предполагают, что иммунную систему пожилых лиц следует рассматривать не как плохо

функционирующую версию молодой, а скорее как динамическую систему, в которой  $CD4^+$  Т-клетки, и в том числе FOXP3 Treg, дифференцируются и функционируют иначе, чем у молодых лиц [102].

Показано, что старение с годами может приводить к снижению уровня экспрессии FOXP3 Т-регуляторов на фоне повышения их содержания [120]. Выявленные в работе особенности изменения уровня мРНК *FOXP3* в крови больных РПЖ связаны с указанными возрастными модуляциями в экспрессии данного гена, ассоциированными с функциональным истощением Treg на фоне общего повышения их количества.

Проведена оценка уровня РНК *FOXP3* в крови больных с разным содержанием тестостерона. У пациентов с уровнем тестостерона в сыворотке крови до 5 ммоль/л содержание РНК *FOXP3* превышало значение нормы в 30 раз ( $p < 0,001$ ) (Me=0,02128 (0,02128 – 0,02128) отн. ед.), у больных с уровнем тестостерона 5 – 15ммоль/л – в 91 раз ( $p < 0,001$ ) (Me=0,05779 (0,004453 – 0,2902) отн. ед.). Следует отметить, что с увеличением уровня тестостерона в сыворотке крови больных имела место лишь тенденция к увеличению содержания тестируемого показателя. У лиц с уровнем тестостерона 5 – 15 ммоль/л исследуемый показатель был в 3,0 раза выше ( $p > 0,05$ ), чем в сравниваемой подгруппе пациентов (Рис. 3.3).

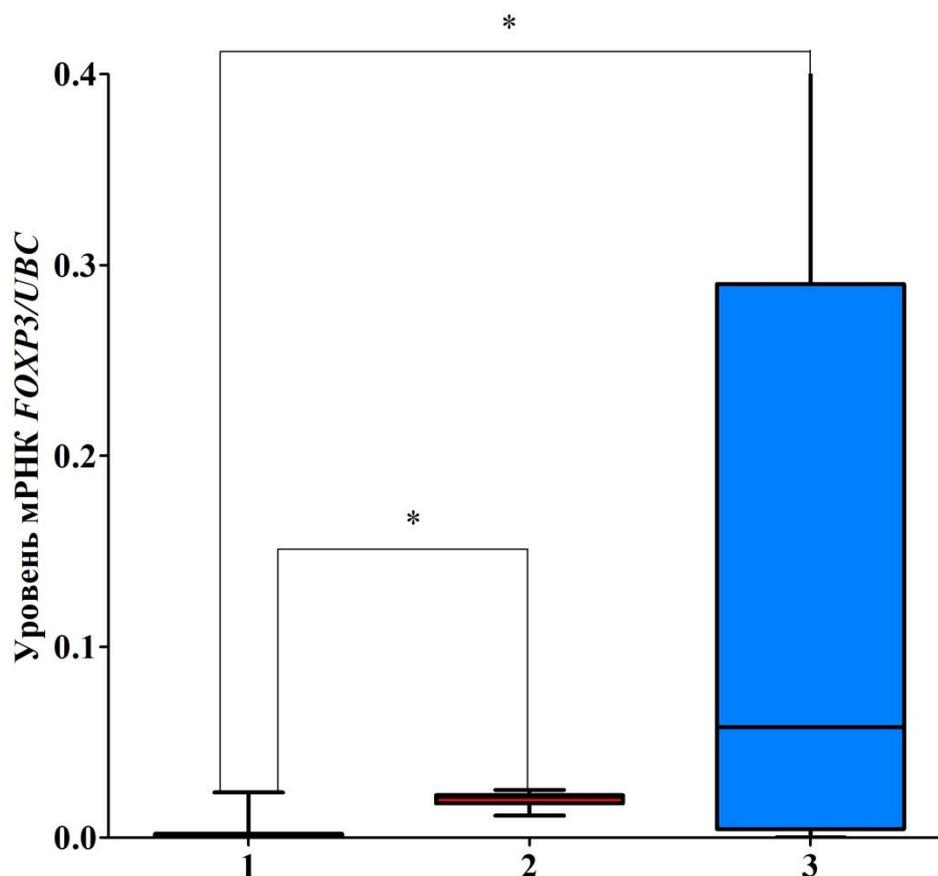


Рисунок 3.3 - Уровень мРНК *FOXP3* в периферической крови здоровых лиц и больных раком предстательной железы с разным содержанием тестостерона

1 – здоровые лица, n=35,

2 – пациенты с уровнем тестостерона до 5 ммоль/л, n=6,

3 – пациенты с уровнем тестостерона от 5 до 10 ммоль/л, n=57,

\* – статистически значимые различия ( $p < 0,05$ )

Тенденция к повышению уровня мРНК *FOXP3* с увеличением концентрации тестостерона, по-видимому, обусловлена показанным ранее вероятным влиянием андрогенов на экспрессию и регуляцию Foxp3 и соответственно на дифференцировку Treg. Представлены данные о прямом влиянии тестостерона на экспансию регуляторных Т-клеток [22, 61]. Хорошо известно, что во многих случаях рак простаты – это заболевание, на течение которого влияет тестостерон. Тестостерон превращается в  $5\alpha$ -

дигидротестостерон, что стимулирует рецептор андрогена и прогрессирование рака предстательной железы [118].

Проведена оценка уровней мРНК *FOXP3* в периферической крови больных РПЖ с концентрацией PSA 4,0 нг/мл и более. Независимо от содержания простатического специфического антигена (PSA) наблюдалось статистически значимое повышенное содержание мРНК *FOXP3* в периферической крови больных РПЖ (Рис. 3.4). Однако статистически значимых различий между группами больных с разным содержанием мРНК *FOXP3* выявлено не было. У лиц с уровнем PSA до 4 нг/мл уровень мРНК *FOXP3* увеличивался в 39 раз ( $p < 0,001$ ) ( $Me = 0,2988$  ( $0,2988 - 0,2988$ ) отн. ед.) по сравнению с контролем; при концентрации PSA, равной 4 – 10 нг/мл, – в 57 раз ( $p < 0,001$ ) ( $Me = 0,03735$  ( $0,0007645 - 0,1178$ ) отн. ед.); при концентрации PSA более 10 нг/мл – в 86 раз ( $p < 0,001$ ) ( $Me = 0,06078$  ( $0,005219 - 0,3044$ ) отн. ед.). Прослеживалась направленность к увеличению содержания мРНК *FOXP3* с увеличением уровня PSA в сыворотке крови больных. У лиц, имевших показатели PSA более 10 нг/мл, уровень мРНК *FOXP3* возрастал в 2,2 раза ( $p > 0,05$ ) по сравнению с уровнем у больных с содержанием PSA до 4 нг/мл и в 1,6 раза ( $p > 0,05$ ) по сравнению с больными, имевшими уровень PSA, равный 4 – 10 нг/мл.

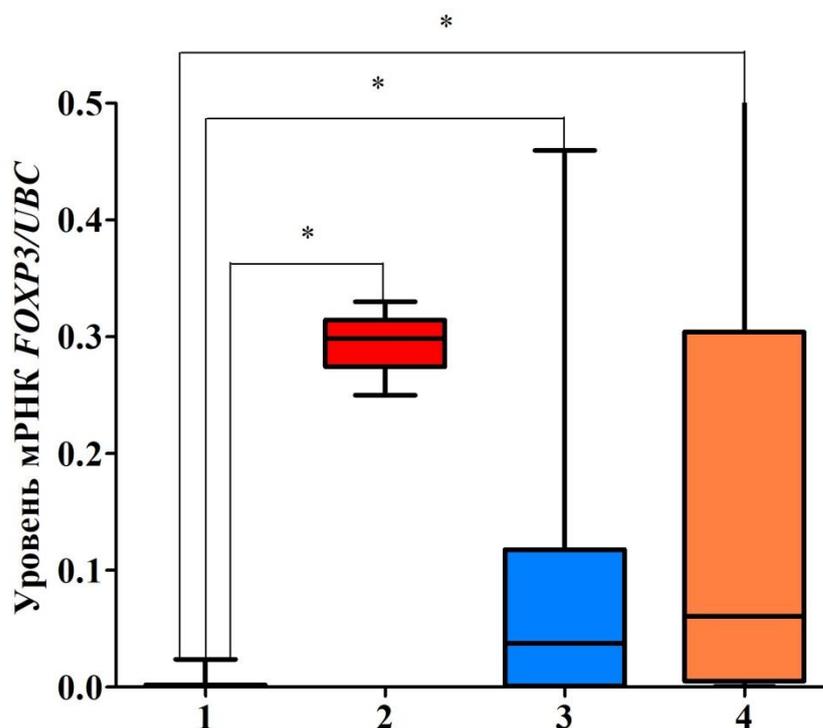


Рисунок 3.4 - Уровень мРНК *FOXP3* в периферической крови здоровых лиц и больных раком предстательной железы с разной концентрацией PSA в крови

1 – здоровые лица, n=35,

2 – концентрация PSA ниже 4 нг/мл, n=3,

3 – концентрация PSA от 4 нг/мл до 10 нг/мл, n=14,

4 – концентрация PSA более 10 нг/мл, n=46,

\* – статистически значимые различия ( $p < 0,05$ )

Как известно, повышение концентрации PSA выше 4 нг/мл ассоциировано с развитием РПЖ. Тенденция к увеличению уровня мРНК *FOXP3* с повышением концентрации PSA указывает, таким образом, на возможную связь между этими показателями. Для оценки возможности такой связи мы провели корреляционный анализ между уровнем мРНК *FOXP3* и концентрацией PSA. Корреляционный анализ показал отсутствие статистически значимой корреляционной связи, что свидетельствует о независимости этих двух показателей (Рис. 3.5).

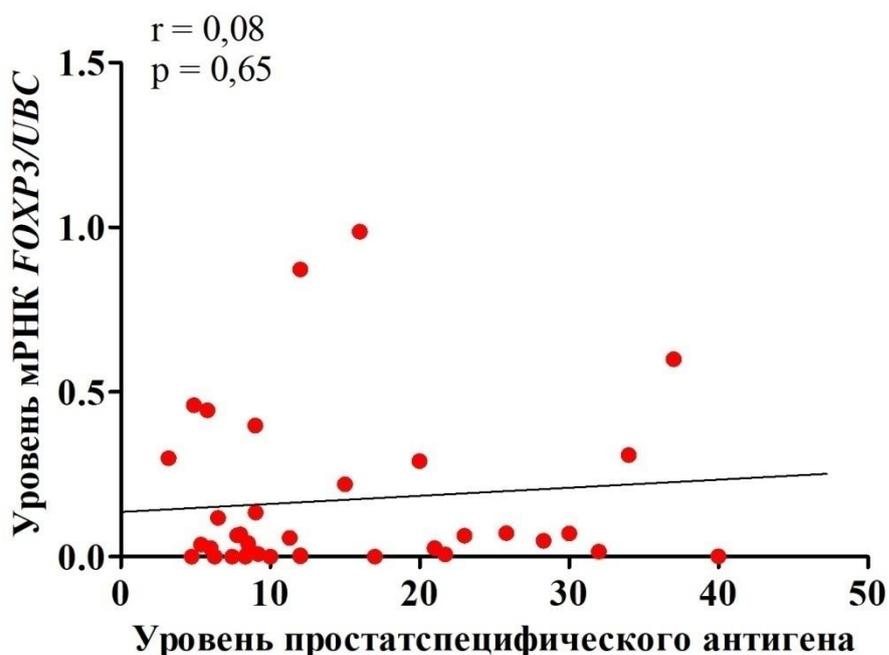


Рисунок 3.5 - Анализ корреляционных связей мРНК *FOXP3* с уровнем PSA в крови у больных раком предстательной железы,  $n=34$

Известно, что плотность или жесткость новообразования рассматривается как показатель злокачественности [138]. С помощью соноэластографии мы оценили уровень мРНК тестируемых генов у больных РПЖ с разными коэффициентами жесткости (КЖ) простаты. У больных с КЖ ткани предстательной железы в диапазоне 4 – 10 Нм уровень мРНК *FOXP3* не отличался от показателя в контрольной группе. Однако увеличение КЖ более 10 Нм сопровождалось возрастанием содержания мРНК *FOXP3* (Рис. 3.6) не только по отношению к норме в 109 раз ( $p < 0,0001$ ) ( $Me = 0,06486$  (0,02113 – 0,2996) отн. ед.), но и по отношению к соответствующему показателю у больных с КЖ в диапазоне 4 – 10 Нм в 18,2 раза ( $p < 0,001$ ) ( $Me = 0,006218$  (0,0006689 – 0,08612) отн. ед.).

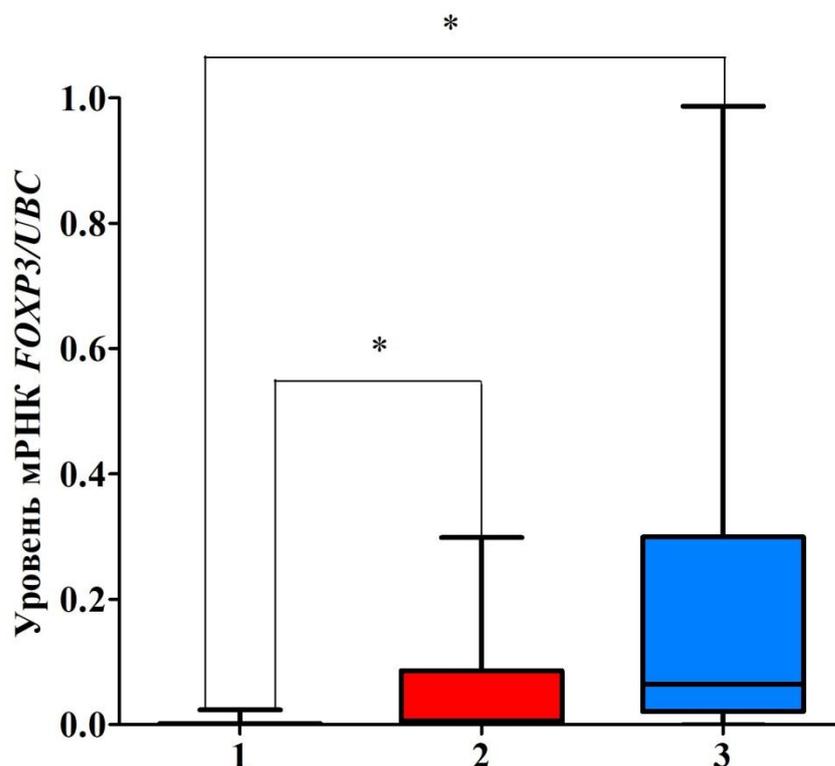


Рисунок 3.6 - Уровень мРНК *FOXP3* в периферической крови здоровых лиц и больных раком предстательной железы с разным коэффициентом жесткости ткани предстательной железы

1 – здоровые лица, n=35,

2 – больные с КЖ простаты в диапазоне 4 – 10 Нм, n=18,

3 – больные с КЖ простаты в диапазоне более 10 Нм, n=45,

\* – статистически значимые различия ( $p < 0,05$ )

Проведен анализ корреляционных связей между КЖ и уровнем мРНК *FOXP3* в крови больных РПЖ (Рис. 3.7). Обнаружена статистически значимая корреляционная связь между данными показателями ( $r=0,37$ ,  $p=0,03$ ).

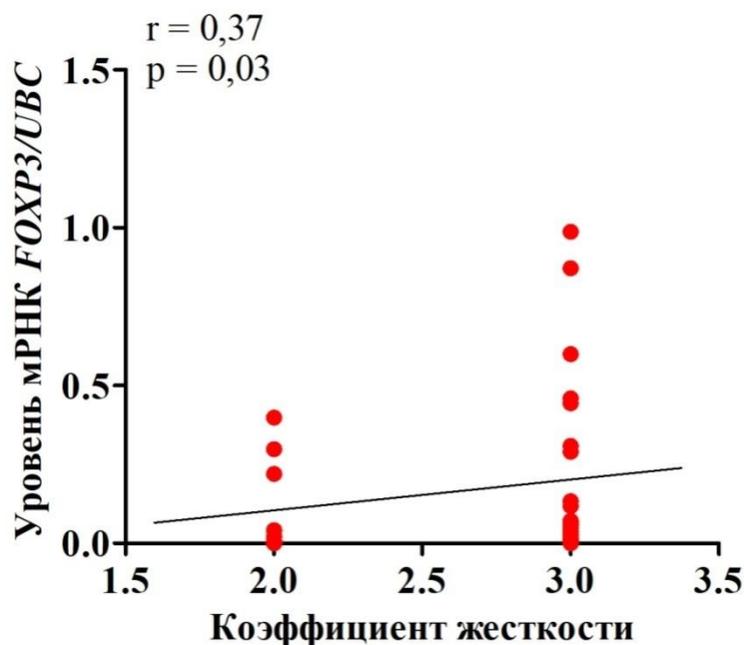


Рисунок 3.7 - Анализ корреляционных связей уровней мРНК *FOXP3* с коэффициентом жесткости у больных раком предстательной железы, n=18

Жесткость тканей предстательной железы зависит от ее статуса – наличия гиперплазии и процента раковых клеток в исследованных образцах [11]. По данным К. Voehm[39], агрессивный РПЖ характеризуется увеличением жесткости ткани ПЖ, в сравнении с индолентным РПЖ. Обнаруженное нами повышение содержания мРНК *FOXP3* при высоких КЖ свидетельствует о том, что более агрессивный опухолевый процесс, сопровождается более выраженной супрессией Т-клеточного иммунного ответа, что соответствует литературным данным и указывает на связь уровня мРНК *FOXP3* со злокачественностью РПЖ.

Обнаружены различия в уровне мРНК *FOXP3* у пациентов с разным объемом простаты. У пациентов с объемом предстательной железы до 25 см<sup>3</sup> уровень мРНК *FOXP3* в периферической крови не отличался от нормы, (Me=0,0007645 (0,0001254 – 0,004346) отн. ед.). Увеличение объема предстательной железы более 25см<sup>3</sup>, но менее 50 см<sup>3</sup> сопровождалось повышением количества тестируемого белка в 172 раза (p<0,001) (Me=0,07199 (0,04149 – 0,3986) отн. ед.) по сравнению с контролем и в 21,5

раза ( $p < 0,001$ ) в отношении предыдущей подгруппы (Рис. 3.8). В случаях роста объема простаты более  $50 \text{ см}^3$  наблюдалась повторная нормализация содержания мРНК *FOXP3* и статистически значимое снижение его уровня по сравнению с подгруппой, имевшей объем предстательной железы более  $25 \text{ см}^3$ , но менее  $50 \text{ см}^3$  в 17,2 раза ( $p < 0,01$ ) (Me=0,01034 (0,0004285 – 0,05268) отн. ед.).

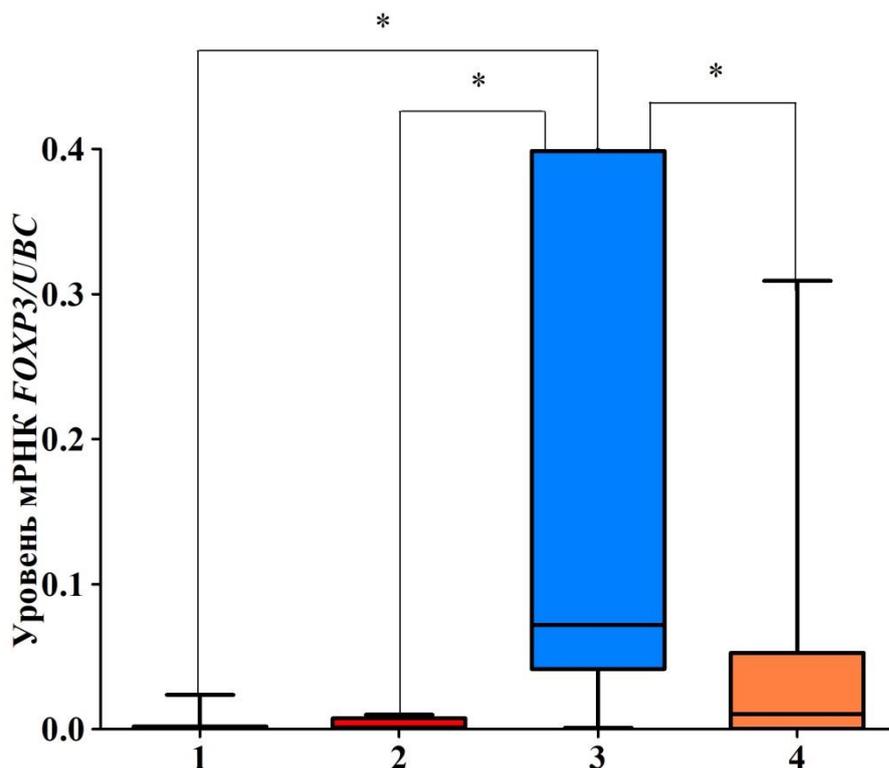


Рисунок 3.8 - Уровень мРНК *FOXP3* в периферической крови здоровых лиц и больных раком предстательной железы с ее разным объемом

1 – здоровые лица, n=35,

2 – больные с объемом простаты до  $25 \text{ см}^3$ , n=4,

3 – больные с объемом простаты более  $25 \text{ см}^3$ , но менее  $50 \text{ см}^3$ , n=43,

4 – больные с объемом простаты более  $50 \text{ см}^3$ , n=16,

\* – статистически значимые различия ( $p < 0,05$ )

В клинической практике увеличение объема простаты сопровождается нарастанием симптоматики: болями в нижних отделах живота, затруднением

или задержкой мочеиспускания, усилением болевого синдрома при мочеиспускании. Обычно подобные жалобы пациента связаны не только с ростом опухолевого узла, но и с обострением хронического воспалительного процесса, который обнаруживается более чем в 99% случаев патологии предстательной железы и связан не только с инфекцией, но и застойными явлениями в предстательной железе [19]. В свою очередь, провоспалительные цитокины, секретируемые опухолями предстательной железы, могут регулировать экспрессию FOXP3 и увеличивать популяцию Treg [16]. Возрастание уровня мРНК FOXP3 у больных с объемом предстательной железы от 25 см<sup>3</sup> до 50 см<sup>3</sup> обусловлено повышенной экспрессией гена FOXP3 в этих случаях. Однако причина такого значительного увеличения транскрипционной активности остается неясной.

Локализация опухоли в предстательной железе не оказывала существенного влияния на уровень мРНК FOXP3 в крови больных. Во всех случаях при расположении опухоли преимущественно справа, слева или в обеих долях предстательной железы имело место статистически значимое возрастание уровня мРНК FOXP3 по сравнению с контролем – в 69 раз ( $p < 0,001$ ), 41 раз ( $p < 0,001$ ) и 85 раз ( $p < 0,001$ ), соответственно. Прослеживалась статистически не значимая тенденция к повышению тестируемого показателя у лиц с локализацией опухоли в обеих долях предстательной железы по сравнению с альтернативными подгруппами.

В случаях опухолей, соответствующих T2 по классификации TNM уровень мРНК FOXP3 был выше нормы в 56 раз ( $p < 0,001$ ), при опухолях, оцениваемых как T3, – в 68 раз ( $p < 0,001$ ). Прослеживалась статистически незначимая тенденция к возрастанию содержания тестируемого показателя с увеличением размера опухоли в 1,2 раза ( $p > 0,05$ ) по сравнению с альтернативной группой (Табл. 3.1).

Таблица 3.1 - Уровень мРНК *FOXP3* в периферической крови больных раком предстательной железы

Показатель	Величина	Кол-во больных	Уровень мРНК <i>FOXP3</i>
			Медиана (25% – 75%)
Локализация опухоли	Правая доля	15	0,069 (0,017 – 0,549)*
	Левая доля	23	0,041 (0,008– 0,118)*
	Обе доли	25	0,085 (0,012 – 0,237)*
Стадия по классификации TNM	T2	48	0,02603 (0,0007645 – 0,2200)*
	T3	25	0,06823 (0,03197 – 0,2996)*
Здоровые лица		30	0,001279 (0,0004792 – 0,002014)

У больных с коэффициентом Глисона до 6 баллов уровень мРНК *FOXP3* превышал норму в 89 раз ( $p < 0,001$ ) ( $Me = 0,06290$  (0,007983 – 0,1178) отн. ед.), в случаях с коэффициентом Глисона 6 – 7 баллов – в 76 раз ( $p < 0,001$ ) ( $Me = 0,06486$  (0,0002826 – 0,3715) отн. ед.), у лиц с коэффициентом Глисона более 7 баллов – в 32 раза ( $p < 0,05$ ) ( $Me = 0,02660$  (0,004453 – 0,2902) отн. ед.). Уровни мРНК *FOXP3* в сравниваемых подгруппах больных статистически значимо не отличались (Рис. 3.9). Прослеживалась лишь статистически не значимая тенденция к снижению количества тестируемого показателя при опухолях с коэффициентом Глисона более 7 баллов – в 2,8 раза ( $p > 0,05$ ) с подгруппой с коэффициентом Глисона до 6 баллов и в 2,3 раза ( $p > 0,05$ ) с подгруппой с коэффициентом Глисона 6 – 7 баллов.

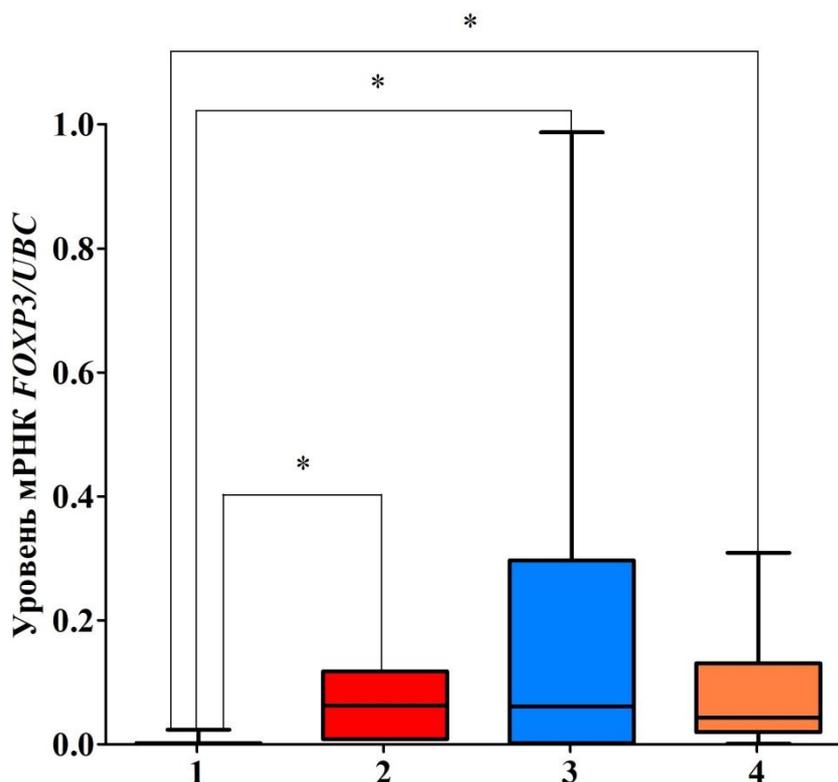


Рисунок 3.9 - Уровень мРНК *FOXP3* в периферической крови здоровых лиц и больных раком предстательной железы во взаимосвязи с коэффициентом Глисона

1 – здоровые лица, n=35,

2 – больные с коэффициентом Глисона до 6 баллов, n=9,

2 – больные с коэффициентом Глисона 6 – 7 баллов, n=38,

3 – больные с коэффициентом Глисона более 7 баллов, n=16,

\* – статистически значимые различия ( $p < 0,05$ )

Поражение регионарных лимфоузлов сопровождалось возрастанием уровня мРНК *FOXP3* в периферической крови больных в 98 раз ( $p < 0,001$ ) ( $Me = 0,07101$  ( $0,04852 - 0,3091$ ) отн. ед.) по сравнению со здоровыми лицами (Рис. 3.10). В случаях, когда лимфоузлы оставались интактными, содержание исследуемого показателя повышалось в 27 раз ( $p < 0,001$ ) ( $Me = 0,02660$  ( $0,0008818 - 0,1770$ ) отн. ед.) относительно показателей здоровых лиц и было меньше, чем в сравниваемой подгруппе в 3,6 раза, однако различия не имели статистической значимости вследствие большого разброса данных ( $p > 0,05$ ).

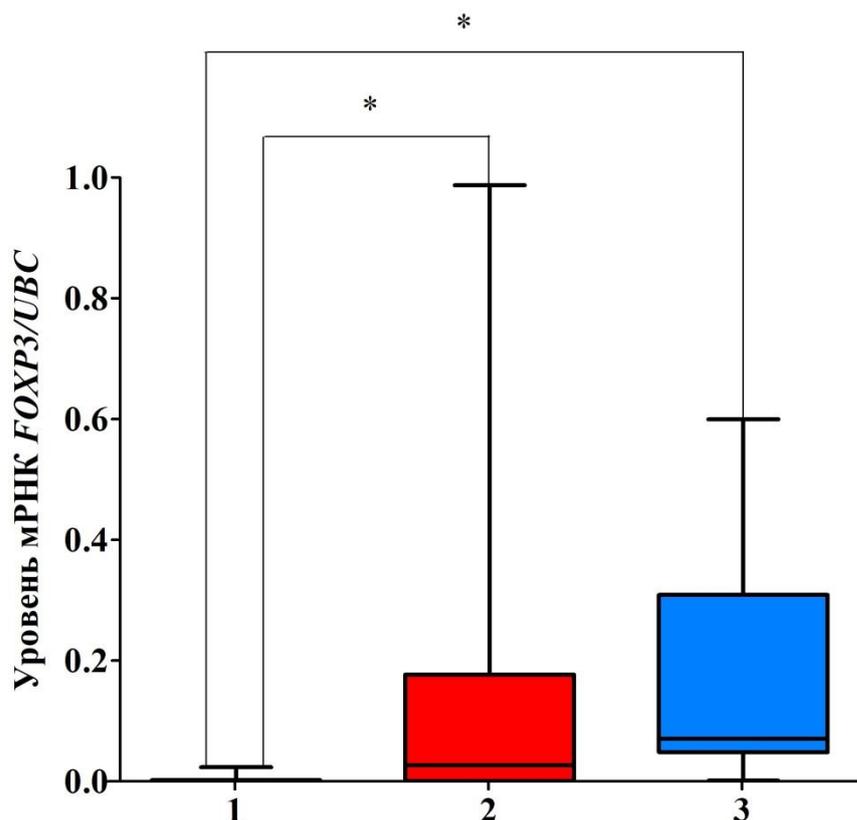


Рисунок 3.10 - Уровень мРНК *FOXP3* в периферической крови здоровых лиц и больных раком предстательной железы во взаимосвязи с поражением регионарных лимфоузлов

1 – здоровые лица, n=35,

2 – больные без поражения регионарных лимфоузлов, n=56,

3 – больные с поражением регионарных лимфоузлов, n=6,

\* – статистически значимые различия ( $p < 0,05$ )

По мере увеличения стадии опухолевого процесса у больных было отмечено возрастание уровня мРНК *FOXP3* (Рис. 3.11). Так на II стадии заболевания различия показателя с контрольной группой составили 26 раз ( $p < 0,001$ ) (Me=0,02603 (0,0007834 – 0,1770) отн. ед.), на III стадии – 63 раза ( $p < 0,001$ ) (Me=0,02603 (0,0007834 – 0,1770) отн. ед.), на IV стадии – 112 раз ( $p < 0,001$ ) (Me=0,2902 (0,2902 – 0,2902) отн. ед.).

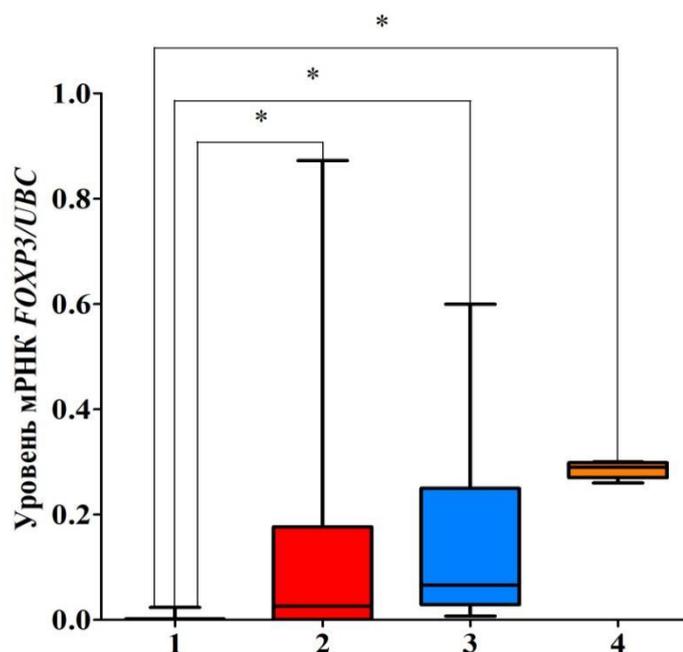


Рисунок 3.11 - Уровень мРНК *FOXP3* в периферической крови здоровых лиц и больных раком предстательной железы с различными стадиями опухолевого процесса

1 – здоровые лица, n=35,

2 – группа больных со II стадией заболевания, n=48,

3 – группа больных с III стадией заболевания, n=24,

4 – группа больных с IV стадией заболевания, n=4,

\* – статистически значимые различия ( $p < 0,05$ )

Известно увеличение количества Treg в периферической крови больных РПЖ при метастатическом опухолевом процессе [55]. Клетки Treg таких больных проявляли повышенную способность подавлять антигензависимую пролиферацию Т-лимфоцитов и стимулировать метастазирование опухоли. Согласно исследованию Karanikas V. et al. [85] пациенты с III/IV стадиями имеют более высокий уровень экспрессии *FOXP3*, чем пациенты с более ранними стадиями заболевания. Полученные нами данные о повышении уровня мРНК *FOXP3* у больных с IV стадией РПЖ согласуются с результатами этих исследований.

При выполнении оперативного вмешательства в объеме радикальной простатэктомии тестируемый показатель в предоперационном периоде был

выше нормы в 45 раз ( $p < 0,001$ ). В подгруппе больных, перенесших операцию в объеме трансуретральной резекции предстательной железы, исходный уровень мРНК *FOXP3* превышал в 139 раз ( $p < 0,001$ ) уровень мРНК у здоровых лиц (Рис. 3.12). В случаях выполнения биопсии простаты предоперационный уровень тестируемого показателя не отличался от соответствующей величины в группе контроля ( $p > 0,05$ ). Имело место статистически значимое различие исходных показателей у лиц, направленных на РПЭ и ТУР простаты – в 3 раза ( $p < 0,01$ ) ( $Me = 0,02660$  (0,001175 – 0,2200) отн. ед.), у пациентов, поступивших на ТУР и биопсию ПЖ – 17,4 раза ( $p < 0,01$ ) ( $Me = 0,4442$  (0,2988 – 0,4597) отн. ед.), у больных, поступивших на РПЭ и биопсию ПЖ – в 5,6 раза ( $p < 0,01$ ) ( $Me = 0,007518$  (0,0007645 – 0,04852) отн. ед.).

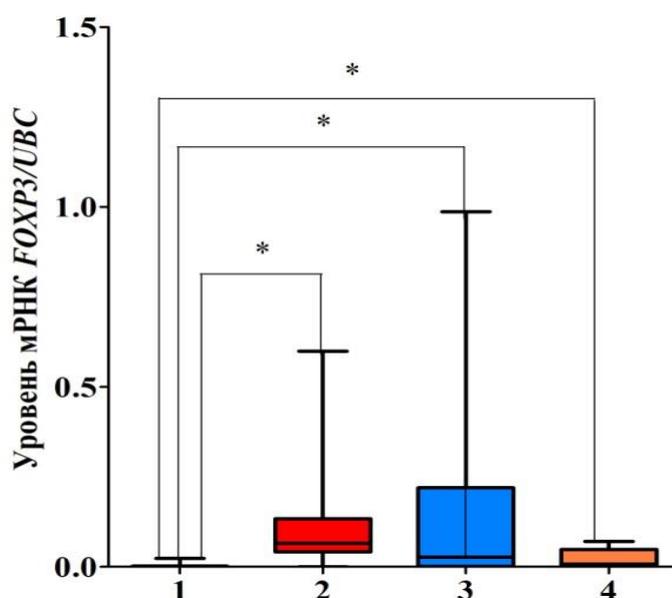


Рисунок 3.12 - Уровень мРНК *FOXP3* в периферической крови здоровых лиц и больных раком предстательной железы с разным объемом оперативного вмешательства

1 – здоровые лица,  $n=35$ ,

2 – больные, перенесшие трансуретральную резекцию простаты,  $n=4$ ,

3 – больные, перенесшие радикальную простатэктомию,  $n=56$ ,

4 – больные, перенесшие биопсию простаты,  $n=3$ ,

\* – статистически значимые различия ( $p < 0,05$ )

По мнению некоторых авторов, уровень *FOXP3* можно использовать как прогностический фактор течения опухолевого процесса [2]. Тестирование мРНК *FOXP3* в предоперационном периоде может явиться дополнительным фактором для отбора пациентов на выполнение того или иного вида оперативного вмешательства.

Таким образом, у больных раком предстательной железы имело место повышение уровня мРНК *FOXP3* в периферической крови по сравнению с показателями здоровых лиц. При этом наиболее высокие уровни мРНК *FOXP3* обнаруживались у больных в возрасте от 60 до 71 года.

Повышенный уровень мРНК *FOXP3* статистически значимо не менялся при разном содержании тестостерона и PSA в крови больных, локализации опухоли в предстательной железе, величины коэффициента Глисона, заинтересованности регионарных лимфоузлов, но статистически значимо менялся с увеличением стадии по классификации TNM и с повышением КЖ простаты, что свидетельствует о связи уровня мРНК *FOXP3* со злокачественностью РПЖ.

### **3.2. Определение уровня мРНК *IL-10* в периферической крови здоровых лиц и больных раком предстательной железы**

Одним из основных цитокинов, продуцируемых *FOXP3*-положительными Т-регуляторами, является *IL-10*, обладающий выраженными иммуносупрессирующими свойствами. В связи с этим нами, наряду с оценкой экспрессии в крови больных РПЖ гена, кодирующего *FOXP3*, также проведено определение уровня мРНК *IL-10*.

*IL-10* является многофункциональным цитокином, действующим как ингибитор воспалительных и иммунных реакций, а также индуцированного опухолью ангиогенеза. Он угнетает продукцию макрофагальных ангиогенных факторов, таких как интерлейкин- $1\beta$ , фактор некроза опухоли- $\alpha$ , интерлейкин-6 и матричная металлопротеиназа-9, и, следовательно, рост

опухоли и метастазирование. Предполагается, что противовоспалительные механизмы IL-10 обладают проонкогенным потенциалом, позволяя раковым клеткам избегать иммунного надзора [160]. IL-10 в основном продуцируется моноцитами и в меньшем количестве лимфоцитами, включая Т-хелперы 2-го типа (Th2), CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> регуляторные Т-клетки и некоторые другие субпопуляции активированных Т- и В-лимфоцитов. Экспрессия этого цитокина в обычных условиях минимальна в нестимулированных тканях и требует активации клеток патогенами [152]. При раке желудка и колоректальном раке повышение уровня IL-10 считается плохим прогностическим признаком и сочетается с выраженным усилением роста опухоли [12, 155].

В проведенных ранее исследованиях показано, что содержание IL-10 в периферической крови увеличивается у пациентов с РПЖ по мере прогрессирования заболевания, и возможно, способствует подавлению иммунной системы, наблюдаемому у этих больных [88]. Отмечено существование корреляционной связи между уровнем IL-10 и стадией заболевания [160]. В другом исследовании в образцах крови больных РПЖ не было выявлено статистически значимых изменений уровня IL-10 в сравнении с нормой, что поставило под сомнение мониторинговую значимость сывороточного уровня IL-10 при РПЖ [75]. Для того чтобы дополнить представления о значимости показателей, связанных с продукцией IL-10, мы провели оценку у больных РПЖ уровня не самого IL-10, а кодирующей этот цитокин матричной РНК. В соответствии с полученными нами результатами уровень мРНК *IL-10*, в отличие от уровня, кодируемого ею IL-10, не повышается и не сохраняется в пределах нормы в крови РПЖ, а понижается. Обнаружено, что медиана уровня мРНК *IL-10* (Me=0,9500 (0,089 – 1,998) отн. ед.) в крови больных РПЖ оказалась статистически значимо в 2,8 раза ниже, чем у здоровых лиц (Me=2,638 (1,440 – 4,712) отн. ед.) (Рис. 3.13).

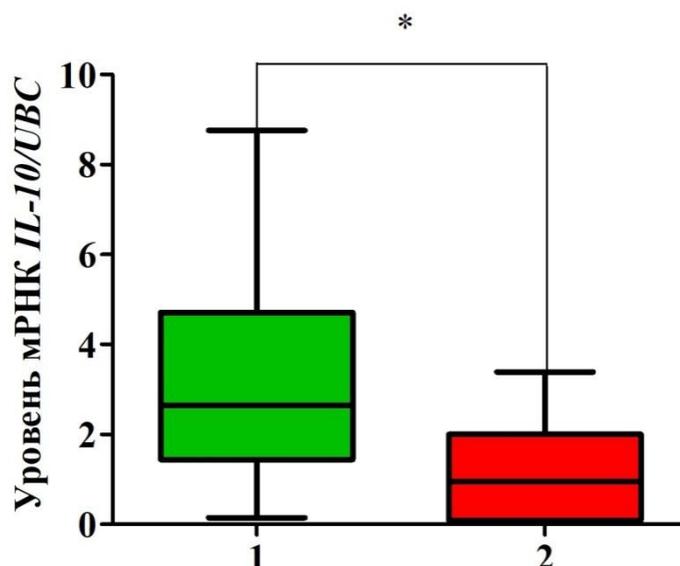


Рисунок 3.13 - Уровень мРНК *IL-10* в периферической крови здоровых лиц и больных раком предстательной железы

1 – здоровые лица, n=35,

2 – больные РПЖ, n=63,

\* – статистически значимые различия ( $p < 0,05$ )

Полученный результат, вероятно, связан с тем, что, как показано ранее, IL-10 обладает аутоингибирующей активностью, тормозя собственный синтез за счет дестабилизации мРНК *IL-10* [12]. В регуляции экспрессии IL-10 также важную роль играет микроРНК *hsa-miR-106a*, которая снижает экспрессию IL-10 за счет деградации его мРНК. Посттранскрипционный контроль, опосредованный *hsa-miR-106a*, потенциально может участвовать в точной настройке критического уровня экспрессии IL-10 контекстно-зависимым образом [75]. По данным ряда исследований [75 – 79], экспрессия *hsa-miR-106a* у онкологических больных повышена и коррелирует со стадией развития опухоли, а блокада IL-10 резко усиливает противоопухолевую активность системы иммунитета. Возможно, *hsa-miR-106a* при РПЖ также влияет на уровень экспрессии гена *IL-10*, приводя к снижению уровня мРНК *IL-10*.

Следует отметить, что выявленные различия в уровне мРНК *IL-10* у больных РПЖ в сравнении со здоровыми волонтерами, сохранились независимо от возраста пациентов. Самые низкие значения показателя имели лица в возрасте 61 – 70 лет ( $Me=0,9020$  ( $0,8731 - 1,060$ ) отн. ед.) (Рис. 3.14). Заметим, что данная возрастная группа одновременно характеризовалась самым высоким уровнем мРНК *FOXP3*.

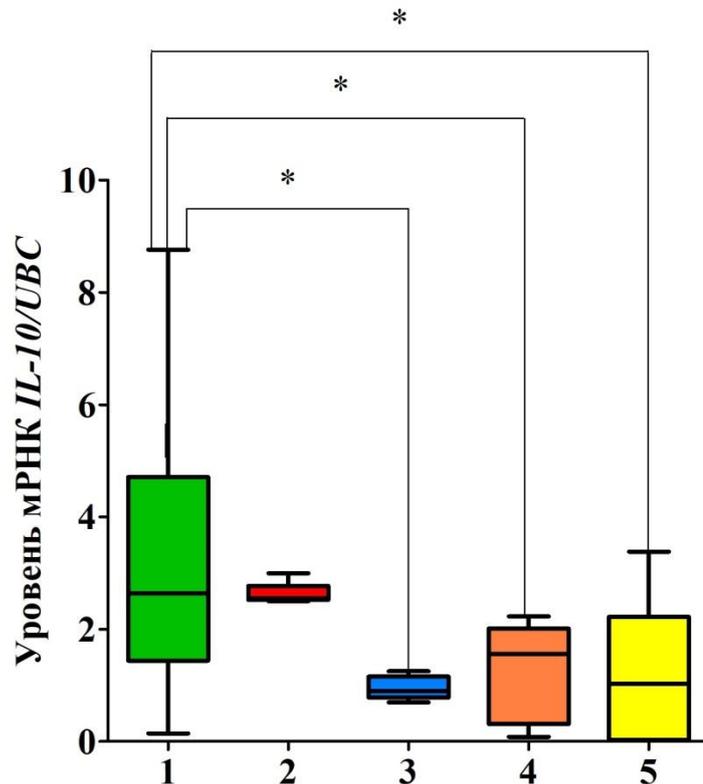


Рисунок 3.14 - Уровень мРНК *IL-10* в периферической крови здоровых лиц и больных раком предстательной железы разного возраста

1 – здоровые лица, n=35,

2 – больные РПЖ в возрасте до 60 лет, n=9,

3 – больные РПЖ в возрасте 61 – 70 лет, n=40,

4 – больные РПЖ в возрасте 71 – 80 лет, n=12,

5 – больные РПЖ старше 81 года, n=3

\* – статистически значимые различия ( $p < 0,05$ )

В возрастной подгруппе 71 – 80 лет уровень мРНК *IL-10* ( $Me=1,560$  ( $0,3119 - 2,012$ ) отн. ед.) отличался от показателей здоровых лиц в 1,69 раза

( $Me=2,638$  ( $1,440 - 4,712$ ) отн. ед.) ( $p<0,05$ ). У лиц старше 81 года, содержание мРНК *IL-10* ( $Me=1,030$  ( $0,02962 - 2,218$ ) отн. ед.) было ниже нормы в 2,6 раза ( $p<0,05$ ). При сравнении между собой показателей мРНК *IL-10* в разных возрастных группах больных РПЖ, статистически значимых различий выявлено не было ( $p>0,05$ ).

Наряду с возрастными особенностями исследованы изменения уровня мРНК *IL-10* у больных с разным содержанием в крови тестостерона. Повышение уровня тестостерона сопровождалось направленностью к падению уровня мРНК *IL-10*. При содержании гормона до 5 ммоль/л уровень РНК *IL-10* ( $Me$  1,901 ( $1,301 - 2,229$ ) отн. ед.) в периферической крови был в 1,5 раза ниже нормы ( $p<0,05$ ). В подгруппе с уровнем тестостерона 5 – 15 ммоль/л исследуемый показатель ( $Me$  1,029 ( $0,187 - 1,998$ ) отн. ед.) уменьшался в 2,9 раза ( $p<0,05$ ) относительно его величины у здоровых лиц. Различия между подгруппами пациентов РПЖ по тестируемому показателю были недостоверны, хотя прослеживалась направленность к его снижению в 1,8 раза ( $p>0,05$ ) у лиц с более высокой концентрацией гормона в сыворотке крови (Рис. 3.15).

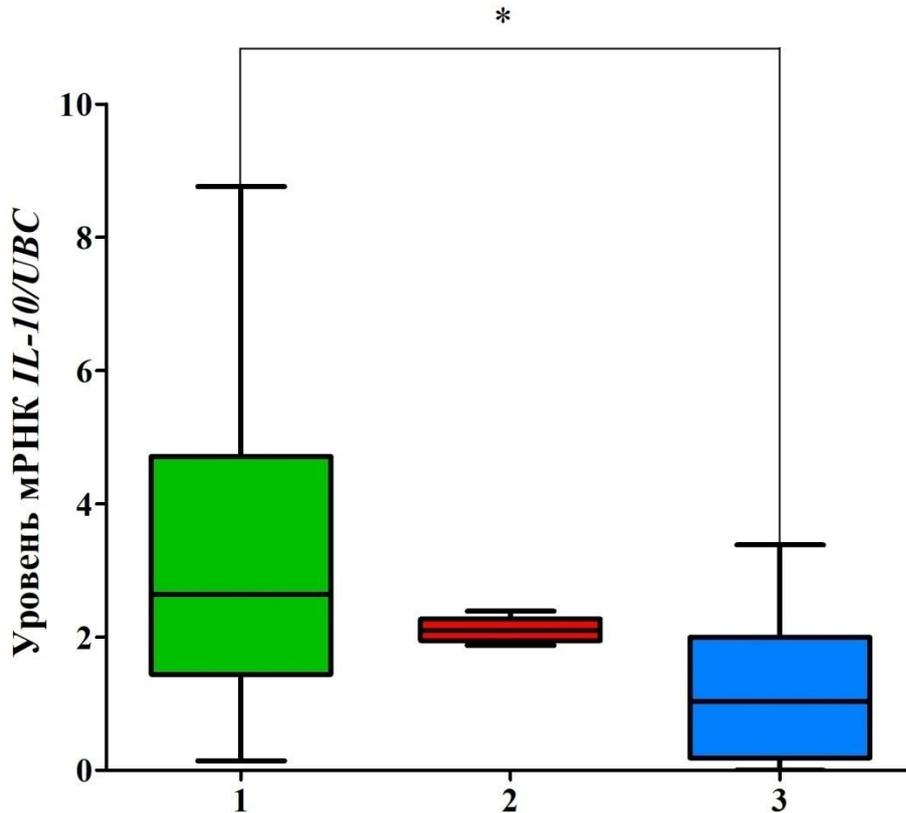


Рисунок 3.15 - Уровень мРНК *IL-10* в периферической крови здоровых лиц и больных раком предстательной железы с разным содержанием тестостерона

1 – здоровые лица, n=35,

2 – больные с уровнем тестостерона до 5 ммоль/л, n=6,

3 – больные с уровнем тестостерона от 5 до 15 ммоль/л, n=57,

\* – статистически значимые различия ( $p < 0,05$ )

Сходные изменения в уровне мРНК *IL-10* были зарегистрированы при разной концентрации PSA в крови больных. Если при концентрации PSA до 4 нг/мл уровень мРНК *IL-10* понижался ( $Me=2,548$  (2,548 – 2,548) отн. ед.), но статистически значимых изменений не было выявлено, то при повышении концентрации PSA выше 4 нг/мл обнаруживалось статистически значимое понижение исследуемого показателя. Так, у больных РПЖ, имевших концентрацию PSA 4 – 10 нг/мл ( $Me=1,149$  (0,3119 – 2,160) отн. ед.) и более 10 нг/мл ( $Me=0,9980$  (0,1201 – 1,990) отн. ед.) уровень мРНК *IL-10* был

статистически значимо ниже уровня здоровых лиц ( $Me=2,638$  ( $1,440 - 4,712$ ) отн. ед.) в 2,8 и 4,2 раза ( $p<0,05$ ), соответственно (Рис. 3.16). Уровень мРНК *IL-10* снижался по сравнению со здоровыми лицами тем значительнее, чем выше было содержание PSA в крови больных.

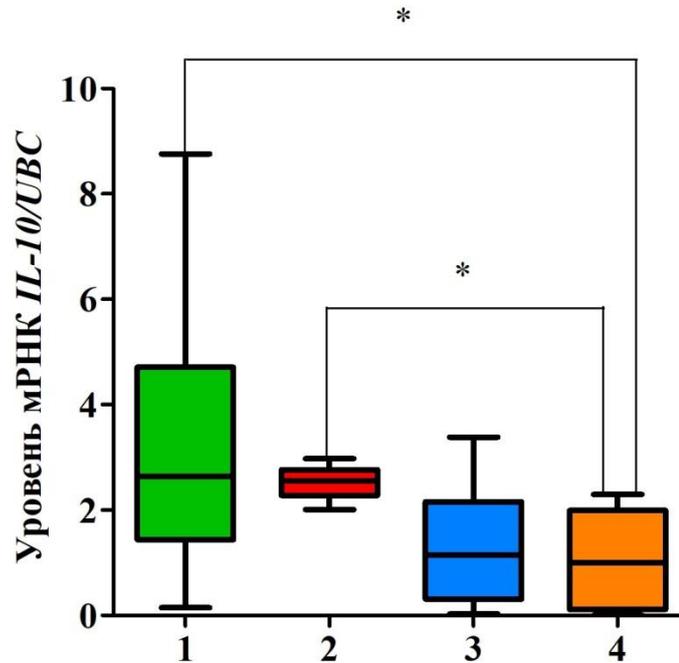


Рисунок 3.16 - Уровень мРНК *IL-10* в периферической крови здоровых лиц и больных раком предстательной железы с разной концентрацией PSA в крови

1 – здоровые лица,  $n=35$ ,

2 – концентрация PSA до 4 нг/мл,  $n=3$ ,

3 – концентрация PSA 4 – 10 нг/мл,  $n=44$ ,

4 – концентрация PSA более 10 нг/мл,  $n=16$ ,

\* – статистически значимые различия ( $p<0,05$ )

Аналогичным образом изменялся уровень мРНК *IL-10* от объема предстательной железы у больных РПЖ. Увеличение объема предстательной железы сопровождалось снижением содержания мРНК *IL-10* в периферической крови больных. Если у больных, имеющих объем простаты до  $25\text{см}^3$ , содержание мРНК *IL-10* ( $Me=2,804$  ( $2,222 - 3,385$ ) отн. ед.) статистически значимо не отличалось со здоровыми лицами, то у больных с

объемом простаты от 25 до 50 см<sup>3</sup> (Me=0,9500 (0,5174 – 1,706) отн. ед.) уровень мРНК *IL-10* был статистически значимо ниже в 2,8 раза ( $p<0,01$ ), а у больных с объемом простаты более 50 см<sup>3</sup> – в 1,7 раза (Me=1,569 (0,04982 - 1,986) отн. ед.) ( $p<0,01$ ). Следует отметить достоверные различия между содержанием мРНК *IL-10* у лиц с объемом простаты до 25см<sup>3</sup> и более 25 до 50 см<sup>3</sup>, и в подгруппах с объемом простаты до 25см<sup>3</sup> и более 50 см<sup>3</sup> – в 2,95 раза ( $p<0,05$ ) и 1,8 раза ( $p<0,05$ ) соответственно (Рис. 3.17).

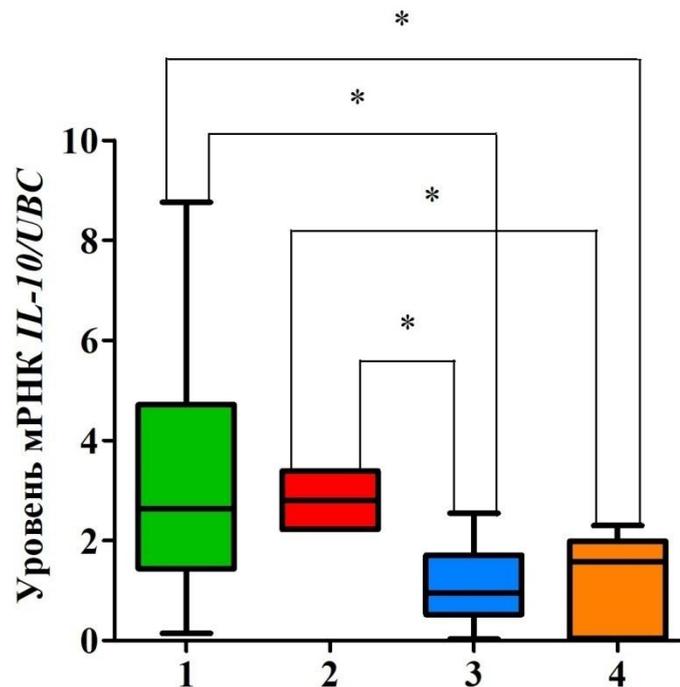


Рисунок 3.17 - Уровень мРНК *IL-10* в периферической крови здоровых лиц и больных раком предстательной железы с разным объемом. Результаты представлены в виде медианы, 25 и 75 перцентилей, минимального и максимального значений

1 – здоровые лица, n=35,

2 – больные с объемом простаты до 25см<sup>3</sup>, n=4,

3 – больные с объемом простаты более 25 до 50 см<sup>3</sup>, n=43,

4 – больные с объемом простаты более 50 см<sup>3</sup>, n=16,

\* – статистически значимые различия ( $p<0,05$ )

Результаты корреляционного анализа продемонстрировали статистически значимую отрицательную корреляционную связь между объемом простаты и уровнем мРНК *IL-10* (Рис. 3.18).

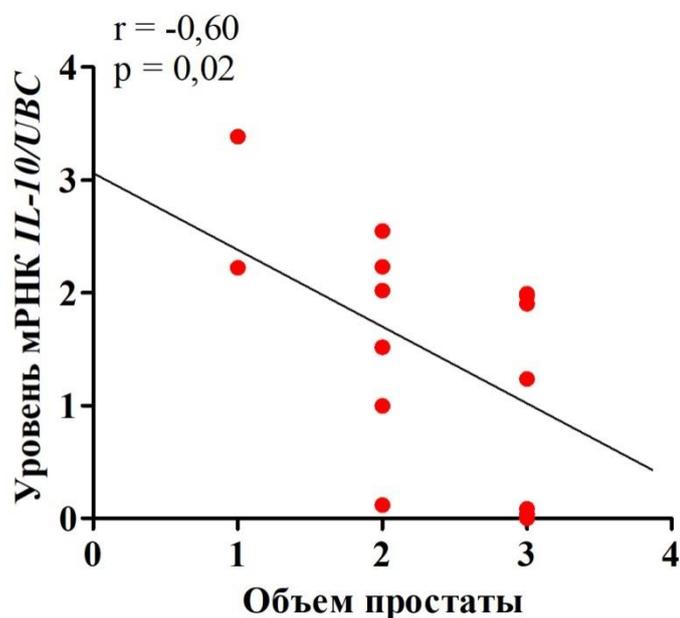


Рисунок 3.18 - Анализ корреляционных связей уровней мРНК *IL-10* с объемом простаты у больных раком предстательной железы, n=13

Сходный характер изменений в уровне мРНК *IL-10* у больных с разным содержанием PSA и разным объемом опухоли может объясняться тем, что содержание PSA зависит от объема простаты. Ранее было показано, что существует связь между объемом опухоли и уровнем PSA, что объем опухоли имеет прогностическую ценность, однако он не дает дополнительной информации в сравнении с другими показателями [165, 161]. То есть за счет повышения объема опухоли может увеличиваться продукция PSA, способного дозозависимо воздействовать на экспрессию генов [32]. Следствием такого действия может быть сходный характер изменения уровня мРНК *IL-10* при повышении концентрации PSA и объема простаты. Такой же характер изменения уровня мРНК *IL-10* обнаруживался с повышением коэффициента Глисона, который, как известно, отражает степень злокачественности и распространенности опухолевого процесса [98].

Уровень мРНК *IL-10* в периферической крови больных с коэффициентом Глисона до 6 баллов (Me=0,08937 (0,0002062 – 1,518) отн. ед.) статистически значимо снижался по сравнению с уровнем мРНК у здоровых лиц. У пациентов с коэффициентом Глисона 6 – 7 баллов он был статистически значимо снижен в 1,9 раза ( $p<0,05$ ), у больных РПЖ с коэффициентом Глисона более 7 баллов он имел направленность к снижению (Рис. 3.19).

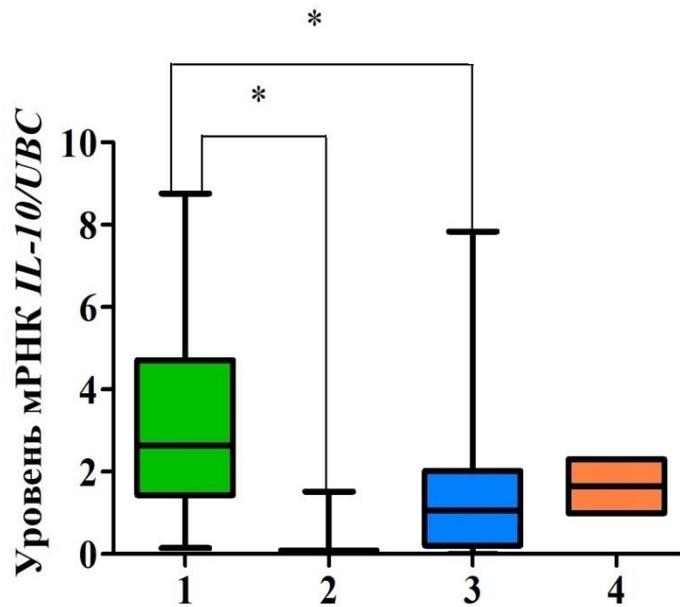


Рисунок 3.19 - Уровень мРНК *IL-10* в периферической крови здоровых лиц и больных раком предстательной железы с разным коэффициентом Глисона. Результаты представлены в виде медианы, 25 и 75 перцентилей, минимального и максимального значений

1 – здоровые лица, n=35,

2 – больные с коэффициентом Глисона до 6 баллов, n=9,

3 – больные с коэффициентом Глисона 6 – 7 баллов, n=38,

4 – больные с коэффициентом Глисона более 7 баллов, n=16,

\* – статистически значимые различия ( $p<0,05$ )

Известно, что наиболее выраженная и интенсивная (по сравнению с тканью железы нормального строения и доброкачественной гиперплазией) экспрессия PSA наблюдается в аденокарциномах, преимущественно в

низкодифференцированных, т.е. имеющих высокий индекс Глисона [100]. Высокий индекс Глисона отражает не только нарастание атипических свойств, но и степень распространенности опухолевого процесса вплоть до прорастания капсулы с инвазией в соседние органы и массивного метастазирования.

Оценка уровня мРНК *IL-10* при разных коэффициентах жесткости (КЖ) ткани предстательной железы также показала направленность к его снижению по мере роста КЖ простаты. У лиц с КЖ 4 – 10 Нм (Me=1,937 (0,6906 – 2,227) отн. ед.) тестируемый показатель снижался в 1,4 раза ( $p<0,05$ ) по сравнению со здоровыми лицами (Me=2,638 (1,440 – 4,712)), у больных с КЖ более 10 Нм (Me=0,9356 (0,09449 – 1,580) отн. ед.) – в 2,8 раза ( $p<0,05$ ). Различия между подгруппами больных по уровню мРНК *IL-10* были недостоверны ( $p>0,05$ ) (Табл. 3.2).

Таблица 3.2 - Уровень мРНК *IL-10* у больных раком предстательной железы с разным коэффициентом жесткости простаты

Показатель	Величина	Кол-во больных	Уровень мРНК
			Медиана (25% – 75%)
Коэффициент жесткости	4 – 10	18	1,937 (0,6906 - 2,227)
	Более 10	45	0,9356 (0,09449 - 1,580)

Также не выявлено различий в уровне мРНК *IL-10* при разной локализации опухоли, но независимо от преимущественной локализации опухоли в правой или в обеих долях предстательной железы, наблюдалось статистически значимое снижение ( $p<0,05$ ) уровня мРНК *IL-10* по сравнению с уровнем здоровых лиц в 2,1 раза, 2,4 раза и 3,2 раза соответственно.

Результаты указывают на отсутствие зависимости между локализацией опухолевого узла и уровнем мРНК *IL-10*.

Сходным образом прослеживалась тенденция к снижению содержания мРНК *IL-10* в крови больных РПЖ по мере повышения размера опухолевого узла. Размер опухоли, определяемый по классификации TNM как T2, сопровождался снижением уровня мРНК *IL-10* в 2,1 раза (Me=1,237 (0,6202 – 2,020) отн. ед.) по сравнению с нормой (Me=2,638 (1,440 – 4,712) отн. ед.) ( $p<0,05$ ). В случаях классификации опухолевого очага как T3 содержание тестируемого показателя (Me=0,8219 (0,1030 – 1,951) отн. ед.) снижалось в 3,2 ( $p<0,05$ ) раза от уровня здоровых лиц (Табл. 3.3).

В подгруппе лиц, не имевших метастазов в регионарных лимфоузлах, уровень мРНК *IL-10* (Me=1,518 (1,518 – 1,518) отн. ед.) снижался по сравнению с нормой (Me=2,638 (1,440 – 4,712) отн. ед.) в 1,7 раза ( $p<0,05$ ). В случаях поражения лимфоузлов, тестируемый показатель был меньше значения в контрольной группы в 2,6 раза. Различия между подгруппами были статистически недостоверны, но в случаях распространенного опухолевого процесса имел место более низкий уровень мРНК *IL-10* – в 1,4 раза ( $p>0,05$ ). На II стадии заболевания уровень мРНК *IL-10* (Me=0,9500 (0,05068 – 1,956) отн. ед.) в периферической крови был ниже нормы (Me=2,638 (1,440 – 4,712) отн. ед.) в 2,8 раза ( $p<0,05$ ), на III стадии (Me=1,212 (0,2699 – 2,125) отн. ед.) – не отличался от показателей в контроле, на IV стадии (Me=0,1201 (0,1201 – 0,1201) отн. ед.) – повторно снижался ниже уровня здоровых лиц в 22,0 раза ( $p<0,05$ ) и был в 7,9 раза ниже, чем на II стадии ( $p>0,05$ ) и в 10,1 раза ( $p>0,05$ ) ниже, чем у лиц с III стадией РПЖ.

Таблица 3.3 - Уровень мРНК *IL-10* у больных раком предстательной железы с разными клинико-лабораторными показателями

Показатель	Величина	Кол-во здоровых лиц	Кол-во больных	Уровень мРНК <i>IL-10</i>	
				Медиана (25% – 75%)	
				Здоровые лица	Больные раком предстательной железы
Размер опухоли	T2	30	48	2,638 (1,440 – 4,712)	1,237* (0,6202 – 2,020)
	T3	30	25	2,638 (1,440 – 4,712)	0,8219* (0,1030 – 1,951)
Метастазы в лимфатические узлы	N0	30	56	2,638 (1,440 – 4,712)	1,518 (1,518 – 1,518)
	N1	30	6	2,638 (1,440 – 4,712)	1,029* (0,3119 – 2,012)
Отдаленные метастазы	M0	30	52	2,638 (1,440 – 4,712)	1,149* (0,6706 – 2,012)
	M1	30	8	2,638 (1,440 – 4,712)	0,8606* (0,09449 – 2,125)
Стадия заболевания	II	30	32	2,638	0,9500*

				(1,440 – 4,712)	(0,05068 – 1,956)
	III	30	24	2,638 (1,440 – 4,712)	1,212 (0,2699 – 2,125)
	IV	30	6	2,638 (1,440 – 4,712)	0,1201 (0,1201 – 0,1201)

\* – статистически значимые различия по сравнению со здоровыми лицами ( $p < 0,05$ )

Проведен ретроспективный анализ уровня мРНК *IL-10* в крови больных РПЖ с разным объемом оперативного вмешательства. У больных, которым после обследования была проведена радикальная простатэктомия, медиана уровня мРНК *IL-10* ( $Me=0,9980$  ( $0,1030 - 1,946$ ) отн. ед.) в предоперационном периоде была ниже значения здоровых лиц ( $Me=2,638$  ( $1,440 - 4,712$ ) отн. ед.) в 2,6 раза ( $p<0,01$ ). У больных, перенесших трансуретральную резекцию простаты, медиана уровня мРНК *IL-10* ( $Me=0,6202$  ( $0,6202 - 0,6202$ ) отн. ед.) в предоперационном периоде была ниже соответствующего показателя здоровых лиц в 4,3 раза ( $p<0,01$ ).

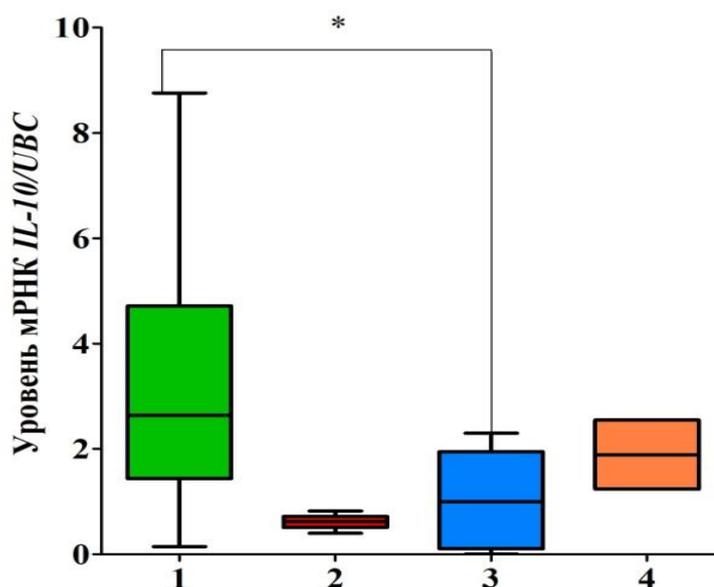


Рисунок 3.20 - Предоперационный уровень мРНК *IL-10* в периферической крови здоровых лиц и больных раком предстательной железы с разным объемом проведенного оперативного вмешательства

1 – здоровые лица,  $n=35$ ,

2 – группа больных раком простаты, перенесшая трансуретральную резекцию простаты,  $n=6$ ,

3 – группа больных раком простаты, перенесшая радикальную простатэктомию,  $n=51$ ,

4 – группа больных раком простаты, перенесшая биопсию простаты,  $n=6$ ,

\* – статистически значимые различия ( $p<0,05$ )

Для больных, у которых оперативное вмешательство ограничивалось биопсией простаты, уровень тестируемого показателя (Me=1,893 (1,237 – 2,548) отн. ед.) статистически значимо не отличался от уровня здоровых лиц, хотя и имел направленность к снижению (Рис. 3.20). Таким образом, уровень мРНК *IL-10* отражает степень оперативного вмешательства и в случаях ограничения оперативного пособия биопсией простаты не отличается от нормы. В то же время уровень мРНК *IL-10* в крови больных РПЖ в предоперационном периоде ниже 0,8 отн. ед. свидетельствует о целесообразности проведения трансуретральной резекции.

Можно заключить, что развитие РПЖ в целом сопровождалось статистически значимым снижением уровня мРНК *IL-10* в периферической крови больных. Однако степень снижения уровня мРНК *IL-10* варьирует у больных разного возраста, от уровня PSA, объема опухоли, коэффициента жесткости простаты. Больные с разным объемом назначенного оперативного вмешательства также имели различающиеся уровни мРНК *IL-10*.

Известно, что количество мРНК, считываемое с одного и того же гена, распределяется по разным тканям неравномерно и содержание белка в тканях зачастую не коррелирует с количеством мРНК. Это является следствием того, что регуляция экспрессии генов может осуществляться не только на уровне транскрипции, но и на пост-транскрипционном уровне [96]. Показано, что многие типы клеток экспрессируют мРНК *IL-10*, но не все производят определяемое количество белка, и уровни экспрессии белка сильно различаются. Большая часть этих вариаций может быть объяснена пост-транскрипционными механизмами. Так, множественные копии дестабилизирующих мРНК мотивов AUUUA и родственных последовательностей обнаружены в 3'-нетранслируемой области (UTR) мРНК *IL-10* и получены доказательства их РНК-дестабилизирующей активности. При этом, *IL-10* обладает аутоингибирующей активностью, тормозя собственный синтез за счет дестабилизации мРНК *IL-10* [105, 110].

Кроме того, в регуляции экспрессии *IL-10* важную роль играет микроРНК hsa-miR-106a, транскрипция которой, в свою очередь, регулируется факторами

Egr1 и Sp1. Показано, что hsa-miR-106a снижает экспрессию *IL-10* за счет деградации его мРНК. Зрелая hsa-miR-106a регулирует экспрессию *IL-10*, взаимодействуя с его 3'-UTR. Пост-транскрипционный контроль, опосредованный hsa-miR-106a, потенциально может участвовать в точной настройке критического уровня экспрессии *IL-10* контекстно-зависимым образом [75]. На примере колоректального рака показано, что экспрессия hsa-miR-106a у онкологических больных повышена и коррелирует со стадией развития опухоли, блокада *IL-10* резко усиливает противоопухолевый потенциал иммунной системы, существует значительная вариабельность между пациентами в отношении экспрессии *IL-10*, а низкие уровни *IL-10* связаны с более высоким риском заболевания [73, 155, 151]. Можно предположить, что hsa-miR-106a при РПЖ также влияет на уровень экспрессии гена *IL-10*, приводя к снижению уровня мРНК *IL-10*.

Ранее было показано, что низкая экспрессия *IL-10* в опухолевых клетках увеличивает риск неблагоприятного прогноза при раке молочной железы. Соотносительный уровень мРНК *IL-6/IL-10* намного выше у больных раком желудка с плохим прогнозом, а средний уровень *IL-10* в сыворотке крови был статистически значимо ниже у пациентов с колоректальным раком, чем у здоровых лиц, что соответствует полученным нами результатам по экспрессии мРНК *IL-10* у больных РПЖ [48, 89]. Кроме того, сообщается о том, что мыши с дефицитом *IL-10* более восприимчивы к спонтанному развитию опухолей кишечника по сравнению с животными дикого типа, а низкие уровни *IL-10* у пожилых мужчин связаны с более высоким риском развития РПЖ [101, 106].

Таким образом, выявленное снижение относительного уровня мРНК *IL-10* в крови больных РПЖ вероятно является следствием сложных иммунорегуляторных механизмов, реализуемых при патологии предстательной железы и отражает различия в иммунопатогенезе данных заболеваний.

В заключение нужно отметить, что у больных РПЖ была выявлена отрицательная корреляционная взаимосвязь между экспрессией в клетках крови генов, кодирующих FOXP3 и *IL-10* (Рис. 3.21).

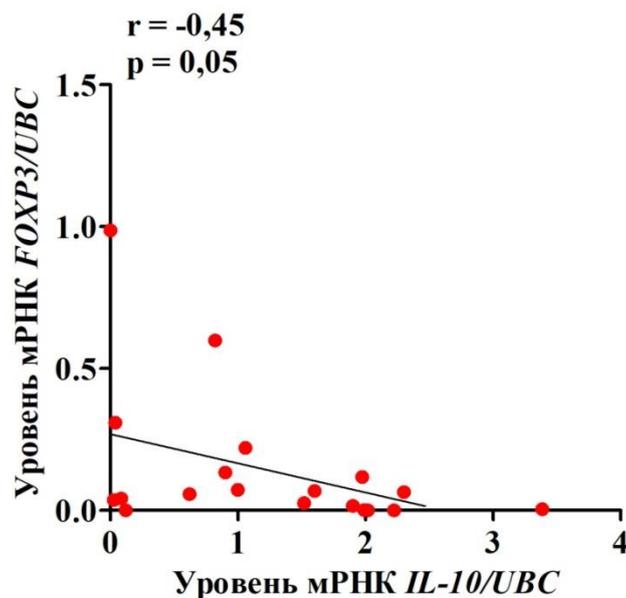


Рисунок 3.21 - Результаты анализа корреляционных взаимосвязей между уровнями мРНК FOXP3 и IL-10 в крови больных РПЖ

Как следует из рисунка 3.21, такая взаимосвязь была статистически достоверной ( $p=0,05$ ). Ее наличие находится в соответствии с представлениями о совместном участии *FOXP3* и *IL-10* в механизмах развития иммуносупрессии при онкологических заболеваниях.

### 3.3. Определение уровня мРНК *FOXP3* в опухолях больных раком предстательной железы

Известно, что в опухолях больных РПЖ происходит накопление повышенного количества регуляторных Т-клеток (Treg), которые принимают участие в подавлении иммунных реакций. Маркером Т-регуляторных клеток является, как известно, *FOXP3* [14]. Исследование опухолевых образцов у больных РПЖ показало, что мРНК *FOXP3* детектировалось в 49 образцах из 63 отобранных гистологических блоков (78%). Содержание мРНК *FOXP3* (Me 2,021 (1,077–3,960) отн. ед.) было статистически значимо выше, в 33,1 раза ( $p<0,001$ ), по сравнению с аналогичным показателем в крови пациентов. Не выявлено

корреляции между уровнем мРНК *FOXP3* в крови и опухолевой ткани больных раком предстательной железы ( $r=0,03$ ;  $p=0,85$ ) (Рис. 3.22).

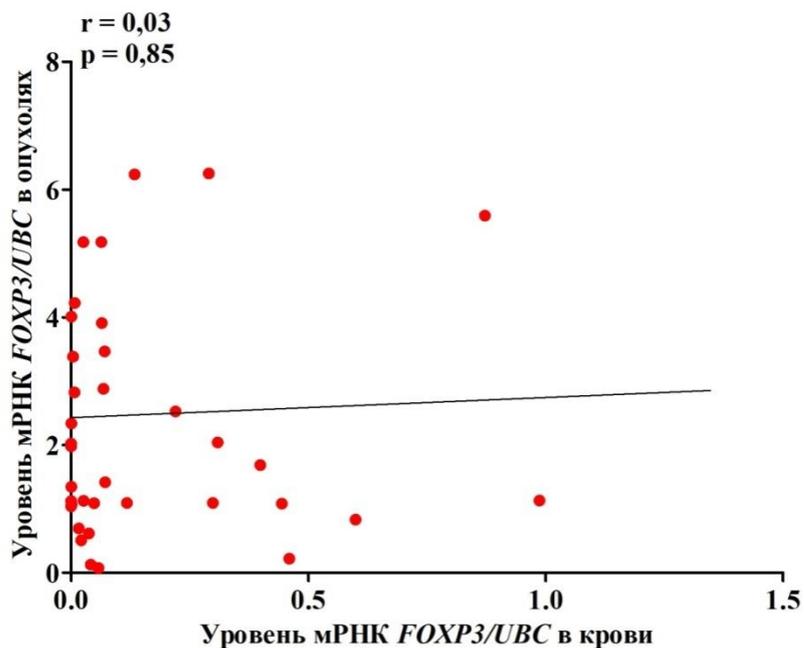


Рисунок 3.22 - Анализ корреляционных связей уровней мРНК *FOXP3* в периферической крови и опухолях больных раком предстательной железы,  $n=34$

Существует несколько механизмов, благодаря которым Treg осуществляют иммуносупрессивное действие. Treg могут связывать IL-2, тем самым подавляя активацию других T-клеток. Вследствие наличия на клеточной поверхности Treg эктоэнзимов CD39 и CD73, они способны модулировать подавление клеток через продукцию внеклеточного аденозина из аденозинтрифосфата, который является важной эндогенной сигнальной молекулой иммунитета и воспаления. Кроме того, Treg-клетками экспрессируется с высокой плотностью молекула CTLA-4, [150], которая подавляет иммунный ответ, являясь точкой иммунологического контроля. Причем *FOXP3* является наиболее точным маркером для идентификации Treg и служит главным регулирующим геном для развития и функционирования  $CD4^+CD25^{high}$  регуляторных T-клеток [32, 113]. Другим механизмом осуществления супрессорной функции Treg является цитотоксичность с участием гранзима А. Известно, что Treg могут подавлять иммунный ответ, обуславливая апоптоз [35]. Treg также способны продуцировать ингибирующие

цитокины: IL-10, IL-35, трансформирующий фактор роста бета и вовлечены в регуляцию периферической толерантности к собственным антигенам. Высокий уровень Treg в новообразовании определяет агрессивное течение опухолевого процесса и неблагоприятные клинические исходы при различных видах рака. Представлено несколько объяснений повышенной инфильтрации клеток Treg в ткани РПЖ [16]. Опухолевые клетки или макрофаги опухолевого микроокружения способны секретировать хемокин CCL22, обладающий сродством к рецептору CCR4, экспрессируемому на клетках Treg. Цитокины, секретируемые клетками опухоли предстательной железы, такими как трансформирующий фактор роста  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), могут регулировать экспрессию FOXP3 и увеличивать популяцию Treg. Кроме того, TGF- $\beta$  увеличивает выживаемость и пролиферацию трансформированных клеток. По данным некоторых исследований количество Treg в опухолевой ткани значительно превосходит их содержание в периферической крови больных РПЖ даже после выполнения им простатэктомии [6, 11]. Полученные нами данные по увеличению в образцах опухолевой ткани уровня мРНК *FOXP3* полностью соответствуют результатам этого исследования.

Не выявлено достоверных различий уровней мРНК *FOXP3* у пациентов разных возрастных групп. Тестируемый показатель составил у лиц в возрасте до 60 лет – Me=4,010 (4,010 - 4,010) отн. ед., 61 – 70 лет – Me 1,688 (1,088 – 2,995) отн. ед., 71 – 80 лет – Me=1,700 (1,049 – 2,688) отн. ед., старше 80 лет – Me=1,129 (0,8914 – 3,368) отн. ед. При этом с увеличением возраста прослеживалась статистически незначимая тенденция к снижению данного показателя ( $p>0,05$ ).

Проведено сопоставление уровня мРНК *FOXP3* у больных РПЖ, имевших разное содержание тестостерона и PSA в сыворотке крови. При сравнении подгрупп больных, имеющих в крови тестостерон в концентрации до 5 ммоль/л (Me=2,525 (1,071 – 5,180) отн. ед.) и 5 – 15 ммоль/л (Me=1,554 (1,084 - 2,868) отн. ед.) не выявлено статистически значимых различий в уровне мРНК *FOXP3* в опухоли. У больных с содержанием в крови PSA в концентрации 4 – 10 нг/мл (Me=1,688 (0,8443 – 3,960) отн. ед.) и более 10 нг/мл (Me=1,700 (1,090 – 2,600)

отн. ед.) различия в уровне мРНК *FOXP3* в опухоли были недостоверны (Табл. 3.4).

Таблица 3.4 - Уровень мРНК *FOXP3* в опухолевой ткани больных раком предстательной железы

Показатель	Величина	Кол-во больных	Уровень мРНК <i>FOXP3</i>
			Медиана (25% – 75%)
Уровень тестостерона (ммоль/л)	до 5	6	2,525 (1,071 – 5,180)
	5 – 15	57	1,554 (1,084 – 2,868)
	4 – 10	14	1,688 (0,8443 – 3,960)
	>10	48	1,700 (1,090 – 2,600)

При сравнении тестируемого показателя в опухолях пациентов, имевших различный коэффициент жесткости ткани предстательной железы, также не выявлено статистически значимых отличий у лиц с КЖ 4 – 10 Нм (Me=1,711 (1,034 – 3,988) отн. ед.) и более 10 Нм (Me=1,688 (1,085 – 2,676) отн. ед.), ( $p>0,05$ ). Увеличение объема предстательной железы сопровождалось статистически значимым снижением ( $p<0,05$ ) уровня мРНК *FOXP3*. У больных, имевших объем ПЖ более 50 см<sup>3</sup> (Me=1,083 (0,7535 – 2,000) отн. ед.), тестируемый показатель снижался в 2,7 раза ( $p<0,05$ ) по сравнению с группой лиц, у которых объем ПЖ составил до 25 см<sup>3</sup> (Me=2,881 (1,585 – 3,960) отн. ед.) (Рис. 3.23).

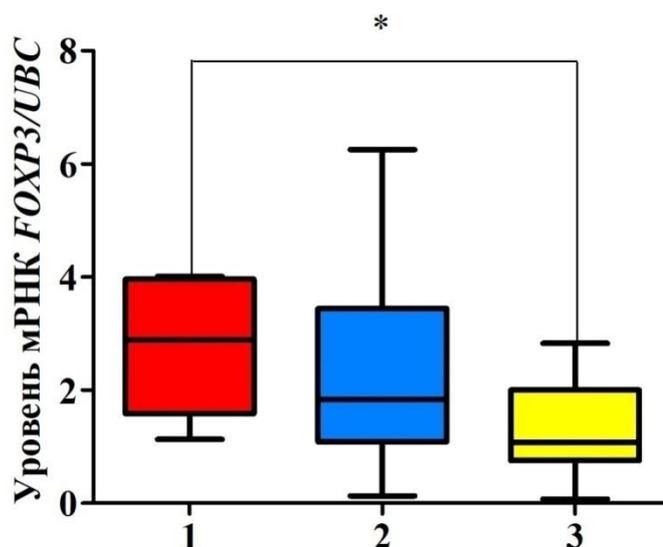


Рисунок 3.23 - Уровень мРНК *FOXP3* в опухолевой ткани больных раком предстательной железы с разным объемом опухоли

1 – больные с объемом предстательной железы до 25 см<sup>3</sup>, n=4,

2 – больные с объемом предстательной железы до 25 см<sup>3</sup> – 50 см<sup>3</sup>, n=43,

3 – больные с объемом предстательной железы более 50 см<sup>3</sup>, n=16,

\* – статистически значимые различия ( $p < 0,05$ )

Известно, что белок *FOXP3* в высокой степени экспрессируется не только в регуляторных Т-клетках, но и в опухолевых [108]. По мнению некоторых исследователей, экспрессия *FOXP3* в опухолевых клетках может быть плохим прогностическим фактором, например, при раке молочной железы [112, 128], но, в отличие от этих данных, показано, что *FOXP3* также является геном-супрессором опухоли [93]. Например, микроРНК-146a/b, индуцированная *FOXP3*, проявляет опухоль-супрессорную активность во время фазы инициации опухоли [58]. По данным Song X.L. et al. сверхэкспрессия микроРНК-618 ингибирует миграцию и инвазию РПЖ через ген *FOXP2* [141]. Согласно исследованию Wang L. et al. *FOXP3* подавляет в клетках РПЖ транскрипцию с-МЫС, которая часто активируется при данном заболевании, и модулирует экспрессию с-МЫС, препятствуя развитию РПЖ [93]. Напротив, потеря *FOXP3* и *TSC1* способствует прогрессированию РПЖ посредством транскрипционной и посттрансляционной регуляции с-МЫС [58]. Выявленное нами снижение уровня мРНК *FOXP3*,

сопровожающее увеличение объема органа, вероятно обусловлено аналогичными транскрипционными изменениями в злокачественно трансформированных клетках. Такие изменения вероятно перекрывают возможное повышение количества уровня *FOXP3*<sup>+</sup> Т-регуляторов в микроокружении опухоли.

Наличие локализованного очага в одной из долей предстательной железы или тотальное поражение органа опухолевым процессом не влияло на уровень мРНК *FOXP3* в опухолевой ткани. Во всех исследованных подгруппах тестируемый показатель достоверно не отличался ( $p > 0,05$ ), соответствуя при расположении опухоли в правой доле – Me=1,994 (1,083 – 2,0) отн. ед., в левой доле – Me=2,122 (1,086 – 4,010) отн. ед., в обеих долях – Me=1,981 (1,026 – 2,864) отн. ед.

В случаях выявления опухолей, соответствующих T2 по классификации TNM, уровень мРНК *FOXP3* соответствовал Me=1,554 (1,088 – 2,868) отн. ед., при опухолях, оцениваемых как T3 – Me=1,684 (0,8007 – 3,406) отн. ед., различия были не достоверны ( $p > 0,05$ ).

Таблица 3.5 - Уровень мРНК *FOXP3* у больных раком предстательной железы с разными стадиями по классификации TNM

Показатель	Величина	Кол-во больных	Уровень мРНК <i>FOXP3</i>
			Медиана (25% – 75%)
Стадия по классификации TNM	T2	40	1,554 (1,088 - 2,868)
	T3	24	1,684 (0,8007 - 3,406)
	T4	7	2,525 (1,903 - 3,621)

При наличии новообразования в предстательной железе, оцениваемого как T4 уровень мРНК *FOXP3* (Me=2,525 (1,903 - 3,621) отн. ед.) имел направленность к увеличению, превышая в 1,6 раза ( $p>0,05$ ) и в 1,5 раза ( $p>0,05$ ) показатели в альтернативных группах, однако различия не являлись статистически значимыми (Табл. 3.5).

У больных с коэффициентом Глисона до 6 баллов (Me=2,632 (1,042 – 4,223) отн. ед.), 6 – 7 баллов (Me=1,647 (0,617 – 3,260) отн. ед.) и более 7 баллов (Me=1,838 (0,5077 – 4,533) отн. ед.) значения тестируемого показателя статистически значимо не отличались ( $p>0,05$ ).

Вовлечение в опухолевый процесс периферических лимфоузлов не сопровождалось статистически значимыми изменениями в уровне мРНК *FOXP3* (Рис. 3.24).

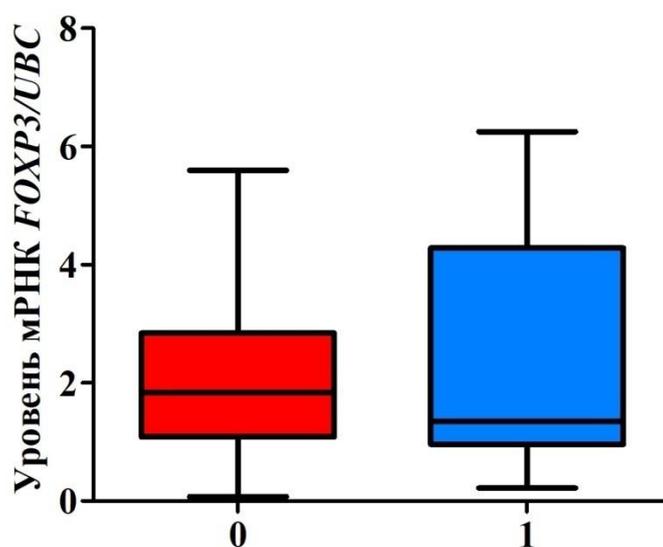


Рисунок 3.24 - Уровень мРНК *FOXP3* в опухолевой ткани больных раком предстательной железы с различным состоянием периферических лимфоузлов

1 – больные, не имеющие поражения периферических лимфоузлов, n=56,

2 – больные с поражением периферических лимфоузлов, n=7

В имеющейся литературе показано, что экспрессия *FOXP3* может иметь разное прогностическое значение. Так, в клеточных линиях гепатоцеллюлярного рака сверхэкспрессия *FOXP3* способствовала метастазированию и инвазии клеток

путем регуляции MMP-1 [127], а у больных HER2<sup>+++</sup> раком молочной железы наличие экспрессии FOXP3 в опухолевых клетках независимо предсказывало лучшую выживаемость после неoadъювантной химиотерапии [44]. По-видимому, менее высокий уровень мРНК *FOXP3* в ткани опухоли является одной из стратегий, используемых злокачественными клетками для подавления иммунитета, уклонения от иммунного надзора, повышения метастатического потенциала малигнизированных клеток, что проявляется, в частности, распространением опухолевого процесса на регионарные лимфоузлы.

Стадия опухолевого процесса не оказывала статистически значимого влияния на уровень мРНК *FOXP3* в опухолевой ткани больных. Прослеживалась тенденция к повышению величины тестируемого показателя у лиц с IV стадией (Me=2,317 (2,109 – 2,525) отн. ед.) опухолевого процесса в 1,8 ( $p>0,05$ ) и 1,5 ( $p>0,05$ ) раза по сравнению со II (Me=1,276 (1,082 – 3,098) отн. ед.) и III (Me=1,347 (0,766 – 3,426) отн. ед.) стадиями заболевания соответственно.

Уровень мРНК *FOXP3* в опухолевой ткани больных РПЖ статистически значимо ( $p>0,05$ ) не отличался у пациентов, которым по результатам обследования была выполнена в последующем радикальная простатэктомия (Me=1,981 (1,079 – 2,955) отн. ед.), ТУР (Me=2,042 (0,1301 – 4,223) отн. ед.) или биопсия предстательной железы (Me=1,855 (1,180 – 3,653) отн. ед.).

Таким образом, содержание мРНК *FOXP3* в опухолевой ткани больных РПЖ статистически значимо превышало его уровень в образцах крови пациентов. Большинство исследованных параметров, характеризующих течение опухолевого процесса, не оказывало значимого влияния на уровень мРНК *FOXP3* в опухолевой ткани больных раком предстательной железы. Изменения уровня мРНК *FOXP3* отмечались только у лиц с разным объемом предстательной железы.

### 3.4. Определение уровня мРНК *IL-10* в опухолях больных раком предстательной железы

Одним из цитокинов, продуцируемых  $FOXP3^+$  Т-регуляторами опухолевого микроокружения, является *IL-10*. В связи с этим, наряду с определением уровня мРНК *FOXP3*, мы провели оценку уровня мРНК *IL-10* в опухолевых очагах больных РПЖ. Выявлено, что РНК *IL-10* детектировалась в 43 образцах из 63 отобранных гистологических блоков (68,3%). Содержание РНК *IL-10* (Ме 0,567 (0,005 – 1,337) отн. ед.) в опухолевой ткани статистически значимо не отличалось от его содержания в крови пациентов с РПЖ. Корреляции между относительным уровнем мРНК *IL-10* в крови и опухолевой ткани больных РПЖ не было выявлено ( $r=0,09$ ;  $p=0,68$ ). Если в крови была обнаружена статистически значимая корреляция между уровнями мРНК *IL-10* и мРНК *FOXP3* ( $r=-0,45$ ,  $p=0,05$ ), то подобной корреляции между относительным уровнем мРНК *IL-10* и мРНК *FOXP3* в опухолях выявлено не было ( $r=-0,25$ ,  $p=0,27$ ). Вероятно, это связано с присутствием в крови и опухолевой ткани разных популяций клеток, продуцирующих данные транскрипты. Ген, кодирующий *IL-10*, как известно, транскрибируется во многих типах клеток в отличие от гена, кодирующего *FOXP3*, являющегося, в основном, маркером Treg [19].

Возраст пациентов не оказывал значимого влияния на уровень мРНК *IL-10* в опухолевой ткани больных. Уровень РНК *IL-10* у пациентов, в возрасте до 60 лет, составил Ме=0,8832 (0,6974 – 1,069) отн. ед.; в возрасте от 61 до 70 лет – Ме=0,5324 (0,1015 – 1,330) отн. ед.; 71 – 80 лет – Ме=0,3478 (0,005907 – 0,9462) отн. ед.; старше 80 лет – Ме=0,5251 (0,1040 – 1,023) отн. ед. Различия не были статистически значимыми ( $p > 0,05$ ). При разном содержании тестостерона в крови больных уровень мРНК *IL-10* в опухолевой ткани также не различался. У лиц с уровнем тестостерона до 5 ммоль/л (Ме=0,7635 (0,4752 – 1,052) отн. ед.) и 5 – 15 ммоль/л (Ме=0,6593 (0,06701 – 0,9999) отн. ед.) показатели статистически значимо не отличались ( $p > 0,05$ ). Уровень мРНК *IL-10* имел направленность к снижению ( $p > 0,05$ ) в случаях возрастания КЖ ткани предстательной железы,

однако различия показателей у лиц с КЖ 4 – 10 Нм ( $Me=0,8562$  ( $0,07033 - 1,214$ ) отн. ед.) и более 10 Нм ( $Me=0,3129$  ( $0,05970 - 0,8189$ ) отн. ед.) были недостоверны. Увеличение объема предстательной железы до  $25 \text{ см}^3$  ( $Me=0,7638$  ( $0,2346 - 0,9089$ ) отн. ед.), более 25 до  $50 \text{ см}^3$  ( $Me=0,5673$  ( $0,05882 - 1,214$ ) отн. ед.) или более  $50 \text{ см}^3$  ( $Me=0,1435$  ( $0,006479 - 0,8460$ ) отн. ед.), также не сопровождалось статистически значимыми изменениями уровня мРНК *IL-10* ( $p>0,05$ ). Величина тестируемого показателя в опухолевой ткани не зависела от расположения опухоли в предстательной железе: справа ( $Me=0,569$  ( $0,061 - 1,612$ ) отн. ед.), слева ( $Me=0,575$  ( $0,081 - 1,069$ ) отн. ед.) или в обеих долях предстательной железы ( $Me=0,542$  ( $0,001 - 0,873$ ) отн. ед.). Увеличение размера опухоли с Т2 ( $Me=0,6974$  ( $0,06701 - 1,052$ ) отн. ед.) до Т3 ( $Me=0,3129$  ( $0,007339 - 0,9771$ )) отн. ед.), также не сопровождалось появлением статистически значимых различий уровня мРНК *IL-10* ( $p>0,05$ ). Напротив, повышение содержания PSA в крови больных сопровождалось статистически значимым снижением уровня мРНК *IL-10* (Рис. 3.25). У больных с концентрацией PSA в крови более 10 нг/мл ( $Me=0,2202$  ( $0,005355 - 0,7792$ ) отн. ед.) содержание мРНК *IL-10* было в 5 раз ( $p<0,001$ ) ниже, чем у лиц с уровнем PSA до 4 нг/мл ( $Me=1,069$  ( $1,069 - 1,069$ ) отн. ед.) и в 4 раза ( $Me=0,9351$  ( $0,2151 - 1,553$ ) отн. ед.) ( $p<0,001$ ) ниже, чем у пациентов, имевших величину PSA 4 – 10 нг/мл. Уровень мРНК *IL-10* у больных с содержанием PSA до 4 нг/м и 4 – 10 нг/мл статистически значимо не различался.

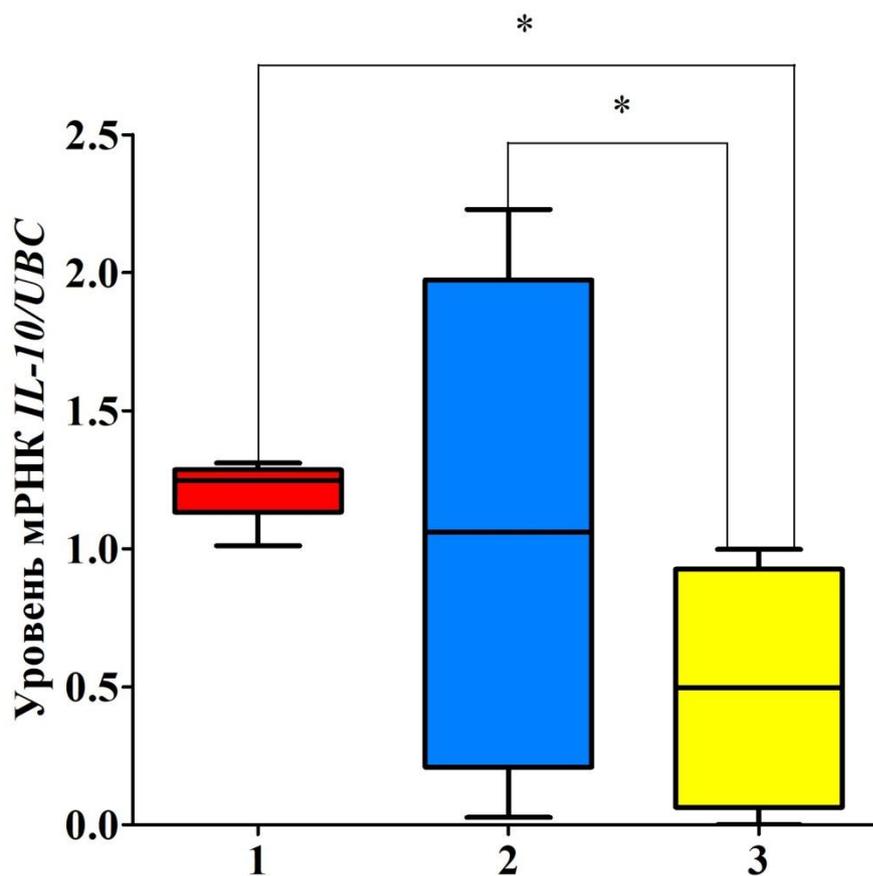


Рисунок 3.25 - Уровень мРНК *IL-10* в опухолевой ткани у больных раком предстательной железы с различным уровнем PSA в крови

1 – больные, имеющие уровень PSA до 4 нг/мл, n=7,

2 – больные, имеющие уровень PSA 4 – 10 нг/мл, n=14,

3 – больные, имеющие уровень PSA более 10 нг/мл, n=46,

\* – статистически значимые различия ( $p < 0,05$ )

Сходным образом, увеличению коэффициента Глисона более 7 баллов сопутствовала направленность к снижению уровня мРНК *IL-10* в 5,1 раза ( $p < 0,001$ ) по сравнению с его содержанием у лиц, имевших коэффициент Глисона до 6 баллов и в 2,8 раза ( $p > 0,05$ ) по сравнению с подгруппой больных, в которой коэффициент Глисона был 6 – 7 баллов (Рис. 3.26). Различия между больными с коэффициентом Глисона более 7 и 6 – 7 баллов были статистически незначимы.

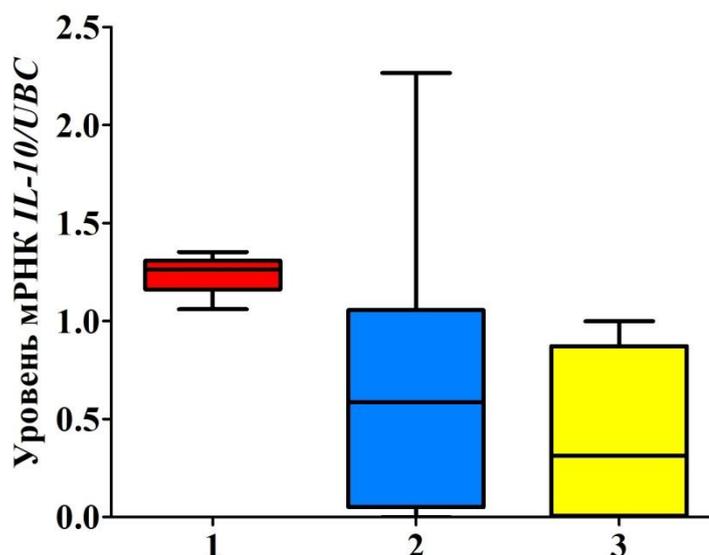


Рисунок 3.26 - Уровень мРНК *IL-10* в опухолевой ткани больных раком предстательной железы с разным коэффициентом Глисона

1 – больные с коэффициентом Глисона до 6 баллов, n=9,

2 – больные с коэффициентом Глисона 6 – 7 баллов, n=38,

3 – больные с коэффициентом Глисона более 7 баллов, n=16

Заметим, что в крови картина изменений относительного уровня мРНК *IL-10* с повышением концентрации PSA и коэффициента Глисона имела сходный характер (см. подраздел 3.1.2). Выявленная статистически не значимая тенденция к понижению может быть связана с повышающимися концентрациями PSA, способного дозозависимо воздействовать на экспрессию генов [33]. При этом важным фактором, с нашей точки зрения, является ауторегуляторное действие повышающихся концентраций *IL-10* в опухолевой ткани на ген, кодирующий *IL-10*, по принципу обратной связи.

Появление метастазов в регионарных лимфоузлах (Me=0,6593 (0,08029 – 1,052) отн. ед.) не сопровождалось появлением статистически значимых отличий тестируемого показателя в образцах опухолевой ткани, в сравнении с его значениями у лиц с интактными лимфоузлами (Me=0,007909 (0,002190 – 0,7850) отн. ед.). У больных с II и III стадиями опухолевого процесса уровень мРНК *IL-10* составил величины, равные (Me=0,7374 (0,1780 – 1,056)) отн. ед. ) и (Me=0,2203 (0,006769 – 0,9794) отн. ед.) и статистически значимо не различался.

Значения тестируемого показателя в предоперационном периоде достоверно не отличались у лиц, которым в последующем была выполнена радикальная простатэктомия (Me=0,6974 (0,007326 – 0,8076) отн. ед.), ТУР предстательной железы (Me=0,2151 (0,2151 – 0,2151) отн. ед.) или биопсия предстательной железы (Me=1,069 (0,06701 – 1,553) отн. ед.).

Таким образом, в образцах опухолевой ткани больных РПЖ уровень мРНК *IL-10* не отличался от его уровня в крови. Значение тестируемого показателя не менялось от возраста пациентов, при разном уровне тестостерона в крови, коэффициенте жесткости ткани предстательной железы, объеме и расположении опухоли в железе, при разном размере самой опухоли, наличии метастазов в регионарных лимфоузлах, стадии заболевания. Однако, уровень мРНК *IL-10* в образцах опухолевой ткани, как и в крови, был статистически значимо ниже у лиц с более высоким содержанием PSA в периферической крови. Выявленная тенденция к падению уровня мРНК *IL-10* обнаруживалась также у больных с более высоким коэффициентом Глисона. Уровень мРНК *IL-10* в образцах опухолевой ткани не отличался у лиц, которым был выполнен различный объем оперативного вмешательства – радикальная простатэктомия, трансуретральная резекция или биопсия предстательной железы.

В целом, представленные в главе 3 результаты свидетельствуют о том, что развитие опухолевого процесса в предстательной железе сопровождается изменениями в относительном уровне мРНК *FOXP3* и мРНК *IL-10* в крови и опухолевой ткани больных РПЖ. В крови больных РПЖ медиана относительного уровня мРНК *FOXP3* в группе, включающей всех обследованных больных, была статистически значимо повышена в сравнении со здоровыми лицами. Наибольшие величины регистрировались у больных в возрасте 61 – 70 лет. Уровень мРНК *FOXP3* был повышен при разных концентрациях тестостерона и PSA, при различных значениях коэффициента Глисона, увеличивался с повышением коэффициента жесткости простаты и стадии опухолевого процесса. Наиболее высокие уровни мРНК *FOXP3* обнаруживались у больных с объемом предстательной железы 25 – 50 см<sup>3</sup>. Повышенный уровень сохранялся при разной

локализации опухоли, различной вовлеченности лимфоузлов, разной степени злокачественности по классификации TNM. При этом больные, у которых уровень хирургического вмешательства ограничивался биопсией простаты, имели относительное содержание мРНК *FOXP3*, не отличающееся от содержания в крови здоровых лиц.

Медиана относительного уровня мРНК *IL-10* в крови больных РПЖ в целом характеризовалась понижением в сравнении с уровнем здоровых лиц. Возрастные особенности изменения уровня мРНК *IL-10* не зарегистрированы, также как изменения, связанные с разной концентрацией в крови тестостерона, со степенью злокачественности опухоли по классификации TNM, с разным коэффициентом жесткости простаты и локализацией опухоли. Однако обнаружено, что с повышением концентрации PSA в крови больных, объема простаты, коэффициента Глисона, стадии заболевания происходило более выраженное падение уровня мРНК *IL-10*. Уровень мРНК *IL-10* оказался равным уровню здоровых лиц у больных, которым было назначено ограниченное хирургическое вмешательство в виде биопсии. При сопоставлении относительных уровней мРНК *FOXP3* и мРНК *IL-10* в крови больных РПЖ выявлена статистически значимая отрицательная корреляция средней степени, свидетельствующая об их совместной роли в иммунопатогенетических механизмах, связанных с формированием молекулярной картины угнетения иммунного ответа при развитии РЖ.

В образцах опухолевой ткани содержание мРНК *FOXP3* было выше ( $p < 0,001$ ), а мРНК *IL-10* было сходно с образцами крови пациентов. Различия в уровне мРНК *FOXP3* отмечались только у лиц с разным объемом предстательной железы и разным состоянием регионарных лимфоузлов. Уровень мРНК *IL-10* в опухоли изменялся, как и в крови, при повышении концентрации PSA у больных РПЖ и имел выраженную тенденцию к падению при повышении коэффициента Глисона. Корреляционной связи между уровнями мРНК *FOXP3* и мРНК *IL-10* в опухолях больных РПЖ не обнаружено. Вероятно, это связано с присутствием в микроокружении опухоли не только Т-регуляторов, но и других клеток,

обладающих, в том числе, иммуносупрессивным действием и отличающимся от Т-регуляторов профилем транскрипции генов.

## ГЛАВА 4

### Характеристика уровней мРНК *FOXP3* и *IL-10* у больных доброкачественной гиперплазией предстательной железы

#### 4.1. Определение уровня мРНК *FOXP3* в периферической крови здоровых лиц и больных доброкачественной гиперплазией предстательной железы

В соответствии с представлениями о патогенезе доброкачественной гиперплазии предстательной железы (ДГПЖ), обсуждаемыми в настоящее время, это заболевание является многофакторным. В его развитии и прогрессировании участвуют несколько механизмов, однако, ведущим является хроническое воспаление. То есть ДГПЖ является иммуновоспалительным заболеванием, при котором активация Т-клеток и связанные с ней аутоиммунные реакции индуцируют пролиферацию эпителиальных и стромальных клеток. Хроническое воспаление в предстательной железе вызывает выработку факторов роста, активацию стволовых клеток и клеточную пролиферацию [119]. В результате индуцируется гиперплазия, действующая как самоподдерживающийся цикл, приводящий к хроническому воспалению и прогрессирующему увеличению объема простаты [91]. Провоспалительные гуморальные и клеточные факторы в норме уравниваются противовоспалительными факторами. При воспалительных заболеваниях обычно наблюдается сложная картина взаимоотношений между ними, что отражается на особенностях патогенеза заболеваний. При ДГПЖ активно исследуются провоспалительные клетки и продуцируемые ими цитокины [46]. Противовоспалительным факторам отводится меньшее внимание. В связи с этим мы поставили в настоящем исследовании

задачи, связанные с оценкой уровня мРНК *FOXP3* и мРНК *IL-10* у больных ДГПЖ.

При определении уровня мРНК *FOXP3* в периферической крови здоровых лиц и больных ДГПЖ установлено, что мРНК *FOXP3* детектировалась во всех исследуемых образцах. У больных ДГПЖ уровень мРНК *FOXP3* (Me=0,009 (0,003 – 0,030) отн. ед) был выше в 7 раз ( $p<0,0001$ ), чем у здоровых лиц (Me=0,001279 (0,003442 – 0,03449), но в 6 раз ( $p<0,05$ ) ниже, чем у пациентов с РПЖ (Me=0,05316 (0,005219 – 0,2726) (Рис.4.1).

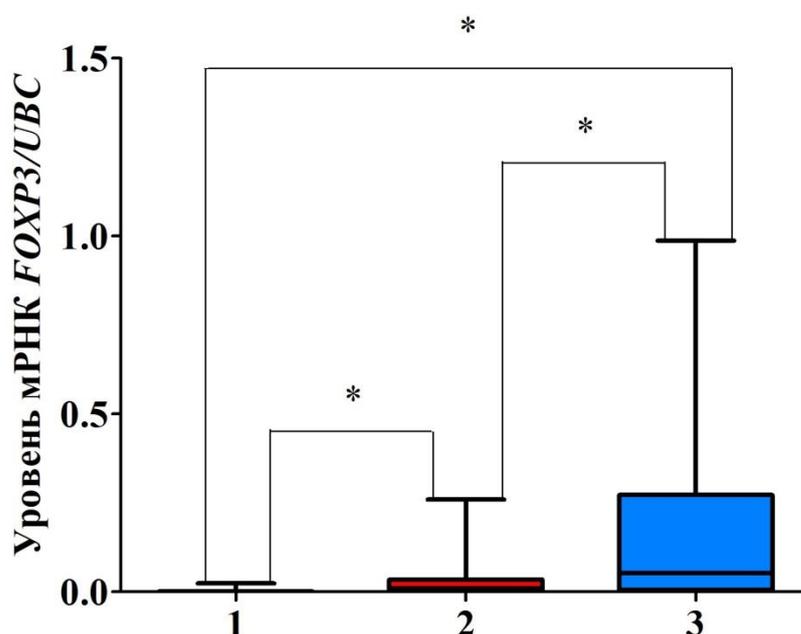


Рисунок 4.1 - Уровень мРНК *FOXP3* в периферической крови здоровых лиц, больных доброкачественной гиперплазией предстательной железы и больных раком предстательной железы

1 – здоровые лица, n=35,

2 – больные ДГПЖ, n=52,

3 – больные РПЖ, n=63,

\* – статистически значимые различия ( $p<0,05$ )

В ранее проведенных исследованиях показано возрастание числа Treg в периферической крови у больных раком предстательной железы по сравнению со здоровыми мужчинами [84]. В работе Zhou L. et al. показано, что инфильтрация

Трег раковой ткани в предстательной железе была более выраженной, чем доброкачественной ткани, а  $FOXP3^+$ -позитивные клетки чаще встречались при раке, чем в ткани при доброкачественной гиперплазии ( $p < 0,01$ ) [164]. Подобные различия выявлены нами в периферической крови больных РПЖ и ДГПЖ.

Относительное содержание мРНК *FOXP3* в крови больных ДГПЖ повышалось с увеличением возраста пациента. В возрастной группе до 60 лет ( $Me = 0,008963$  ( $0,003924 - 0,01400$ ) отн. ед.), исследуемый показатель был в 1,3 раза ниже ( $p < 0,01$ ), а у больных в возрасте 61 – 70 лет ( $Me = 0,004134$  ( $0,001486 - 0,01580$ ) отн. ед.) в 2,8 раза ниже, чем у пациентов в возрасте 71 – 80 лет ( $Me = 0,01167$  ( $0,006172 - 0,03975$ ) отн. ед.) (Рис. 4.2). Корреляционный анализ показал наличие статистически значимой ( $p = 0,05$ ), но слабой связи ( $r = 0,37$ ) между возрастом и уровнем мРНК *FOXP3*.

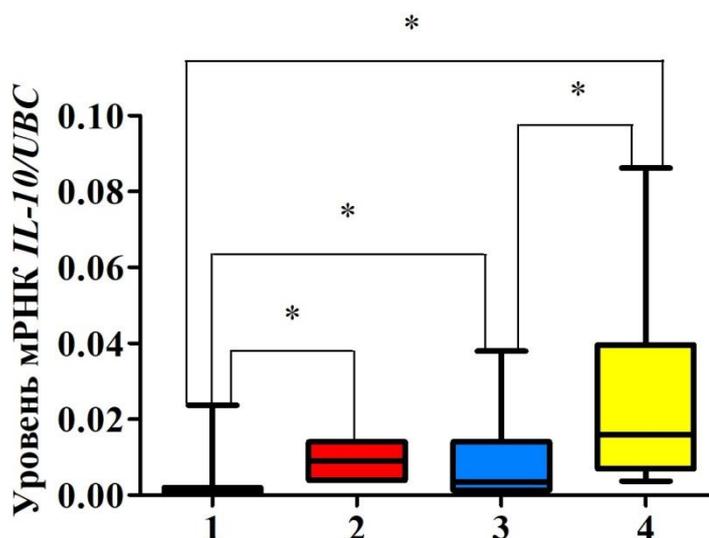


Рисунок 4.2 - Уровень мРНК *FOXP3* в периферической крови здоровых лиц и больных доброкачественной гиперплазией предстательной железы разного возраста

1 – здоровые лица,  $n=35$ ,

2 – пациенты в возрасте до 60 лет,  $n=9$ ,

3 – пациенты в возрасте 61 – 70 лет,  $n=26$ ,

4 – пациенты в возрасте 71 – 80 лет,  $n=17$ ,

\* – статистически значимые различия ( $p < 0,05$ )

При старении эффективность функционирования иммунной системы уменьшается, снижается интенсивность иммунных реакций, происходит уменьшение активности клеточного и гуморального иммунитета, сокращаются резервные возможности регуляции иммунного гомеостаза [88]. С возрастом стареющие клетки накапливаются в тканях человека, включая простату. Стареющие клетки имеют измененную функцию, включая повышенную экспрессию провоспалительных цитокинов, факторов роста и протеаз. Все они могут изменять функционирование окружающих их клеток. Это явление известно как секреторный фенотип, связанный со старением. Стареющие клетки, которые накапливаются с возрастом, могут вносить свой вклад в фенотип старения и возрастные патологии, секретирова факторы, которые действуют паракринным образом на близлежащие клетки и внеклеточный матрикс. Показано, что старение с годами может приводить к повышению содержания регуляторных Т-клеток и изменению уровня экспрессии FOXP3 [120]. Выявленные нами изменения в уровне мРНК FOXP3 в крови больных ДГПЖ разного возраста, вероятно, отражают неадекватность функционирования иммунитета у лиц старшей возрастной группы на фоне роста доброкачественной опухоли.

Уровень мРНК FOXP3 сохранялся повышенным при разных концентрациях тестостерона в крови больных, статистически значимо не различаясь при содержании тестостерона до 5 ммоль/л, от 5 до 15 ммоль/л или более 15 ммоль/л ( $p > 0,05$ ). Во всех исследованных группах содержание мРНК FOXP3 в крови оставалось достаточно стабильным и соответствовало  $Me = 0,01004$  (0,004796 – 0,03265) отн. ед.,  $Me = 0,009226$  (0,002694 – 0,03565) отн. ед. и  $Me = 0,01400$  (0,01400 – 0,01400) отн. ед.

Известна связь андрогенов с возникновением и развитием ДГПЖ [164]. При этом показано, что уровни тестостерона, циркулирующие в сыворотке, обычно снижаются с возрастом и андрогены не являются основной причиной прогрессирования ДГПЖ, что соответствует полученным нами результатам [80].

При разных концентрациях простатического специфического антигена (PSA) уровень мРНК FOXP3 в крови больных ДГПЖ оставался статистически

значимо повышенным в сравнении со здоровыми лицами. Так у больных ДГПЖ, имевших уровень PSA до 4 нг/мл ( $Me=0,009810$  ( $0,002997 - 0,03449$ ) отн. ед.), он был повышен в 8 раз, в сравнении с нормой ( $Me=0,001279$  ( $0,0004792 - 0,002014$ ) отн. ед.), у больных, имевших уровень PSA от 4 до 10 нг/мл ( $Me=0,01280$  ( $0,005889 - 0,03363$ ) отн. ед.), он был повышен в 10 раз, у больных ДГПЖ, имевших уровень PSA более 10 нг/мл, он был повышен в 12 раз ( $Me=0,015348$  ( $0,0057504 - 0,024168$ ) отн. ед.) ( $p=0,0295$ ) (Рис. 4.3).

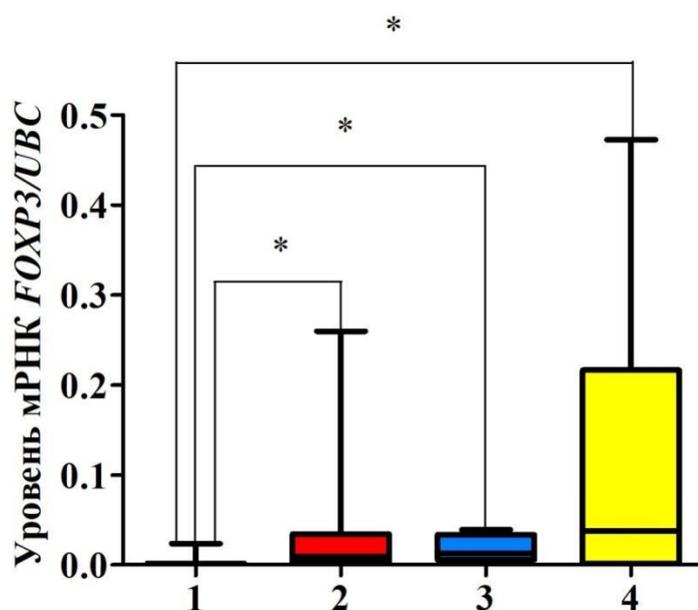


Рисунок 4.3 - Уровень мРНК *FOXP3* в периферической крови здоровых лиц и больных доброкачественной гиперплазией предстательной железы с разной концентрацией PSA в крови

1 – здоровые лица,  $n=35$ ,

2 – пациенты с уровнем PSA ниже 4 нг/мл,  $n=44$ ,

3 – пациенты с уровнем PSA от 4 нг/мл до 10 нг/мл,  $n=4$ ,

4 – пациенты с уровнем PSA более 10 нг/мл,  $n=4$ ,

\* – статистически значимые различия ( $p<0,05$ )

Изменения коэффициента жесткости (КЖ) ткани предстательной железы также не сопровождались значимыми изменениями в уровне мРНК *FOXP3* в крови больных ДГПЖ. У пациентов, имевших КЖ простаты до 4 Нм ( $Me=0,01004$  ( $0,003546 - 0,03350$ ) отн. ед.) или в диапазоне 4 – 10 Нм ( $Me=0,01007$  ( $0,002997 -$

0,03484) отн. ед.), содержание мРНК *FOXP3* статистически значимо не различалось. Однако в обоих случаях сохранялись достоверные различия уровня мРНК *FOXP3* в сравнении со здоровыми лицами (Me=0,001279 (0,0004792 – 0,002014) отн. ед.) ( $p < 0,0001$ ).

Увеличение объема предстательной железы сопровождалось тенденцией к повышению уровня мРНК *FOXP3* в крови пациентов. Если у больных ДГПЖ, имевших объем простаты до 25 см<sup>3</sup> (Me=0,006172 (0,006172 – 0,006172) отн. ед.), он был повышен в сравнении со здоровыми лицами (Me=0,001279 (0,0004792 – 0,002014) отн. ед.) в 5,0 раз ( $p < 0,001$ ), то при объеме простаты более 50 см<sup>3</sup> (Me=0,02009 (0,003394 – 0,03957) отн. ед.) уровень мРНК *FOXP3* был больше нормы в 16 раз ( $p < 0,001$ ) (Рис. 4.4).

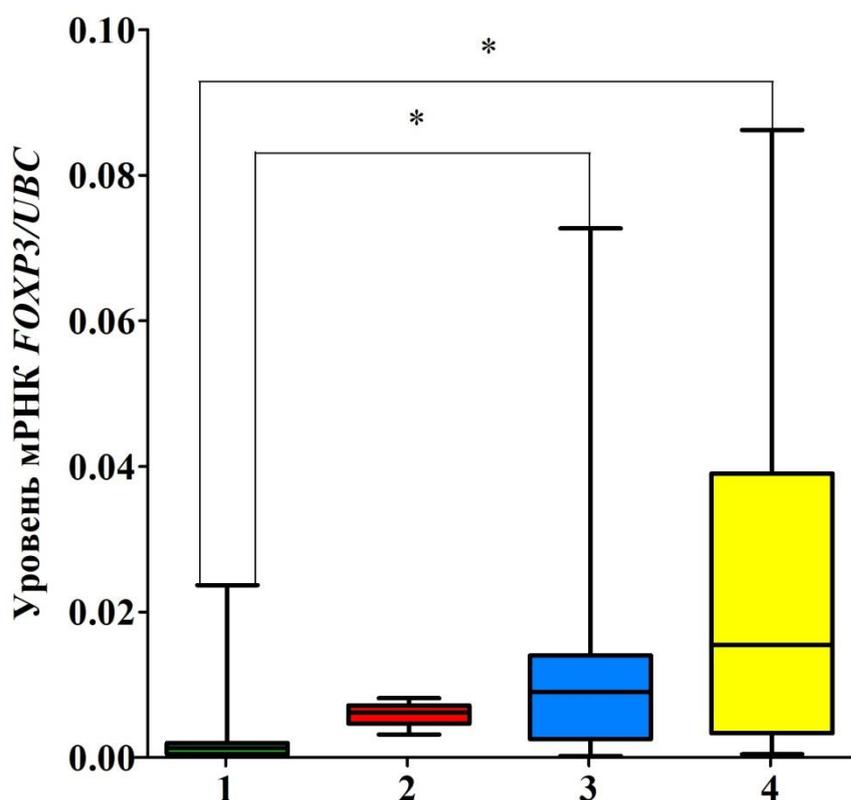


Рисунок 4.4 - Уровень мРНК *FOXP3* в периферической крови здоровых лиц и больных доброкачественной гиперплазией предстательной железы с ее разным объемом

1 – здоровые лица, n=35

2 – больные с объемом предстательной железы до 25 см<sup>3</sup>, n=6,

3 – больные с объемом предстательной железы от 25 см<sup>3</sup> до 50 см<sup>3</sup>, n= 26,

4 – больные с объемом предстательной железы более 50 см<sup>3</sup>, n=20,

\* – статистически значимые различия ( $p < 0,05$ )

Корреляционный анализ показал отсутствие статистически значимых взаимосвязей между уровнем мРНК *FOXP3* в крови больных ДГПЖ, содержанием тестостерона, концентрацией PSA, жесткостью и объемом предстательной железы.

Содержание мРНК *FOXP3* в крови больных также не было связано с локализацией опухоли в ПЖ. В случаях расположения опухолевых очагов в обеих долях ПЖ уровень мРНК *FOXP3*, был в 2 раза ниже, чем у больных с локализованной опухолью, но отличие оказалось статистически незначимым ( $p > 0,05$ )  $Me = 0,006$  (0,004 – 0,034) отн. ед. и  $Me = 0,012$  (0,003 – 0,032) отн. ед., соответственно. При этом тестируемые показатели у пациентов оставались статистически значимо выше ( $p < 0,05$ ), чем у здоровых лиц.

Уровень мРНК *FOXP3* оставался достаточно стабильным независимо от диаметра опухолевого узла, и не различался при размере очагов до 3,5 см ( $Me = 0,01004$  (0,001889 – 0,01558) отн. ед.), более 3,5 до 5 см ( $Me = 0,009226$  (0,003713 – 0,07269) отн. ед.), более 5,0 см ( $Me = 0,01091$  (0,002790 – 0,03867) отн. ед.) ( $p > 0,05$ ). Однако, во всех обследованных группах больных было отмечено статистически значимое увеличение уровня мРНК *FOXP3* по сравнению со здоровыми лицами ( $Me = 0,001279$  (0,0004792 – 0,002014) отн. ед.) ( $p < 0,05$ ).

Содержание мРНК *FOXP3* в крови достоверно не отличалось в предоперационный период у лиц, которым была выполнена ТУР простаты ( $Me = 0,009226$  (0,003490 – 0,03333) отн. ед.) или аденомэктомия ( $Me = 0,01091$  (0,002090 – 0,03938) отн. ед.). В обеих подгруппах пациентов имели место достоверные отличия уровня мРНК *FOXP3* от показателя здоровых лиц ( $Me = 0,001279$  (0,0004792 – 0,002014) отн. ед.) ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, уровень мРНК *FOXP3* в крови больных доброкачественной гиперплазией предстательной железы достоверно превышал аналогичный показатель здоровых лиц, что прослеживалось во всех группах больных, и был

статистически значимо ниже, чем у больных РПЖ. Содержание мРНК *FOXP3* повышалось с увеличением возраста пациента. Уровень мРНК *FOXP3* статистически значимо не менялся при разном уровне тестостерона и PSA в периферической крови больных, коэффициенте жесткости ткани и объеме простаты, расположении и размере опухолевого узла и не отличалась у пациентов, перенесших трансуретральную резекцию простаты или аденомэктомию.

#### 4.2. Определение уровня мРНК *IL-10* в периферической крови здоровых лиц и больных доброкачественной гиперплазией предстательной железы

При определении уровня мРНК *IL-10* в периферической крови больных ДГПЖ и здоровых лиц установлено, что мРНК *IL-10* детектировалась во всех исследуемых образцах. У больных ДГПЖ уровень мРНК *IL-10* (Me=1,310 (0,5724 – 2,595) отн. ед.) был ниже в 2,0 раза ( $p < 0,01$ ) по сравнению со здоровыми лицами (Me=2,638 (1,440 – 4,712) отн. ед.) и в 1,1 раза выше ( $p < 0,05$ ), чем у больных РПЖ (Me=1,149 (0,3119 – 2,012) отн. ед.) (Рис. 4.5).

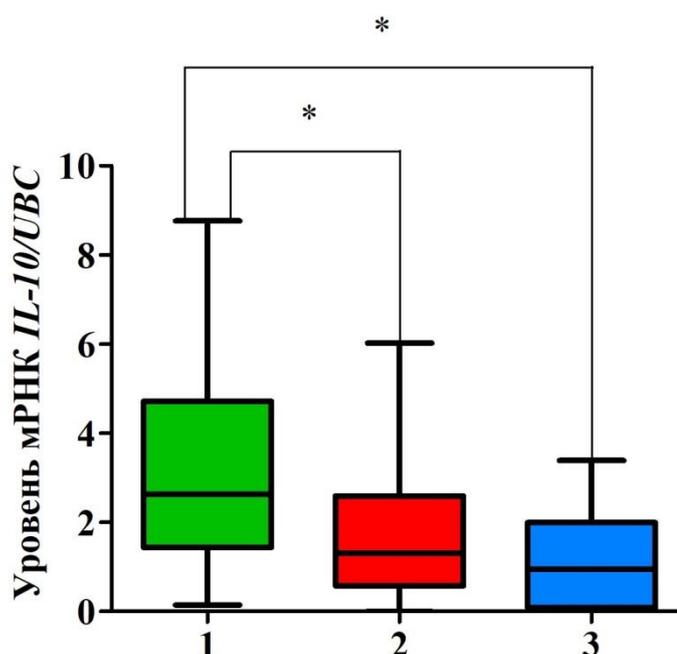


Рисунок 4.5 - Уровень мРНК *IL-10* в периферической крови здоровых лиц, больных доброкачественной гиперплазией предстательной железы и больных раком предстательной железы

1 – здоровые лица, n=35,

2 – больные ДГПЖ, n=52,

3 – больные РПЖ, n=63,

\* – статистически значимые различия ( $p < 0,05$ )

Выявленное снижение относительного уровня мРНК *IL-10* в крови больных РПЖ и ДГПЖ является следствием сложных иммунорегуляторных механизмов, рассмотренных в главе 3, реализуемых при патологии предстательной железы, и отражает различия в иммунопатогенезе этих заболеваний.

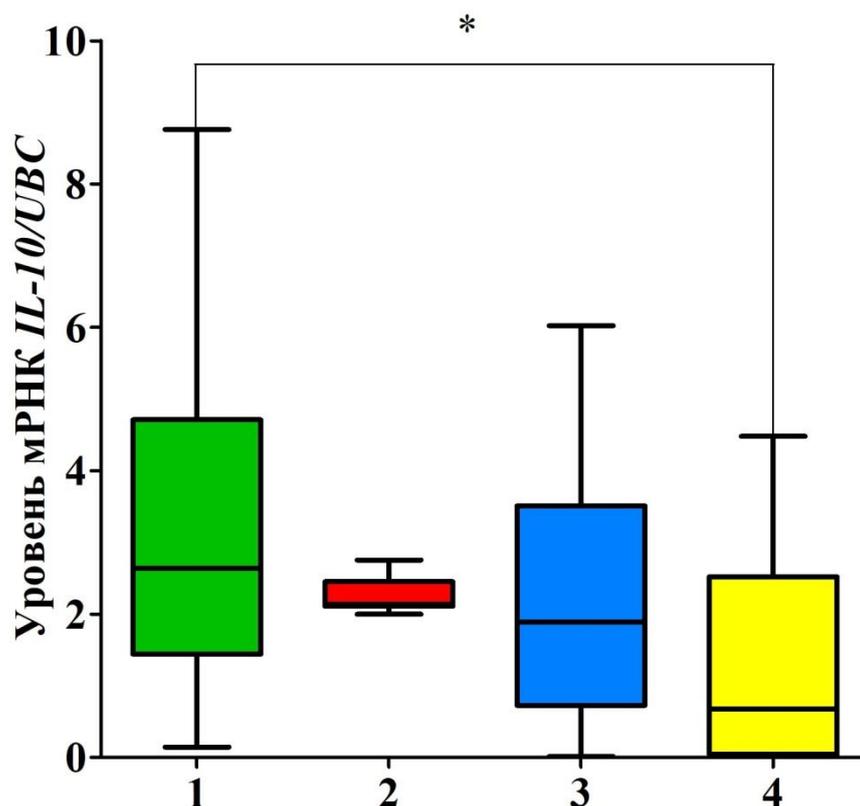


Рисунок 4.6 - Уровень мРНК *IL-10* в периферической крови здоровых лиц и больных доброкачественной гиперплазией предстательной железы разного возраста

1 – здоровые лица, n=35,

2 – больные в возрасте до 60 лет, n=9,

3 – больные в возрасте 61 – 70 лет, n=26,

4 – больные в возрасте 71 – 80 лет, n=17,

\* – статистически значимые различия ( $p < 0,05$ )

У пациентов в возрасте до 70 лет, исследуемый показатель ( $Me=2,138$  (2,131 – 2,144) отн. ед.) не отличался от уровня здоровых лиц ( $Me=2,638$  (1,440 – 4,712) отн. ед.), но у больных в возрасте до 71 – 80 лет, уровень мРНК *IL-10* ( $Me=0,9905$  (0,2015 – 2,814) отн. ед.) был статистически значимо ниже нормы. (Рис. 4.7). Статистически значимых корреляций между возрастом и уровнем тестируемого показателя не выявлено ( $r=-0,34$ ,  $p=0,10$ ). Вероятно, выявленная картина изменений уровня мРНК *IL-10* связана с возрастными особенностями изменения концентрации тестостерона в крови пожилых лиц, наблюдавшимися Lenzi A. et al. [97].

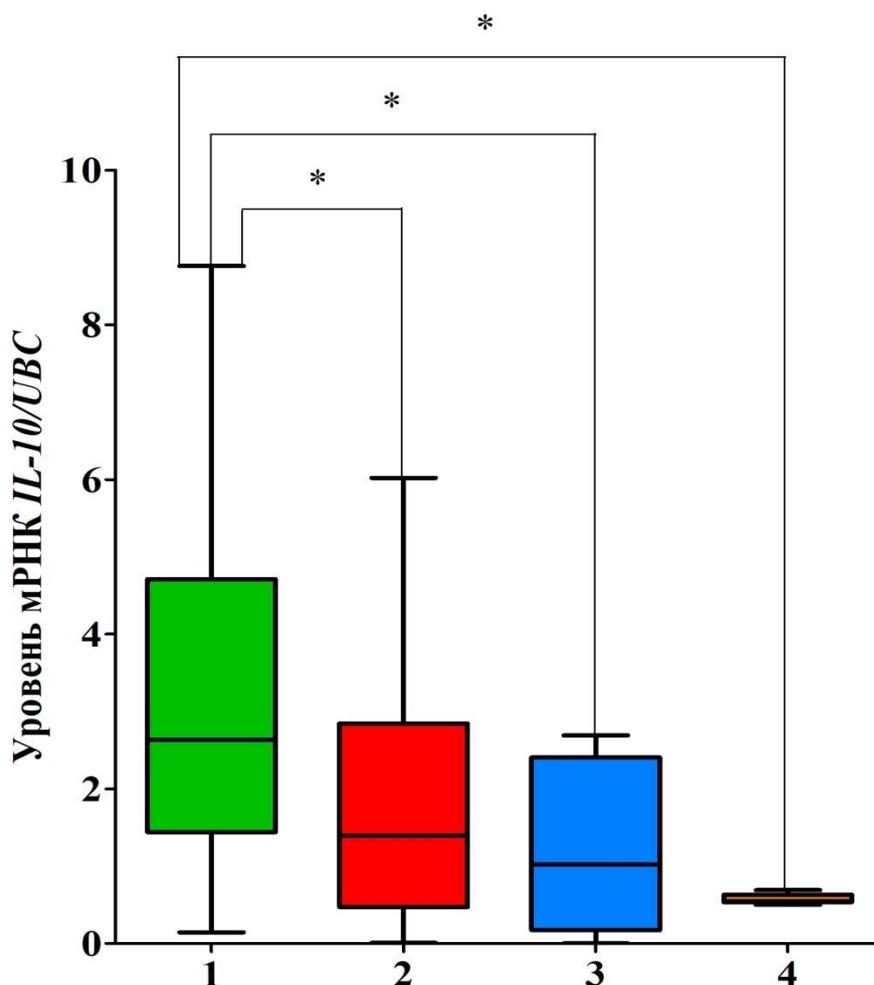


Рисунок 4.7 - Уровень мРНК *IL-10* в периферической крови здоровых лиц больных доброкачественной гиперплазией предстательной железы с разной концентрацией PSA

1 – здоровые лица, n=35,

2 – больные с уровнем PSA до 4 нг/мл, n=45,

3 – больные с уровнем PSA 4 – 10 нг/мл, n= 5,

4 – больные с уровнем PSA более 10 нг/мл, n=3,

\* – статистически значимые различия ( $p < 0,05$ )

Уровень мРНК *IL-10* статистически значимо не различался при содержании тестостерона в крови больных 5 – 15 ммоль/л (Me=1,481 (0,3162 – 2,595) отн. ед.) и содержании тестостерона до 5 ммоль/л (Me=0,7144 (0,6192 – 2,519) отн. ед.) ( $p > 0,05$ ). Как низкие, так и высокие уровни PSA (более 10 нг/мл) (Me=0,5457 (0,5457 – 0,5457) отн. ед.) сопровождалось статистически значимым снижением уровня мРНК *IL-10* в сопоставлении с нормой (Me=2,638 (1,440 – 4,712) отн. ед.) ( $p = 0,0050$ ). Наиболее выраженные изменения были зафиксированы при высоких уровнях PSA. При этом корреляционных связей между тестируемыми показателями не выявлено ( $r = -0,11$ ,  $p = 0,60$ ). Выявленные изменения вероятно обусловлены способностью PSA, дозозависимо воздействовать на экспрессию генов [33]. PSA представляет собой сериновую протеазу, обладающую многонаправленным действием. Благодаря протеолитической активности PSA может высвобождать свободный биоактивный инсулиноподобный фактор роста-1 [124]. Показано, что PSA в опухолевых клетках при РПЖ модулирует экспрессию более 700 генов, участвующих в ангиогенезе, росте опухоли и метастазировании, стимулирует выработку активных форм кислорода, на мышинных моделях снижает скорость роста опухоли [117]. PSA действует как на транскрипционном, так и трансляционном уровне, оказывая дозозависимое внутриклеточное и межклеточное влияние на биологические механизмы и играя важную роль в патогенезе рака простаты [60]. Вероятно, ген, кодирующий *IL-10*, также подвержен дозозависимому модулирующему действию PSA.

Возрастание коэффициента жесткости ткани предстательной железы не

сопровождалось значимыми изменениями уровня мРНК *IL-10* в периферической крови больных. Прослеживалась лишь направленность к снижению показателя у лиц с КЖ 4 – 10 Нм ( $Me=0,6795$  ( $0,01240 - 5,970$ ) отн. ед.) в 2,0 раза ( $p>0,05$ ) по сравнению с показателями лиц ( $Me=1,706$  ( $0,6450 - 2,546$ ) отн. ед.), имевшими КЖ до 4 Нм.

Увеличению объема предстательной железы сопутствовала статистически не значимая направленность к снижению продукции мРНК *IL-10*. Так, у больных с объемом простаты до  $25 \text{ см}^3$  уровень тестируемого показателя ( $Me=4,481$  ( $4,481 - 4,481$ ) отн. ед.) превышал в 3 раза ( $p>0,05$ ) его значения у пациентов с объемом железы более 25 до  $50 \text{ см}^3$  ( $Me=1,310$  ( $0,7493 - 2,497$ ) отн. ед.) и в 7 раз ( $p>0,05$ ) показатели лиц с объемом простаты более  $50 \text{ см}^3$  ( $Me=0,6795$  ( $0,009946 - 2,496$ ) отн. ед.) Во всех приведенных выше случаях также отсутствовали статистически значимые корреляции.

Преимущественная локализация опухоли в обеих или в одной доле предстательной железы не оказывала влияния на уровень мРНК *IL-10*, в сравниваемых группах больных исследуемый показатель достоверно не различался, составляя  $Me=1,310$  ( $0,5991 - 2,692$ ) отн. ед. и  $Me=1,066$  ( $0,0007521 - 2,131$ ) отн. ед. соответственно ( $p>0,05$ ).

Не информативным оказалось и сопоставление продукции мРНК *IL-10* с размерами опухолевого узла. Показатели у пациентов, имевших опухоль до 3,5 см, до 5 см и более 5 см, в наибольшем диаметре статистически достоверно не отличались, составляя  $Me=1,219$  ( $0,6192 - 3,426$ ) отн. ед.,  $Me=1,306$  ( $0,01117 - 2,350$ ) отн. ед.,  $Me=1,931$  ( $0,003745 - 5,970$ ) отн. ед., соответственно ( $p>0,05$ ). Регистрировалось статистически значимое увеличение уровня мРНК *IL-10* у пациентов с размером опухоли до 5 см и более 5 см при сравнении со здоровыми лицами ( $p<0,05$ ).

У больных, которым была выполнена ТУР, уровень мРНК *IL-10* в предоперационный период ( $Me=1,481$  ( $0,6297 - 2,595$ ) отн. ед.) статистически значимо снижался в 2 раза по сравнению со здоровыми лицами ( $Me=2,638$  ( $1,440 - 4,712$ ) отн. ед.). При биопсии предстательной железы в предоперационный

период регистрировалось многократное снижение уровня мРНК *IL-10* ( $Me=0,0007521$  ( $0,0007521 - 0,0007521$ ) отн. ед.) как по сравнению со здоровыми лицами, так и с лицами которым впоследствии была выполнена ТУР (Рис. 4.8).

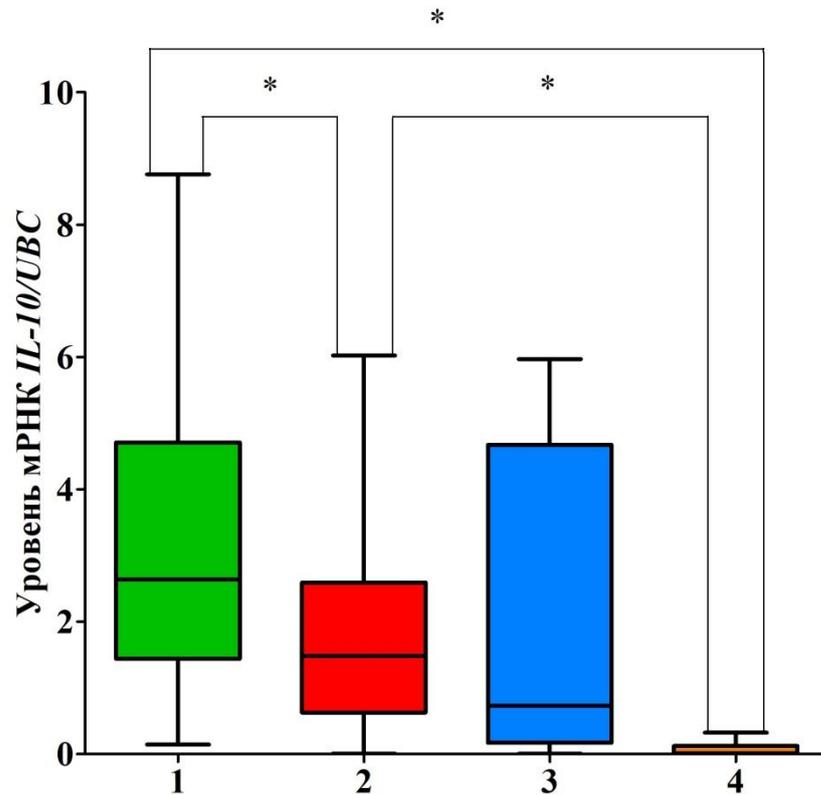


Рисунок 4.8 - Уровень мРНК *IL-10* в периферической крови здоровых лиц и больных доброкачественной гиперплазией предстательной железы с разным объемом оперативной помощи

1 – здоровые лица,  $n=35$ ,

2 – больные, которым была выполнена трансуретральная резекция,  $n=33$ ,

3 – больные, которым была выполнена аденомэктомия,  $n=12$ ,

4 – больные, которым была выполнена биопсия,  $n=7$ ,

\* – статистически значимые различия ( $p<0,05$ )

Вероятно, снижение уровня мРНК *IL-10* в периферической крови больных с более крупными опухолями, лечение которых в хирургическом плане было ограничено только биопсией, отражает сложные иммунологические механизмы развития опухолевого процесса, приводящие к прогрессированию заболевания и связанные с низким уровнем мРНК *IL-10*, который падает в результате работы иммунорегуляторных механизмов, связанных с аутоингибирующими свойствами

IL-10, как обсуждалось в разделе 3. Неоперабельные опухоли сопровождались минимальным уровнем мРНК *IL-10* в крови, что можно рассматривать как показатель неоперабельности опухоли. Десятикратное и более снижение уровня мРНК *IL-10* в крови больных служит в 90 % случаев показанием к проведению биопсии.

Таким образом, у больных доброкачественной гиперплазией предстательной железы уровень мРНК *IL-10* в периферической крови был ниже, чем у здоровых лиц. Изменения уровня мРНК *IL-10* выявлены при разном содержании PSA в крови больных, наблюдались у больных разного возраста. При разном содержании тестостерона, разном объеме предстательной железы, коэффициенте жесткости ткани простаты, локализации и размера опухолевых узлов различий в его уровне не обнаруживалось, но во всех случаях относительное содержание мРНК *IL-10* было снижено в сравнении с его уровнями в крови здоровых лиц. Уровень мРНК *IL-10* в предоперационном периоде был статистически достоверно ниже в крови пациентов с исходно не операбельной опухолью, что позволяет предполагать возможную дифференциально диагностическую значимость данного показателя.

#### **4.3. Определение уровня мРНК *FOXP3* в опухолях больных доброкачественной гиперплазией предстательной железы**

В настоящее время считается, что ДГПЖ является иммуновоспалительным заболеванием. Предполагается, что воспалительные клетки влияют на нормальный эпителий предстательной железы, трансформируясь в постатрофическую гиперплазию, которая, в свою очередь, может привести к развитию рака предстательной железы прямо или косвенно через прогрессирование в интраэпителиальную неоплазию предстательной железы [140]. Следовательно, присутствие Т-регуляторных клеток в нормальной ткани предстательной железы может влиять на развитие доброкачественной опухоли.

В связи с этим мы определяли в опухолях больных ДГПЖ относительный уровень мРНК *FOXP3*, который является маркером Т-регуляторных клеток. В опухолевой ткани больных ДГПЖ мРНК *FOXP3* детектировалась в 46 (88,5%) исследуемых образцах. Средний относительный уровень мРНК *FOXP3* в ткани (Me=2,406 (1,028 – 4,528) отн. ед.) было в многократно выше ( $p < 0,001$ ) значений данного показателя в периферической крови (Рис. 4.9). Уровни мРНК *FOXP3* в крови и в опухолевой ткани не коррелировали ( $r=0,08$ ,  $p=0,70$ ) между собой, что свидетельствовало о независимости изменений уровней мРНК *FOXP3* в ткани опухоли и крови больных.

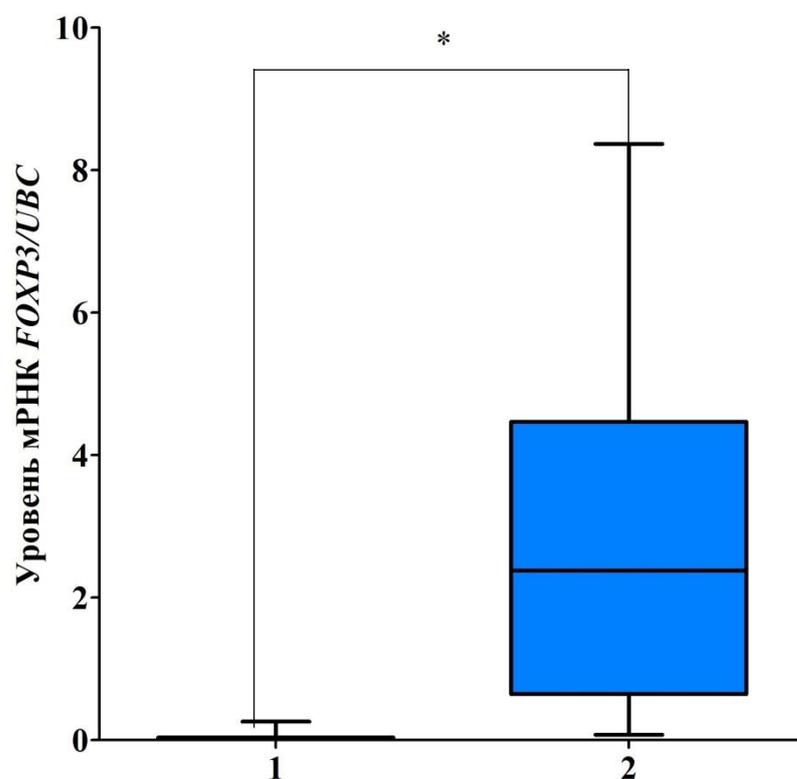


Рисунок 4.9 - Уровень мРНК *FOXP3* в периферической крови и опухолевой ткани больных доброкачественной гиперплазией предстательной железы

1 – уровень мРНК *FOXP3* в крови пациентов, n=52,

2 – уровень мРНК *FOXP3* опухолевой ткани, n=52,

\* – статистически значимые различия ( $p < 0,05$ )

Вероятно более высокий уровень мРНК *FOXP3* в опухолевой ткани больных ДГПЖ, чем в крови, свидетельствует о его роли в механизмах развития

опухоли на местном уровне, возможно за счет воздействия на иммунные процессы через Т-регуляторы. По данным Davidsson S. et al. ДГПЖ развивается непосредственно в рак предстательной железы в присутствии CD4<sup>+</sup>Treg, причем трансформация противоопухолевого иммунного ответа может быть инициирована еще до образования первичной опухоли [48]. Wang X. et al. была продемонстрирована корреляция между экспрессией *FOXP3* и канцерогенезом [35].

Уровень мРНК *FOXP3* у больных ДГПЖ в опухоли не отличался от соответствующих значений у лиц с РПЖ ( $p>0,05$ ). Полученные нами данные не соответствуют результатам ранее проведенного исследования показавшего, что инфильтрация раковой ткани в предстательной железе регуляторными Т-клетками была более выраженной, чем в доброкачественной ткани, а *FOXP3*<sup>+</sup> – позитивные клетки чаще встречались при раке, чем в ткани ДГПЖ [58]. Возможно, различия в полученных результатах связаны с разными методическими подходами, использованными в исследованиях. В нашем исследовании с помощью ОТ-ПЦР определялся уровень мРНК *FOXP3*, а в исследовании коллег иммуногистохимически определялось содержание Т-регуляторных клеток, экспрессирующих белок *FOXP3*.

Возраст пациентов с ДГПЖ не влиял на относительный уровень мРНК *FOXP3* в опухоли. Уровень мРНК *FOXP3* у больных в возрасте до 60 лет (Me=4,707 (3,818 – 5,596) отн. ед.), 61 – 70 лет (Me=2,353 (0,8050 – 4,301) отн. ед.) и 71 – 80 лет (Me=2,636 (0,6415 – 4,689) отн. ед.) достоверно не отличался, хотя у больных с возрастом до 60 лет уровень мРНК *FOXP3* имел тенденцию к более высокому содержанию ( $p>0,05$ ).

Напротив, повышение уровня тестостерона в крови больных сопровождало изменению уровня мРНК *FOXP3* в опухолевой ткани больных ДГПЖ (Рис. 4.10). Увеличение концентрации тестостерона в крови больных более 15 ммоль/л сопровождалось статистически значимым ( $p<0,01$ ) возрастанием уровня мРНК *FOXP3* (Me=5,596 (5,596 – 5,596) отн. ед.) в опухолевой ткани ДГПЖ по сравнению с показателями лиц, имевших уровень тестостерона до 5 ммоль/л

( $Me=3,047$  ( $2,380 - 6,540$ ) отн. ед.) в 2 раза и от 5 до 15 ммоль/л ( $Me=2,122$  ( $0,6759 - 4,356$ ) отн. ед.) в 3 раза, соответственно. Полученные данные соответствуют недавно полученным результатам других авторов, свидетельствующих о том, что тестостерон является фактором, влияющим на экспрессию *FOXP3* у Т-регуляторов [27].

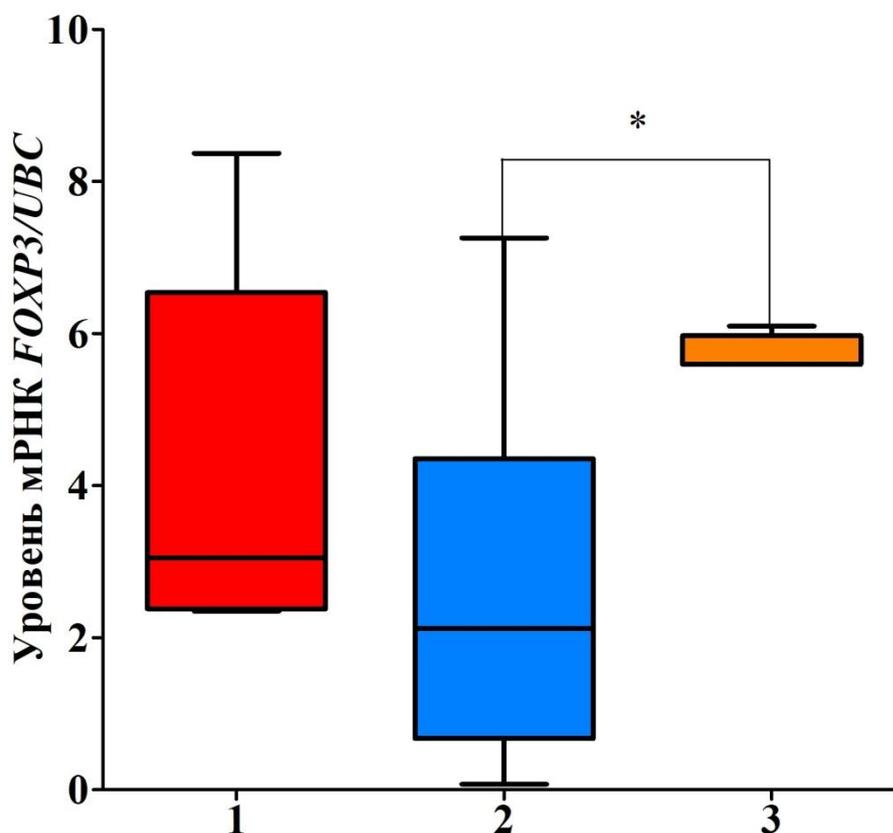


Рисунок 4.10 - Уровень мРНК *FOXP3* в опухолевой ткани больных доброкачественной гиперплазией предстательной железы с разным уровнем тестостерона

1 – уровень тестостерона в крови больных до 5 ммоль/л,  $n=15$ ,

2 – уровень тестостерона в крови больных более 5 до 15 ммоль/л,  $n=34$ ,

3 – уровень тестостерона в крови больных более 15 ммоль/л,  $n=3$ ,

\* – статистически значимые различия ( $p<0,05$ )

Известно, что сигнальный путь андрогенных рецепторов играет важную роль в нормальном развитии и гомеостазе предстательной железы. При достижении пороговых значений тестостерона могут изменяться биохимические и

клеточные процессы, связанные с этими рецепторами (регуляция клеточного цикла, адгезия, апоптоз и ремоделирование внеклеточного матрикса), что способно привести к развитию патологии предстательной железы [1].

Изменения в уровне PSA в крови больных ДГПЖ не сопровождались изменениями в относительном содержании мРНК *FOXP3* в ткани опухоли. Показатели мРНК *FOXP3* достоверно не различались у лиц с уровнем PSA до 4 нг/мл (Me=2,225 (0,5700 – 4,301) отн. ед.) и при концентрации PSA от 4 до 10 нг/мл (Me=3,432 (2,102 – 4,703) отн. ед.).

Уровень мРНК *FOXP3* в ткани ДГПЖ менялся при изменении объема предстательной железы. У больных, имевших объем железы до 25 мм<sup>3</sup> уровень мРНК *FOXP3* (Me=0,5584 (0,5584 – 0,5584) отн. ед.) был статистически значимо ниже ( $p<0,001$ ) в 6 раз, чем у пациентов с объемом простаты более 50 мм<sup>3</sup> (Me=3,197 (1,197 – 4,314) отн. ед.) (Рис. 4.11).

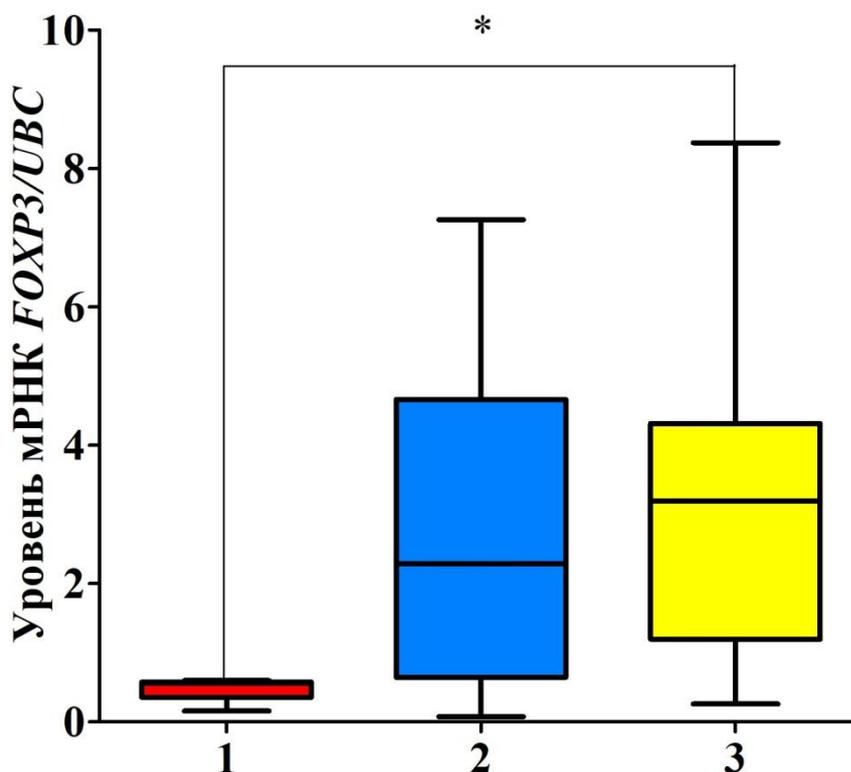


Рисунок 4.11 - Уровень мРНК *FOXP3* в опухолевой ткани больных доброкачественной гиперплазией предстательной железы с разным объемом опухоли

1 – объем простаты до 25 мм<sup>3</sup>, n=6,

2 – объем простаты более 25 до 50 мм<sup>3</sup>, n=26,

3 – объем простаты более 50 мм<sup>3</sup>, n=20,

\* – статистически значимые различия (p<0,05)

Хорошо известна роль хронического воспаления предстательной железы в развитии ДГПЖ. Провоспалительное микроокружение доброкачественной опухоли связано как с накоплением клеточных и растворимых провоспалительных факторов, таких как, например Th17 клетки и продуцируемый ими IL-17, так и уравновешивающих их противовоспалительных факторов. К ним в первую очередь относятся FOXP3<sup>+</sup>T-регуляторы [46, 84]. Прогрессирование ДГПЖ сопровождается увеличением объема простаты и накоплением T-регуляторов, что проявляется в виде обнаруженного нами повышения уровня мРНК *FOXP3*. То есть, повышение уровня мРНК *FOXP3* по мере роста объема железы можно рассматривать как фактор неблагоприятного прогноза заболевания, а увеличение размера предстательной железы происходит, в том числе, на фоне присутствия большего количества FOXP3<sup>+</sup> Treg.

Не отмечено достоверных различий в уровне мРНК *FOXP3* при разных показателях КЖ предстательной железы. У пациентов, имевших КЖ ткани до 4 Нм, уровень мРНК *FOXP3* составил величину, равную (Me=2,225 (0,6692 – 4,646) отн. ед.) и статистически значимо не отличался от уровня тестируемого показателя у больных с КЖ от 4 до 10 Нм (Me=3,619 (2,296 – 4,707) отн. ед.). Уровень мРНК *FOXP3* в опухоли также статистически значимо не менялся (p>0,05) при разных размерах опухолевого узла. При размере узла в наибольшем измерении до 3,5 см уровень мРНК *FOXP3* составил величину, равную Me=2,225 (0,5700 – 3,729) отн. ед., до 5 см – величину, равную Me=3,582 (1,319 – 7,537) отн. ед., при размере узла более 5 см уровень мРНК *FOXP3* равнялся (Me=4,192 (4,192 – 4,192) отн. ед.). Статистически значимых корреляционных связей во всех описанных выше случаях не выявлено.

Локализация опухоли в обеих долях предстательной железы не сопровождалась статистически значимыми изменениями уровня мРНК *FOXP3* по

сравнению с уровнем мРНК *FOXP3* у лиц, имеющих локализованный очаг только в одной доле простаты (Рис. 4.12).

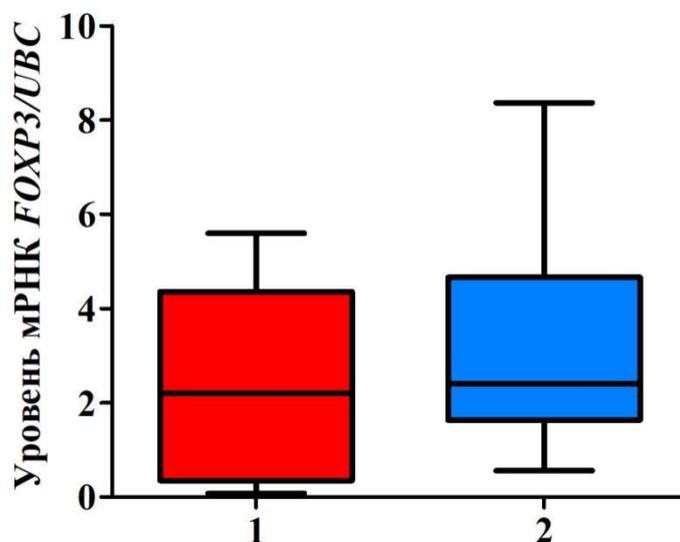


Рисунок 4.12 - Уровень мРНК *FOXP3* в опухолевой ткани больных доброкачественной гиперплазией предстательной железы с разной распространенностью опухолевого процесса

1 – локализация опухоли в одной доле предстательной железы, n=24,

2 – локализация опухоли в обеих долях предстательной железы, n=28

Уровень мРНК *FOXP3* в опухолевой ткани больных ДГПЖ достоверно не различался между пациентами, которым по клиническим показаниям была выполнена ТУР простаты или аденомэктомия ( $p > 0,05$ ), хотя отмечалась направленность к повышению уровня мРНК *FOXP3* в 2 раза у лиц, поступивших на аденомэктомию (Me=3,619 (3,047 – 4,192) отн. ед.) по сравнению с альтернативной группой (Me=2,289 (0,6036 – 4,587) отн. ед.).

Таким образом, повышение относительного уровня мРНК *FOXP3* в опухолевой ткани больных ДГПЖ наблюдалось при повышении концентрации тестостерона в крови больных и при повышении объема простаты, но не обнаруживались у пациентов разного возраста, пациентов с разным коэффициентом жесткости простаты, с разным размером опухоли и уровнем PSA в крови больных и разной распространенностью опухоли. У больных ДГПЖ,

получивших разные виды оперативного вмешательства (трансуретральная резекция предстательной железы или аденомэктомия), в предоперационный период также не отмечено изменений уровня мРНК *FOXP3* в ткани опухоли.

#### **4.4. Определение уровня мРНК *IL-10* в опухолях больных доброкачественной гиперплазией предстательной железы**

Воспаление присуще заболеваниям предстательной железы, и в настоящее время признано, что оно может способствовать клеточной пролиферации как при доброкачественных, так и при злокачественных состояниях. Тесная взаимосвязь между воспалением предстательной железы и патогенезом ДГПЖ подтверждается эпидемиологическими, гистопатологическими и молекулярными данными [45]. Важную роль в уравнивании воспалительных процессов играют Т-регуляторы и продуцируемые ими цитокины. В связи с этим наряду с экспрессией гена, кодирующего маркер Т-регуляторов *FOXP3*, мы оценили в опухолях больных ДГПЖ уровень экспрессии гена, кодирующего *IL-10*.

При определении уровня мРНК *IL-10* у больных ДГПЖ установлено, что мРНК детектировалась в 45 (86,5%) исследуемых образцах опухолевой ткани. Содержание мРНК *IL-10* ( $M_e=1,380$  (0,169 – 3,163) отн. ед.) достоверно не отличалась от соответствующего показателя в крови пациентов. Не выявлено корреляции значений тестируемого показателя в крови и опухолевой ткани ( $r=0,23$ ,  $p=0,27$ ), что свидетельствовало о независимости изменений уровней мРНК *IL-10* в ткани ДГПЖ и в крови пациентов. Содержание мРНК *IL-10* в опухолевой ткани ДГПЖ также статистически значимо не различалось с уровнем в образцах опухолевой ткани больных РПЖ (Рис. 4.13).

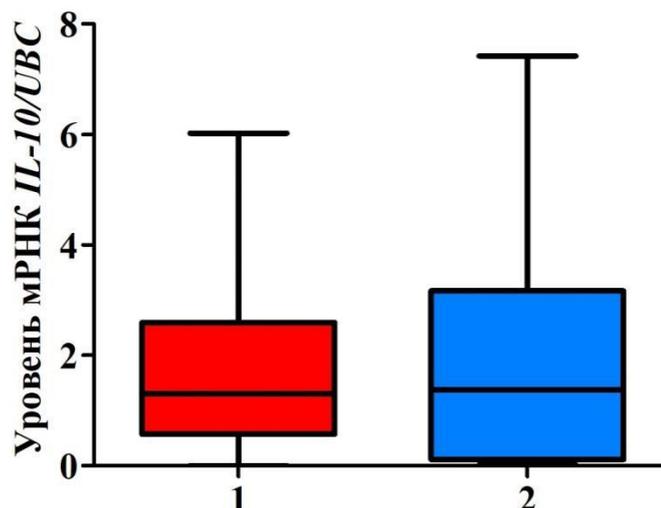


Рисунок 4.13 - Уровень мРНК *IL-10* в образцах опухолевой ткани больных доброкачественной гиперплазией предстательной железы и раком предстательной железы

1 – больные доброкачественной гиперплазией предстательной железы, n=52

2 – больные раком предстательной железы, n=63

Ранее сообщалось, что содержание IL-10 в образцах опухолевой ткани больных ДГПЖ ниже, чем в ткани карциномы предстательной железы [31, 35]. Полученные нами данные свидетельствуют, что на фоне меньшего содержания IL-10, как белкового продукта, уровень мРНК *IL-10* не меняется. Учитывая способность IL-10 к подавлению экспрессии мРНК *IL-10* по принципу обратной связи, полученные нами, результаты могут отражать тонкие механизмы продукции супрессорного цитокина, которым является IL-10, при развитии воспалительных процессов на местном уровне у больных ДГПЖ.

Уровень мРНК *IL-10* в ткани опухоли больных ДГПЖ не менялся у больных разного возраста, достоверно не отличаясь ( $p > 0,05$ ) у больных моложе 60 лет (Me=1,563 (0,4819 – 1,638) отн. ед.), больных в возрасте 61 – 70 лет (Me=1,859 (0,1225 – 4,211) отн. ед.) и больных в возрасте 71 – 80 лет (Me=1,198 (0,1103 – 3,111) отн. ед.). Выявлена статистически не значимая направленность к снижению мРНК *IL-10* в образцах опухолевой ткани больных ДГПЖ при повышении концентрации в крови тестостерона ( $p > 0,05$ ). Корреляционный анализ показал

обратную статистически достоверную связь ( $r=-0,39$ ,  $p=0,04$ ) между тестируемыми показателями. Вероятно, отсутствие статистически значимых различий в уровне мРНК *IL-10* при наличии корреляционной связи обусловлено недостаточно большими группами больных с разным содержанием в крови тестостерона (Рис. 4.14).

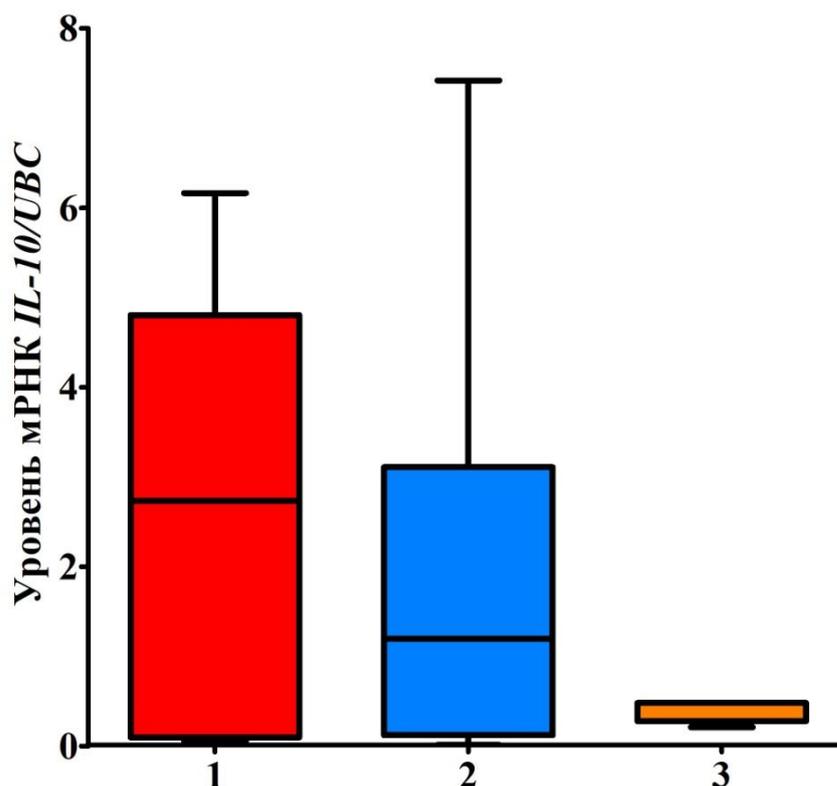


Рисунок 4.14 - Уровень мРНК *IL-10* в опухолевой ткани больных доброкачественной гиперплазией предстательной железы с разным уровнем тестостерона

- 1 – уровень тестостерона до 5 ммоль/л, n=15,
- 2 – уровень тестостерона более 5 до 15 ммоль/л, n=34,
- 3 – уровень тестостерона более 15 ммоль/л, n=3

Сходным образом в образцах опухолевой ткани больных ДГПЖ менялся уровень мРНК *IL-10* при сопоставлении с повышающимися концентрациями в крови PSA. При этом различия в уровне мРНК *IL-10* у больных ДГПЖ с разным уровнем PSA также были недостоверны. Однако в дополнение к отсутствию статистически значимых различий было зарегистрировано и отсутствие

достоверной корреляционной связи, несмотря на выраженную направленность к снижению уровня мРНК *IL-10* при высоких концентрациях PSA. Отсутствие достоверных различий вероятно связано с большим разбросом данных и небольшим количеством больных в сравниваемых группах (Рис. 4.15).

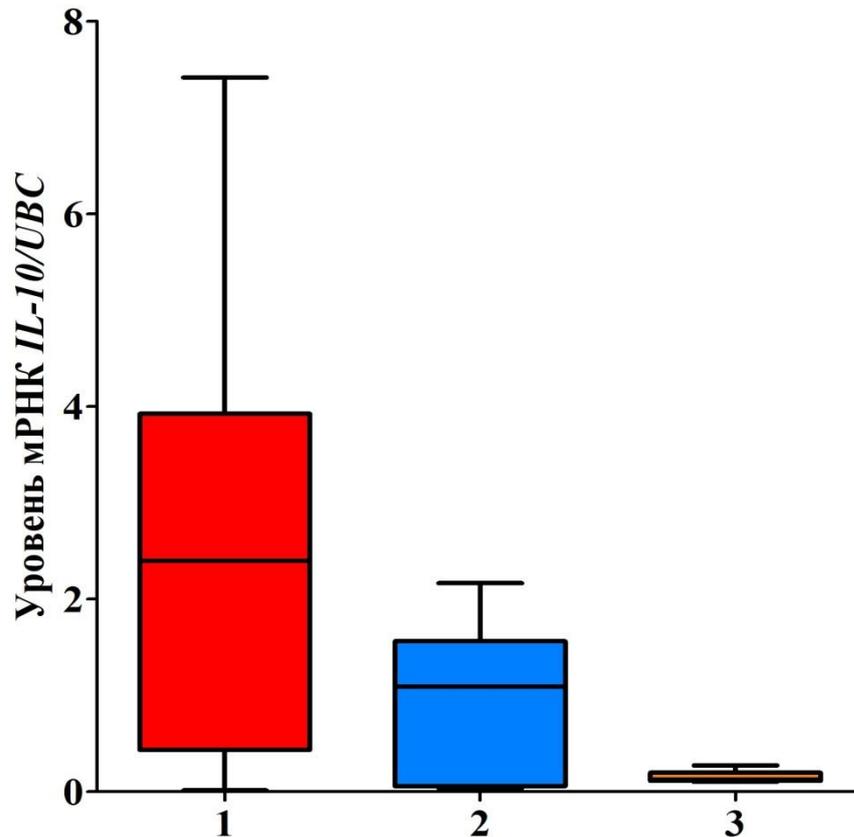


Рисунок 4.15 - Уровень мРНК *IL-10* в опухолевой ткани больных доброкачественной гиперплазией предстательной железы с разной концентрацией PSA в крови

1 – уровень PSA до 4 нг/мл, n=44,

2 – уровень PSA более 4 до 10 нг/мл, n=5,

3 – уровень PSA более 10 нг/мл, n=3

Известно, что как тестостерон, так и *PSA* способны влиять на экспрессию генов в клетках, прямым или косвенным образом повышая или понижая их экспрессию [33, 117]. Как показано в разделе 3 при РПЖ также происходит снижение уровня экспрессии гена, кодирующего *IL-10* при повышении концентрации тестостерона и *PSA*. Подобные, но статистически не значимые

изменения были отмечены в содержании мРНК *IL-10* при разных объемах предстательной железы у больных ДГПЖ. Уровень мРНК *IL-10* имел направленность к снижению по мере увеличения объема железы и составил при объеме ПЖ до 25 см<sup>3</sup> величину, равную Me=2,490 (1,198 – 3,783) отн. ед., при объеме до 50 см<sup>3</sup> величину, равную Me=1,905 (0,09816 – 3,569) отн. ед., при объеме больше 50 см<sup>3</sup> величину, равную Me=0,9584 (0,09700 – 2,403) отн. ед., соответственно, ( $p>0,05$ ). Различия в показателе КЖ ткани железы (до 4 Нм или от 4 до 10 Нм) не сопровождались изменениями уровня мРНК *IL-10* - Me=1,563 (0,2074 – 3,209) отн. ед. и Me=1,169 (0,06992 – 3,982) отн. ед., соответственно, ( $p>0,05$ ). Содержание мРНК *IL-10* значимо не изменялось при наличии опухолевых очагов в обеих долях предстательной железы (Me=1,198 (0,1172 – 3,212) отн. ед.) или при локализованном поражении одной доли железы (Me=1,563 (1,563 – 1,563) отн. ед.) ( $p>0,05$ ). Уровень мРНК *IL-10* в ткани предстательной железы больных ДГПЖ статистически значимо не менялся при разном размере опухолевого узла. Содержание мРНК *IL-10* существенно не отличалось у лиц, имевших опухоли в предстательной железе размером до 3,5 см<sup>3</sup>, оно составило величину, равную (Me=1,902 (0,1137 – 3,664) отн. ед.), при размере опухоли 3,6 – 5 см<sup>3</sup> – (Me=1,129 (0,4352 – 2,019) отн. ед.), при размере больше 5 см<sup>3</sup> – (Me=1,566 (0,01570 – 3,116) отн. ед.) ( $p>0,05$ ). Больные, получившие разный объем хирургического вмешательства (ТУР простаты или аденомэктомия) не различались по уровню мРНК *IL-10* в ткани предстательной железы в предоперационный период.

Сопоставление экспрессии генов, кодирующих FOXP3 и *IL-10*, с помощью анализа корреляционных взаимосвязей обнаружило наличие такой связи в опухолях больных ДГПЖ (Рис. 4.16).

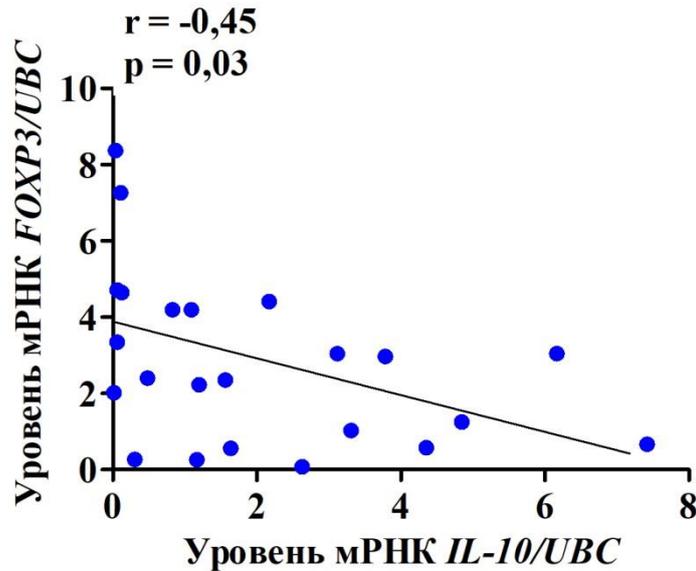


Рисунок 4.16 - Результаты корреляционного анализа связи между уровнем мРНК FOXP3 и *IL-10* в опухолях больных ДГПЖ

Выявлена статистически значимая ( $P=0,03$ ) умеренная ( $r=-0,45$ ) отрицательная связь между уровнями мРНК *FOXP3* и *IL-10* в опухолях больных ДГПЖ. Наличие такой связи свидетельствует о совместном участии продуктов этих генов в иммунных механизмах развития ДГПЖ.

Таким образом, уровень мРНК *IL-10* в опухолевой ткани больных ДГПЖ статистически значимо не отличался от его уровня в крови больных ДГПЖ, был сопоставим с уровнем мРНК *IL-10* в опухолевой ткани больных РПЖ, отрицательно коррелировал с уровнем мРНК *FOXP3*, не различался у больных разного возраста, больных с различающимися объемом и коэффициентом жесткости ткани простаты, больных с разной локализацией и разным размером опухоли. При этом была выявлена недостоверная, но выраженная направленность к падению уровня мРНК *IL-10* в опухолевой ткани больных РПЖ при повышении концентрации тестостерона и PSA, сопровождающаяся достоверной отрицательной корреляционной взаимосвязью между уровнем мРНК *IL-10* и концентрацией тестостерона по аналогии с больными РПЖ.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рак предстательной железы является вторым по частоте злокачественным новообразованием (после рака легких) и одной из ведущих причин смертности от онкологических заболеваний среди мужчин [160]. Развитие РПЖ связывают с пожилым возрастом, этнической принадлежностью, семейным анамнезом, генетическими и эпигенетическими факторами, пищевыми привычками, канцерогенами окружающей среды. Несмотря на значительные успехи в лечении рака предстательной железы, достижение длительных ремиссий заболевания по-прежнему является сложной проблемой в связи со склонностью опухоли к метастазированию и рецидивам [1, 19]. Высокие показатели заболеваемости и смертности, инвалидизация пациентов, потеря ими трудоспособности обуславливают необходимость совершенствования методов диагностики и лечения РПЖ. Молекулярные механизмы развития и прогрессирования заболевания остаются недостаточно изученными, а определить соответствующие биомаркеры для ранней диагностики и выбора методов лечения заболевания остается актуальной задачей. Коэффициент Глисона, уровень ПСА представляют определенную прогностическую ценность для лечения и диагностики РПЖ, но они не могут предсказать, каким окажется течение заболевания – индолентным или агрессивным [83]. В связи с этим на сегодняшний день существует необходимость поиска новых дополнительных прогностических маркеров для более эффективного принятия клинических решений при лечении РПЖ. Благодаря достижениям клеточной и молекулярной биологии в последние годы сделан значительный прорыв в области понимания сложных механизмов взаимодействия опухоли и организма, в связи с чем исследование мРНК маркеров малых субпопуляции лимфоцитов и пулов активированных клеток в зависимости от клинических и патоморфологических факторов, характеризующих течение опухолевого процесса при доброкачественных и злокачественных опухолях представляется особенно актуальным

Проведенные исследования показали, что развитие рака предстательной железы сопровождается статистически значимым повышением в периферической крови больных уровня мРНК *FOXP3* и снижением содержания мРНК *IL-10* по сравнению с группой здоровых лиц.

Экспрессия гена *FOXP3* является наиболее точным маркером для идентификации Treg [41]. Известно, что Treg способны подавлять противоопухолевые иммунные реакции и обеспечивать создание иммуносупрессивной микросреды, тем самым способствуя опухолевой прогрессии [58]. Количество Treg в периферической крови онкологических больных может увеличиваться примерно в два раза по сравнению с их уровнем у здоровых людей [48]. При этом повышение уровня Treg в крови и опухолевых тканях пациентов в ряде исследований [81,114, 21, 52] ассоциировано с плохим прогнозом заболевания и низкой выживаемостью, в том числе у больных опухолями предстательной железы. Снижение экспрессии *FOXP3* в Treg, индуцированное ингибиторами иммунных контрольных точек указывает на потенциальную связь между *FOXP3* и активностью Tregs [156]. Вероятно, повышение уровня мРНК *FOXP3* у больных раком предстательной железы отражает один из механизмов ухода опухоли от иммунного ответа.

Значение *IL-10* [60] в иммуносупрессии и онкогенезе было продемонстрировано в экспериментальных исследованиях. Так, повышенная экспрессия *IL-10* на мышинной модели меланомы связана с прогрессированием опухоли, нарушением созревания дендритных клеток, инактивацией функции  $CD8^+$  Т-клеток и снижением экспрессии интерферона- $\gamma$  и гранзима В, в то время как его дефицит замедляет рост опухоли, нарушает супрессивную функцию Treg и обеспечивает усиление цитотоксической функции  $CD8^+$  Т-клеток [28]. Показана ассоциация высокого уровня *IL-10* с плохим прогнозом у больных раком шейки матки [152], раком яичников [163], колоректальным раком [27]. Поскольку *IL-10* обладает ауторегуляторной активностью и способен ингибировать синтез мРНК *IL-10*, вероятно, это и обуславливает обнаруженное нами снижение тестируемого показателя в крови пациентов.

Исследование влияния клинико–морфологических показателей, характеризующих течение заболевания, на уровень тестируемых белков выявило изменение содержания мРНК FOXP3 у больных разного возраста, с разным коэффициентом жесткости ткани предстательной железы, с разным объемом простаты, у больных с разными стадиями заболевания. Относительный уровень мРНК FOXP3 в предоперационном периоде был выше нормы у лиц с большим объемом выполненного в последующем оперативного вмешательства (простатэктомией и трансуретральной резекцией), но не отличался от уровня мРНК FOXP3 у мужчин, у которых оперативное вмешательство было ограничено биопсией простаты,

Относительный уровень мРНК *IL-10* менялся при различиях в уровне PSA в крови больных и в объеме предстательной железы. В предоперационном периоде у лиц, которым в последующем был выполнен большой объем оперативного вмешательства, уровень мРНК *IL-10* был ниже нормы, а в случаях ограничения оперативного пособия биопсией простаты – не отличался от нормы. Данные изменения отмечались в группе больных РПЖ.

По-видимому, возрастной дисбаланс иммунологических реакций, повышение плотности ткани предстательной железы, увеличение объема железы за счет роста опухолевого узла и наличия в ней застойных и воспалительных процессов, увеличение стадии заболевания являются факторами, усугубляющими иммуносупрессию в организме пациентов и оказывающими влияние на уровень мРНК *FOXP3*. Подтверждением этому является повышение уровня мРНК *FOXP3* у мужчин, перенесших объемную операцию на предстательной железе и имеющих в послеоперационном периоде более значительную дисфункцию иммунной системы, чем лица с небольшим объёмом оперативного вмешательства. Другие исследователи [56] проанализировавшие взаимосвязь некоторых из перечисленных признаков с уровнем экспрессии *FOXP3*, в частности распространенности опухолевого процесса, отметили ее повышение у лиц с III/IV стадиями заболевания. Вероятно, высокий уровень PSA, возможно, подавляющий экспрессию рецепторов *IL-10* и активация воспалительных процессов,

присутствующая в опухолях большого объема являются факторами влияющими на уровень мРНК *IL-10* в крови пациентов. Выполнение большего объема оперативного вмешательства и следовательно, полное или частичное удаление опухоли обеспечивает снижение уровня мРНК *IL-10* в большей степени, чем в случаях, когда хирургическое пособие ограничивается биопсией новообразования.

В опухолевой ткани у больных раком предстательной железы мРНК *FOXP3* уровень мРНК *FOXP3* был статистически значимо выше ( $p < 0,05$ ), чем в образцах крови пациентов, а содержание мРНК *IL-10* – ниже в образцах опухоли, чем в крови, однако корреляционной зависимости тестируемых показателей в периферической крови и в опухоли не выявлено. Согласно работам других исследователей [29] у мужчин, страдающих раком простаты, наблюдается значительное увеличение количества  $FOXP3^{+}Treg$  в строме и ткани опухоли. Отмечено, что у больных почечно-клеточным раком и немелкоклеточным раком легкого [30], раком молочной железы [33], колоректальным раком [109] повышение содержания  $FOXP3^{+}Treg$  в ткани новообразования связано с плохими исходами заболевания и короткими показателями выживаемости. Некоторые авторы предполагают, что вследствие изменения регуляции различных иммунологических механизмов, включающих, в том числе, повышение уровней иммунных контрольных точек и уровня  $TGF-\beta$ , формируется петля положительной обратной связи, способствующая накоплению  $Treg$  внутри опухоли [48]. Другие исследователи [16] считают, что существует несколько механизмов, обуславливающих инфильтрацию опухолевой ткани простаты  $Treg$ . К ним относятся способность цитокинов, продуцируемых опухолями простаты, регулировать экспрессию *FOXP3* и расширять популяцию  $Treg$ , а также способность малигнизированных клеток или опухолевых макрофагов рекрутировать  $CCR4^{+} Treg$  в опухолевую ткань посредством хемокинового градиента, что приводит к накоплению  $Treg$  в опухоли и ослабляет противоопухолевый иммунитет [72]. Вероятно, с увеличением числа  $Treg$  в ткани опухоли предстательной железы связано повышение уровня мРНК *FOXP3* в

образцах ткани РПЖ по сравнению с количеством тестируемого показателя в крови больных. Полученные данные соответствуют результатам исследования [108], показавшего, что уровень Treg в опухолевой ткани значительно превосходит их содержание в периферической крови больных РПЖ. В свою очередь, увеличение количества Treg способствует повышению секреции IL-10, что может быть связано с более агрессивным течением опухолевого процесса на фоне значительного ограничения возможностей иммунного ответа, связанных, в том числе, с нарушением активации резидентных антигенпрезентирующих клеток опухоли, подавлением функций эффекторных клеток и клеток Th17 [83]. Вероятно, сложные иммунологические механизмы регуляции уровня IL-10 обуславливают значительное снижение содержания мРНК *IL-10* в образцах опухоли.

Сопоставление клинико-морфологических показателей, характеризующих течение заболевания, и уровня тестируемых белков выявляло изменение содержания мРНК *FOXP3* при разном объеме предстательной железы и состоянии регионарных лимфоузлов, и изменение содержания мРНК *IL-10* при разных концентрациях PSA в периферической крови и величине коэффициента Глисона.

По-видимому, у лиц, имеющих большой объем предстательной железы и вовлечение в процесс регионарных лимфоузлов, снижение уровня мРНК *FOXP3* в ткани опухоли является одной из стратегий, используемых злокачественными клетками для подавления иммунитета, уклонения от иммунного надзора и повышения метастатического потенциала малигнизированных клеток. Согласно работе [46] плотность распределения Treg в опухолевой ткани предстательной железы не была ассоциирована с такими клиническими параметрами, как поражение лимфатических узлов, уровень предоперационного PSA или показатель Глисона. Однако по данным [45] степень инфильтрации FOXP3+ Treg инвазивных опухолей молочной железы положительно коррелирует с наличием метастазов в лимфатических узлах.

Напротив показано, что повышение уровня PSA взаимосвязано с повышением уровня провоспалительных цитокинов при РПЖ [31], в том числе

IL-10, а экспрессия цитокина IL-10 выше в случаях в опухолях с коэффициентом Глисона (8 – 10) [36]. Вероятно, в подобных ситуациях высокий уровень IL-10 способен по механизму обратной связи подавлять синтез мРНК *IL-10*.

У больных доброкачественной гиперплазией предстательной железы уровень в крови мРНК *FOXP3* был выше ( $p < 0,05$ ), чем в контрольной группе, но статистически значимо ниже ( $p < 0,05$ ), чем у лиц, страдающих раком предстательной железы. Содержание мРНК *IL-10* у больных доброкачественной патологией предстательной железы в крови было ниже ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем, но статистически значимо выше, чем у лиц, страдающих раком простаты.

Полученные в нашем исследовании данные соответствуют результатам, имеющимся в доступной литературе. Так в работе С. Donmez, Е. Konac приводятся сведения о том, что экспрессия IL-10 у больных карциномой предстательной железы (1 группа) выше, чем при доброкачественной гиперплазии предстательной железы (2 группа), а следовательно, уровень мРНК *IL-10* у больных 1 группы будет меньше, чем во 2 группе в связи с наличием сложного регуляторного механизма, который подавляет при раке простаты синтез мРНК *IL-10* [63].

Согласно публикации Miller A.M. et al., *FOXP3*-позитивные Т-клетки чаще определяются в периферической крови при раке, чем у здоровых лиц, а в опухолевой ткани – при злокачественных опухолях предстательной железы, чем при доброкачественной патологии [108]. Такие же данные приводят Valdman A. et al. [150]. Возможно, что повышение уровня мРНК *FOXP3* в периферической крови пациентов с опухолями предстательной железы можно рассматривать в качестве маркера, степень возрастания которого может указывать на развитие той или иной патологии в железе.

Сопоставление клинико-морфологических особенностей течения заболевания и уровня тестируемых белков в крови выявляло статистически значимое повышение содержания мРНК *FOXP3* с увеличением возраста пациента, и снижение ( $p < 0,05$ ) уровня мРНК *IL-10* по мере роста показателя PSA в крови

больных. Напротив, у лиц с исходно не операбельной опухолью количество мРНК *IL-10* снижалось ( $p < 0,05$ ) по сравнению с пациентами, которым было выполнено радикальное вмешательство. Поскольку вероятность развития любых опухолевых процессов в железе возрастает с возрастом пациента [82], повышение мРНК *FOXP3* больных 71 – 80 лет по сравнению с группами более молодых пациентов представляется закономерным. Вероятно, повышение уровня PSA в крови больных влияет на экспрессию гена *IL-10*, приводя к снижению содержания мРНК *IL-10* посредством сложных иммунорегуляторных механизмов, реализуемых при патологии предстательной железы.

В ранее опубликованных исследованиях показано, что низкая экспрессия *IL-10* в опухолевых клетках увеличивает риск неблагоприятного прогноза при раке молочной железы и колоректальном раке [27, 99]. Мыши с дефицитом *IL-10* более восприимчивы к спонтанному развитию опухолей кишечника по сравнению с животными дикого типа [149]. Низкие уровни *IL-10* у пожилых мужчин связаны с более высоким риском развития РПЖ [35]. Подобное понижение уровня мРНК *IL-10*, обусловленное снижением экспрессии гена *IL-10*, вероятно, наблюдается и у пациентов с большими размерами доброкачественного новообразования в предстательной железе, которое сложно удалить оперативным путем.

У биоптатах больных доброкачественной гиперплазией предстательной железы тестируемые белки детектировались во всех исследованных образцах. Содержание мРНК *FOXP3* в опухолевой ткани было выше ( $p < 0,05$ ), чем в крови, что, возможно, указывает на участие *FOXP3* в патогенезе новообразований простаты, в том числе за счет нарушения регулирования локального иммунного ответа. Уровни мРНК *IL-10* в образцах крови и ткани статистически достоверно не отличались ( $p > 0,05$ ). Корреляционная зависимость между уровнями мРНК *IL-10* в крови и ткани не установлена. Не выявлено также отличия мРНК *FOXP3* в образцах опухолей больных раком предстательной железы и доброкачественной гиперплазией простаты. Однако содержание мРНК *IL-10* в опухолевой ткани пациентов с доброкачественной патологией было статистически значимо выше

( $p < 0,05$ ), чем у больных раком простаты. О возможном повышении экспрессии *IL-10* злокачественными клетками предстательной железы, что в свою очередь может приводить к возрастанию уровня мРНК *IL-10*, сообщают и другие исследователи [153].

Оценка влияния клиничко-патоморфологических факторов, характеризующих течение заболевания на уровень тестируемых белков позволила выделить следующие статистически значимые ( $p < 0,05$ ) закономерности изменения их уровня:

- мРНК *FOXP3* от уровня тестостерона, объема простаты и распространенности опухоли,
- мРНК *IL-10* от содержания тестостерона и PSA в периферической крови.

Вероятно, высокий уровень тестостерона может сопутствовать продукции мРНК *FOXP3* в опухолевой ткани. Известно, что тестостерон играет определенную роль в канцерогенезе опухолей простаты [19]. Сигнальный путь андрогенных рецепторов участвует в нормальном развитии и гомеостазе предстательной железы, а нарушение его регуляции способно привести к развитию новообразований простаты. Кроме того, андрогены обладают выраженной иммуносупрессорной функцией. Влияние увеличения объема органа на уровень мРНК *FOXP3* в проведенном нами исследовании наблюдалось и у больных раком предстательной железы. Вероятно, этот фактор следует рассматривать в качестве неблагоприятного, поскольку увеличение объема органа может происходить и за счет присутствия большего количества  $FOXP3^+$  Treg [58]. Значимое повышение уровня мРНК *FOXP3* у лиц с наличием опухоли в обеих долях предстательной железы, по сравнению с показателями больных с локализацией новообразования в одной доле простаты, также может свидетельствовать о неблагоприятном прогнозе заболевания.

Понижение уровня мРНК *IL-10* у больных с высоким содержанием тестостерона, вероятно, связано с истощением функциональных возможностей иммунной защиты на фоне быстрого роста новообразования. Различия ( $p < 0,001$ ) уровней мРНК *IL-10* у пациентов с разным количеством PSA в периферической

крови могут служить подтверждением регулирующего влияния этого белка на уровень экспрессии *IL-10*. В проведенном исследовании снижение содержания мРНК *IL-10* по мере увеличения PSA было выявлено в тестируемых образцах и крови, и опухолевой ткани больных.

Таким образом, в ходе проведенного исследования была выполнена оценка содержания мРНК *FOXP3*, мРНК *IL-10* в образцах периферической крови и опухолевой ткани больных раком и доброкачественной гиперплазией предстательной железы в зависимости от ряда клинико-патологоанатомических факторов, характеризующих течение опухолевого процесса.

Наиболее информативным показателем в образцах периферической крови у больных раком и доброкачественной гиперплазией предстательной железы оказалось исследование уровня мРНК *FOXP3*, оценка изменений которого может быть использована в числе других факторов, для проведения дифференциальной диагностики патологии простаты. С этой же целью при исследовании ткани опухоли в спорных случаях в качестве дополнительного критерия диагноза может быть применена оценка уровня мРНК *IL-10*.

## ВЫВОДЫ

1. В периферической крови больных РПЖ уровень мРНК *FOXP3* повышен в сравнении со здоровыми лицами ( $p < 0,001$ ) и зависит от возраста пациента, а уровень мРНК *IL-10* снижается по сравнению с показателями здоровых лиц ( $p = 0,0004$ ) и зависит от уровня PSA ( $p = 0,0013$ ), что отражает общее иммуносупрессивное состояние больных. Уровень мРНК *FOXP3* в крови больных РПЖ статистически значимо положительно коррелирует с коэффициентом жесткости простаты, что указывает на связь со злокачественностью опухоли.

2. В образцах опухолевой ткани больных раком предстательной железы определялось повышение уровня мРНК *FOXP3* с увеличением объема предстательной железы ( $p = 0,0080$ ) и снижение уровня мРНК *IL-10* при повышении уровня PSA ( $p = 0,0085$ ).

3. В периферической крови больных ДГПЖ уровень мРНК *FOXP3* повышается в сравнении с нормой ( $p < 0,0001$ ), различается у пациентов разного возраста ( $p = 0,0405$ ), а уровень мРНК *IL-10* снижается по сравнению с показателями здоровых лиц ( $p = 0,0080$ ) и при повышении уровня в крови PSA ( $p = 0,0107$ ). В опухолевой ткани больных ДГПЖ определяется повышение уровня мРНК *FOXP3*, которое меняется при разных уровнях тестостерона ( $p = 0,0305$ ), и снижение уровня мРНК *IL-10* при повышении концентрации PSA ( $p = 0,0445$ ).

4. В периферической крови больных уровень мРНК *FOXP3* и мРНК *IL-10* статистически значимо ниже у лиц с РПЖ, чем с ДГПЖ ( $p = 0,0142$  и  $p = 0,0304$ , соответственно). Содержание мРНК *FOXP3* в образцах опухолей больных РПЖ и ДГПЖ не различалось, содержание мРНК *IL-10* в опухолевой ткани пациентов с ДГПЖ сопоставимо с уровнем мРНК *IL-10* в опухолевой ткани больных РПЖ.

5. В крови больных РПЖ, которым выполнялась радикальная простатэктомия, уровень мРНК *FOXP3* в предоперационный период в 45 раз превышал показатель нормы ( $p = 0,0021$ ). У больных с трансуретральной резекцией предстательной железы в предоперационный период уровень мРНК *FOXP3* был повышен в 139

раз ( $p=0,0035$ ). Больные, которым была выполнена биопсия, имели в предоперационный период нормальный уровень мРНК *FOXP3* ( $p=0,2009$ ).

6. Уровень мРНК IL-10 крови оказался равным уровню здоровых лиц у больных РПЖ, которым было назначено ограниченное хирургическое вмешательство в виде биопсии ( $p=0,1585$ ). В предоперационном периоде у лиц, которым в последующем был выполнен больший объем оперативного вмешательства, уровень мРНК IL-10 был ниже нормы в 2,6 – 4,2 раза ( $p=0,0015$ ).

7. В крови больных ДГПЖ, которым была выполнена биопсия, уровень мРНК IL-10 в предоперационном периоде был в 260 ниже уровня мРНК IL-10 пациентов, которым назначалась трансуретральная резекция ( $p=0,0030$ ).

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Определение уровня мРНК *FOXP3* и мРНК *IL-10* в периферической крови больных РПЖ может быть использовано на практике в качестве альтернативного метода оценки злокачественности опухоли.

2. Тестирование мРНК *FOXP3* и мРНК *IL-10* в крови больных РПЖ в предоперационном периоде может быть рекомендовано в качестве дополнительного показателя для отбора пациентов на выполнение того или иного вида оперативного вмешательства. Уровень мРНК *IL-10* в крови больных РПЖ в предоперационном периоде ниже 0,8 отн. ед. свидетельствует о целесообразности проведения трансуретральной резекции.

3. Исследование уровня мРНК *IL-10* в периферической крови больных может быть рассмотрено в качестве дополнительного метода выбора объема оперативного пособия при ДГПЖ. Десятикратное и более снижение уровня мРНК *IL-10* в крови больных служит в 90 % случаев показанием к проведению биопсии.

4. Определение в цельной крови больных раком предстательной железы и доброкачественной гиперплазией предстательной железы уровня мРНК, *FOXP3* и мРНК *IL-10*, с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией, может быть рекомендовано для применения в клинко-диагностических ПЦР-лабораториях медицинских учреждений, с целью мониторинга состояния иммунной системы больных в предоперационный период.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

- ДГПЖ – доброкачественная гиперплазия предстательной железы
- ДНКза I – дезоксирибонуклеаза I
- ЖБ – жидкостной биопсии
- кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота
- КЖ – коэффициент жесткости
- ЛУ – лимфоузлы
- МНС – молекулы главного комплекса гистосовместимости
- мпМРТ – мультипараметрическое МРТ-сканирование
- мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
- МРТ – магнитнорезонансная томография
- ОВ – общая выживаемость
- ПЖ – предстательная железа
- ПИН – простатическая интраэпителиальная неоплазия
- ПРИ – пальцевое ректальное исследование
- ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени
- РМЖ – рак молочной железы
- РПЖ – рак предстательной железы
- РПЭ – радикальной простатэктомии
- ТС – тестостерон
- ТРУЗИ – трансуретральное ультразвуковое исследование
- ТУР ПЖ – трансуретральная резекция предстательной железы
- CTLA-4 – цитотоксический белок, ассоциированный с Т-лимфоцитами
- IL-10 – интерлейкин-10
- НК-клетки – натуральные киллерные клетки
- Treg – регуляторные Т-клетки
- PSA – простатспецифический антиген
- UBC – ген убиквитин-лигазы С

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Аль-Шукри, С. Х. Прогнозирование рака предстательной железы с использованием доплерометрического исследования / С. Х. Аль-Шукри, А. М. Курнаков, С. Ю. Боровец // Урологические ведомости. – 2016. – Т. 6, № 1. – С. 16-20. – DOI 10.17816/uroved616-20.

2. Беспалов, Н. Л. Особенности иммунного статуса у больных раком предстательной железы до и после радикальной простатэктомии : специальность 14.01.23 "Урология" : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Беспалов Николай Леонидович. – Москва, 2014. – 23 с.

3. Вторушин, С. В. Молекулярно-биологические факторы прогноза при раке предстательной железы / С. В. Вторушин, Н. В. Безгодова, А. А. Плешкунов // Сибирский онкологический журнал. – 2017. – Т. 16, № 1. – С. 82-90. – DOI 10.21294/1814-4861-2017-16-1-82-90.

4. Изменения иммунного статуса больных раком предстательной железы в зависимости от стадии и проведенного лечения. Коррекция иммунитета индометацином / Ж. Д. Жумагазин, А. И. Ившина, Т. Н. Заботина [и др.] // Вестник Онкологического научного центра РАМН. – 1996. – Т. 7, № 3. – С. 60-63.

5. Информативность трансректального ультразвукового исследования в диагностике рака предстательной железы / Т. Г. Хмара, В. М. Попков, М. Л. Чехонацкая [и др.] // Медицинский вестник Башкортостана. – 2011. – Т. 6, № 2. – С. 204-205.

6. Использование тканевой экспрессии генов для прогнозирования локализованного рака предстательной железы / Ю. В. Толкач, М. Кучик, А. Мерзебургер [и др.] // Вестник урологии. – 2015. – № 3. – С. 34-41.

7. Классификация опухолей TNM. 8-я редакция. Руководство и атлас / под редакцией И. В. Поддубной, А. Д. Каприна, В. К. Лядова. – Москва : Практическая медицина, 2022. – Т. 2: Опухоли головы и шеи. Рак молочной железы. Онкогинекология. Онкоурология. – 400 с. – ISBN 978-5-98811 592-2 (рус.).

8. Клинические рекомендации. Рак предстательной железы : [одобрено Научно-практическим Советом Минздрава РФ] / Ассоциация онкологов России, Российское общество онкоурологов, Российское общество клинической онкологии, Российское общество урологов ; Минздрав РФ. – Текст : электронный. – Москва, 2021. – URL: [https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/12\\_3](https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/12_3) (Дата обращения 01.10.2024).

9. Клиническое значение молекул LAG3 и GITR при раке молочной железы / Н. В. Чантурия, Т. Н. Заботина, И. К. Воротников, В. Ю. Сельчук // Онкогинекология. – 2020. – № 3 (35). – С. 15-19. – DOI 10.52313/22278710\_2020\_3\_15.

10. Костин, А. А. Прогнозирование развития рака предстательной железы. Мультидисциплинарный подход / А. А. Костин, Н. Г. Кульченко, А. О. Толкачев // Вестник медицинского института "РЕАВИЗ": реабилитация, врач и здоровье. – 2017. – № 1 (25). – С. 60-67.

11. Курзанов, А. Н. Диагностические и прогностические маркеры рака предстательной железы / А. Н. Курзанов, Е. А. Стрыгина, В. Л. Медведев // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 2. – С. 166.

12. Муслов, С. А. Упругость и гиперупругость урогенитальных тканей человека и животных / С. А. Муслов, Е. А. Лапшихина, Д. С. Кобзев // Эффективная фармакотерапия. – 2021. – Т. 17, № 25. – С. 6-25. – DOI 10.33978/2307-3586-2021-17-25-6-24.

13. Новикова, И. А. Клиническая иммунология и аллергология : учебное пособие / И. А. Новикова. – Минск: Вышэйшая школа, 2021. – 383 с. – ISBN 978-985-06-3289-0.

14. Попков, В. М. Цитокиновый статус и иммунологические маркеры в ранней диагностике рака простаты / В. М. Попков, Р. Н. Фомкин, Б. И. Блюмберг // Бюллетень медицинских интернет-конференций. – 2015. – Т. 5, № 6. – С. 944-948.

15. Ранняя диагностика рака предстательной железы. Методические рекомендации № 19 / Д. Ю. Пушкарь, А. В. Говоров, А. В. Сидоренков [и др.]. – Москва : АБВ-пресс, 2015. – 56 с.

16. Роль т-регуляторных клеток в прогрессировании рака предстательной железы / С. В. Попов, Н. В. Стуров, Н. В. Воробьев, С. В. Хайдуков // Медицинская иммунология. – 2019. – Т. 21, № 4. – С. 587-594. – DOI 10.15789/1563-0625-2019-4-587-594.

17. Рубцов, Ю. П. Клеточные и молекулярные механизмы контроля лимфопролиферации и аутоиммунитета : специальность 03.01.03 "Молекулярная биология" : диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук / Рубцов Юрий Петрович, 2021. – 211 с.

18. Рыков, М. Ю. Рак предстательной железы : руководство для врачей / М. Ю. Рыков. – Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2022. – с.

19. Сергеева, Е. В. Состояние врожденного иммунитета у лиц пожилого возраста, проживающих на севере / Е. В. Сергеева, А. И. Леванюк // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2014. – № 2 (48). – С. 97-100.

20. Современные возможности дифференциальной диагностики бляшечного параспориоза и ранних стадий грибвидного микоза / О. Ю. Олисова, Е. В. Грекова, В. А. Варшавский [и др.] // Архив патологии. – 2019. – Т. 81, № 1. – С. 9-17.

21. Состояние онкологической помощи населению России в 2022 году / под редакцией А. Д. Каприна, В. В. Старинского, А. О. Шахзадовой. – Москва : МНИОИ им. П. А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2022. – 239 с.

22. Сравнительная характеристика уровней экспрессии генов иммунной системы в опухолях молочной железы и толстой кишки / Д. В. Новиков, С. Г. Фомина, Н. Н. Гурина [и др.] // Российский биотерапевтический журнал. – 2016. – Т. 15, № 1. – С. 77-78.

23. TNM: Классификация злокачественных опухолей / под редакцией Дж. Д. Брайерли ; перевод с английского и научная редакция Е. А. Дубовой, К. А.

Павлова. – 2-е изд. на рус. яз. – Москва : Логосфера, 2018. – 344 с. – ISBN 978-5-98657-063-1.

24. Торопова, Н. Е. Иммунологические и иммуногенетические аспекты патогенеза, диагностики и прогноза рака предстательной железы / Н. Е. Торопова, И. Т. Сидоров // Вестник Самарского государственного университета. Естественнонаучная серия. – 2007. – № 8 (58). – С. 239-251.

25. Уровень мРНК CD16A и CD16B как потенциальный иммунологический маркер при колоректальном раке / Н. В. Красногорова, Д. В. Новиков, С. Г. Фомина [и др.] // Бюллетень сибирской медицины. – 2019. – Т. 18, № 1. – С. 220-227. – DOI 10.20538/1682-0363-2019-1-220-227.

26. Функциональные полиморфизмы генов TNF $\alpha$  (G-308A), IL-1 $\beta$  (T-31C), IL-10 (c-592A) как факторы, влияющие на эффективность химиотерапии распространенного рака яичников / С. О. Генинг, Т. В. Абакумова, И. И. Антонеева [и др.] // Российский иммунологический журнал. – 2019. – Т. 13, № 2-1(22). – С. 197-199. – DOI 10.31857/S102872210006455-5.

27. A biopsy-based 17-gene genomic prostate score as a predictor of metastases and prostate cancer death in surgically treated men with clinically localized disease / S. K. Van Den Eeden, R. Lu, N. Zhang [et al.] // European urology. – 2018. – Vol. 73, Iss. 1. – P. 129-138. – DOI 10.1016/j.eururo.2017.09.013.

28. A genomic classifier predicting metastatic disease progression in men with biochemical recurrence after prostatectomy / A. E. Ross, F. Y. Feng, M. Ghadessi [et al.] // Prostate cancer and prostatic diseases. – 2014. – Vol. 17, Iss. 1. – P. 64-69. – DOI 10.1038/pcan.2013.49.

29. A prospective adaptive utility trial to validate performance of a novel urine exosome gene expression assay to predict high-grade prostate cancer in patients with prostate-specific antigen 2 – 10 ng/ml at initial biopsy / J. McKiernan, M. J. Donovan, E. Margolis [et al.] // European urology. – 2018. – Vol. 74, Iss. 6. – P. 731-738. – DOI 10.1016/j.eururo.2018.08.019.

30. Accumulation of immune-suppressive CD4+ T cells in aging – tempering inflammaging at the expense of immunity / A. I. Thomas, A. Godarova, J. A. Wayman

[et al.] // *Seminars in immunology*. – 2023. – Vol. 70. – Article 101836. – DOI 10.1016/j.smim.2023.101836.

31. Adeola, F. Normalization of gene expression by quantitative RT-PCR in human cell line: comparison of 12 endogenous reference genes / F. Adeola // *Ethiopian journal of health sciences*. – 2018. – Vol. 28, Iss. 6. – P. 741-748. – DOI 10.4314/ejhs.v28i6.9.

32. Adrenal steroids and resistance to hormonal blockade of prostate and breast cancer / P. Michael, G. Roversi, K. Brown [et al.] // *Endocrinology*. – 2023. – Vol. 164, Iss. 3. – Article bqac218. – DOI 10.1210/endo/bqac218.

33. Al-Nasralla, A. S. H. Immunological analysis of interleukin-10 (IL-10), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), and prostate-specific antigen (PSA) in benign and malignant prostate cancer / A. S. H Al-Nasralla, S. S. Hussian, N. K. Tektook // *Human antibodies*. – 2023. – Iss. 18. – Online ahead of print. – DOI 10.3233/HAB-220018.

34. Alpert, P. F. New evidence for the benefit of prostate-specific antigen screening: data from 400,887 Kaiser permanente patients / P. E. Alpert // *Urology*. – 2018. – Iss. 118. – P. 119-126. – DOI 10.1016/j.urology.2018.02.049.

35. An overview of current and emerging diagnostic, staging and prognostic markers for prostate cancer / S. Brönimann, B. Pradere, P. Karakiewicz [et al.] // *Expert review of molecular diagnostics*. – 2020. – Vol. 20, Iss. 8. – P. 841-850. – DOI 10.1080/14737159.2020.1785288.

36. Androgen-responsive circular RNA circSMARCA5 is up-regulated and promotes cell proliferation in prostate cancer / Z. Kong, X. Wan, Y. Zhang [et al.] // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2017. – Vol. 493, Iss. 3. – P. 1217-1223. – DOI 10.1016/j.bbrc.2017.07.162.

37. Antibiotic therapy in patients with high prostate-specific antigen : Is it worth considering? A systematic review / D. E. Taha, O. M. Aboumarzouk, I. O. Koraiem [et al.] // *Arab journal of urology*. – 2019. – Vol. 18, Iss. 1. – P. 1-8. – DOI 10.1080/2090598X.2019.1677296.

38. Application of extracellular vesicles in the diagnosis and treatment of prostate cancer: implications for clinical practice / O. Oey, M. Ghaffari, J. J. Li [et al.]. –

Текст : электронный// Critical reviews in oncology/hematology. – 2021. – Vol. 167. – Article 103495. –

URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1040842821002821>  
(Дата обращения: 30.09.2024).

39. Are pro inflammatory cytokines relevant for the diagnosis of prostate cancer? / M. M. Garrido, R. M. Ribeiro, K. Krüger [et al.] // Anticancer research. – 2021. – Vol. 41, Iss. 6. – P. 3067-3073. – DOI 10.21873/anticancer.15090.

40. Association of FOXP4 gene with prostate cancer and the cumulative effects of rs4714476 and 8q24 in chinese men / M. Liu, X. Shi, J. Wang [et al.] // Clinical laboratory. – 2015. – Vol. 61, Iss. 10. – P. 1491-1499. – DOI 10.7754/clin.lab.2015.150313.

41. Association study of IL10 gene polymorphisms (rs1800872 and rs1800896) with cervical cancer in the Bangladeshi women / A. Datta, F. Tuz Zahora, M. Abdul Aziz [et al.] // International immunopharmacology. – 2020. – Vol. 89 (Pt B). – P. 107091. – DOI 10.1016/j.intimp.2020.107091.

42. Bakir, W. A. Immunohistochemical expression of interleukin10 (IL10) and heat shock protein-90 (HSP-90) in prostatic carcinoma / W. A. Bakir, H. A. Gaidan, M. M. Al-Kaabi // Indian journal of pathology & microbiology. – 2020. – Vol. 63, Iss. 2. – P. 230-234. – DOI 10.4103/IJPM.IJPM\_460\_19.

43. Bartel, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function / D. P. Bartel // Cell. – 2004. – Vol. 116, Iss. 2. – P. 281-297. – DOI 10.1016/s0092-8674(04)00045-5.

44. Beyond the immune suppression: the immunotherapy in prostate cancer / I. Silvestri, S. Cattarino, A. M. Aglianò [et al.] // BioMed research international. – 2015. – Vol. 2015. – Article. 794968. – DOI 10.1155/2015/794968.

45. Blockade of interleukin 10 potentiates antitumour immune function in human colorectal cancer liver metastases / K. M. Sullivan, X. Jiang, P. Guha [et al.] // Gut. – 2023. – Vol. 72, Iss. 2. – P. 325-337. – DOI 10.1136/gutjnl-2021-325808.

46. Blood-based microRNAs as diagnostic biomarkers to discriminate localized prostate cancer from benign prostatic hyperplasia and allow cancer-risk stratification /

G. Al-Kafaji, H. M. Said, M. A. Alam [et al.] // *Oncology letters*. – 2018. – Vol. 16, Iss. 1. – P. 1357-1365. – DOI 10.3892/ol.2018.8778.

47. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells / P. Pandiyan, L. Zheng, S. Ishihara [et al.] // *Nature immunology*. – 2007. – Vol. 8, Iss. 12. – P. 1353-1362. – DOI 10.1038/ni1536.

48. CD4+CD25high T cells are enriched in the tumor and peripheral blood of prostate cancer patients / A. M. Miller, K. Lundberg, V. Ozenci [et al.] // *Journal of immunology*. – 2006. – Vol. 177, Iss. 10. – P. 7398-7405. – DOI 10.4049/jimmunol.177.10.7398.

49. Circular RNA myosin light chain kinase (MYLK) promotes prostate cancer progression through modulating mir-29a expression / Y. Dai, D. Li, X. Chen [et al.] // *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. – 2018. – Vol. 25, Iss. 24. – P. 3462-3471. – DOI 10.12659/MSM.908009.

50. Circulating IL-10 is associated with reduced risk of prostate cancer in a prospective cohort of elderly men : the MrOS Study / C. E. Thomas, D. C. Bauer, J. M. Yuan [et al.] // *Cancer causes & control : CCC*. – 2023. – Vol. 34, Iss. 1. – P. 59-68. – DOI 10.1007/s10552-022-01639-x.

51. Correlation between benign prostatic hyperplasia and inflammation / Y. Bostanci, A. Kazzazi, S. Momtahn [et al.] // *Current opinion in urology*. – 2013. – Vol. 23, Iss. 1. – P. 5-10. – DOI 10.1097/MOU.0b013e32835abd4a.

52. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function / K. Wing, Y. Onishi, P. Prieto-Martin [et al.] // *Science*. – 2008. – Vol. 322 (5899). – P. 271-275. – DOI 10.6/science.1160062.

53. Current knowledge of the potential links between inflammation and prostate cancer / T. Cai, R. Santi, I. Tamanini [et al.] // *International journal of molecular sciences*. – 2019. – Vol. 20, Iss. 15. – P. 3833. – DOI 10.3390/ijms20153833.

54. Demirel, H. C. Multiparametric magnetic resonance imaging: overview of the technique, clinical applications in prostate biopsy and future directions / H. C. Demirel, J. W. Davis // *Turkish journal of urology*. – 2018. – Vol. 44, Iss. 2. – P. 93-102. – DOI 10.5152/tud.2018.56056.

55. Devlin, C. M. Benign prostatic hyperplasia – what do we know? / C. M. Devlin, M. S. Simms, N. J. Maitland // *BJU international*. – 2021. – Vol. 127, Iss. 4. – P. 389-399. – DOI 10.1111/bju.15229.

56. Diagnostic performance of PCA3 to detect prostate cancer in men with increased prostate specific antigen : a prospective study of 1,962 cases / E. D. Crawford, K. O. Rove, E. J. Trabulsi [et al.] // *The Journal of urology*. – 2012. – Vol. 188, Iss. 5. – P. 1726-1731. – DOI 10.1016/j.juro.2012.07.023.

57. Distribution of Foxp3-, CD4- and CD8- positive lymphocytic cells in benign and malignant prostate tissue / A. Valdman, S. J. Jaraj, E. Compérat [et al.] // *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. – 2010. – Vol. 118, Iss. 5. – P. 360-365. – DOI 10.1111/j.1600-0463.2010.02604.x.

58. Donmez, C. Aberrant expression of forkhead box proteins in prostate cancer development / C. Donmez, E. Konac // *Gazi Medical Journal*. – 2020. – Vol. 31, Iss. 3. – P. 460-464. – DOI 10.12996/gmj.2020.113.

59. Dual association of serum Interleukin-10 levels with colorectal cancer / S. Abtahi, F. Davani, Z. Mojtahedi [et al.] // *Journal of cancer research and therapeutics*. – 2017. – Vol. 13, Iss. 2. – P. 252-256. – DOI 10.4103/0973-1482.199448.

60. EAU guidelines on prostate cancer. Part 1 : screening, diagnosis, and treatment of clinically localised disease / A. Heidenreich, J. Bellmunt, M. Bolla [et al.] // *European urology*. – 2011. – Vol. 59, Iss. 1. – P. 61-71. – DOI 10.1016/j.eururo.2010.10.039.

61. Enhanced functionality of CD4+CD25(high)FoxP3+ regulatory T cells in the peripheral blood of patients with prostate cancer / J. Yokokawa, V. Cereda, C. Remondo [et al.] // *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. – 2008. – Vol. 14, Iss. 4. – P. 1032-1040. – DOI 10.1158/1078-0432.CCR-07-2056.

62. Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells / J. Dannull, Z. Su, D. Rizzieri [et al.] // *The Journal of clinical investigation*. – 2005. – Vol. 115, Iss. 12. – P. 3623-3633. – DOI 10.1172/JCI25947.

63. Epidemiology, diagnosis, and treatment of male hypogonadotropic hypogonadism / A. Lenzi, G. Balercia, A. Bellastella [et al.] // *Journal of endocrinological investigation*. – 2009. – Vol. 32, Iss. 11. – P. 934-938. – DOI 10.1007/BF03345775.

64. Estimating the sensitivity of a prostate cancer screening programme for different PSA cut-off levels : a UK case study / J. Leal, N. J. Welton, R. M. Martin [et al.] // *Cancer epidemiology*. – 2018. – Vol. 52. – P. 99-105. – DOI 10.1016/j.canep.2017.12.002.

65. Evaluation of CD4+CD161+CD196+ and CD4+IL-17+ Th17 cells in the peripheral blood of young patients with Hashimoto's thyroiditis and Graves' disease / A. Bossowski, M. Moniuszko, E. Idźkowska [et al.] // *Pediatric endocrinology, diabetes, and metabolism*. – 2012. – Vol. 18, Iss. 3. – P. 89-95.

66. Facciabene, A. T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis / A. Facciabene, G. T. Motz, G. Coukos // *Cancer research*. – 2012. – Vol. 72, Iss. 9. – P. 2162-2171. – DOI 10.1158/0008-5472.CAN-11-3687.

67. Filella, X. Novel biomarkers for prostate cancer detection and prognosis / X. Filella, L. Foj // *Advances in experimental medicine and biology*. – 2018. – Vol. 1095. – P. 15-39. – DOI 10.1007/978-3-319-95693-0\_2.

68. Five microRNAs in serum as potential biomarkers for prostate cancer risk assessment and therapeutic intervention / X. Guo, T. Han, P. Hu [et al.] // *International urology and nephrology*. – 2018. – Vol. 50, Iss. 12. – P. 2193-2200. – DOI 10.1007/s55-018-2009-4.

69. FOXP3 expression and overall survival in breast cancer / A. Merlo, P. Casalini, M. L. Carcangiu [et al.] // *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 2009. – Vol. 27, Iss. 11. – P. 1746-1752. – DOI 10.1200/JCO.2008.17.9036.

70. FOXP3 expression in FOXP3+ tumor cells promotes hepatocellular cells metastasis / H. Zhang, Y. Chen, W. Liao [et al.] // *Translational cancer research*. – 2020. – Vol. 9, Iss. 10. – P. 5868-5881. – DOI 10.21037/tcr-20-1875.

71. Foxp3 expression in human cancer cells / V. Karanikas, M. Speletas, M. Zamanakou [et al.] // *Journal of translational medicine*. – 2008. – Vol. 6, Iss. 19. – DOI 10.1186/1479-5876-6-19.

72. FOXP3+ regulatory T cells in normal prostate tissue, postatrophic hyperplasia, prostatic intraepithelial neoplasia, and tumor histological lesions in men with and without prostate cancer / S. Davidsson, O. Andren, A. L. Ohlson [et al.] // *The Prostate*. – 2018. – Vol. 78, Iss. 1. – P. 40-47. – DOI 10.1002/pros.23442.

73. FOXP3-miR-146-NF- $\kappa$ B axis and therapy for precancerous lesions in prostate / R. Liu, B. Yi, S. Wei [et al.] // *Cancer research*. – 2015. – Vol. 75, Iss. 8. – P. 1714-1724. – DOI 10.1158/0008-5472.CAN-14-2109.

74. Frequency of IL-10+CD19+ B cells in patients with prostate cancer compared to patients with benign prostatic hyperplasia / N. Roya, T. Fatemeh, M. A. Faramarz [et al.] // *African health sciences*. – 2020. – Vol. 20, Iss. 3. – P. 1264-1272. – DOI 10.4314/ahs.v20i3.31.

75. Gender-specific impact of sex hormones on the immune system / F. Sciarra, F. Campolo, E. Franceschini [et al.] // *International journal of molecular sciences*. – 2023. – Vol. 24, Iss. 7. – Article. 6302. – DOI 10.3390/ijms24076302.

76. High tissue density of FOXP3+ T cells is associated with clinical outcome in prostate cancer / A. Flammiger, L. Weisbach, H. Huland [et al.] // *European journal of cancer*. – 2013. – Vol. 49, Iss. 6. – P. 1273 -1279. – DOI 10.1016/j.ejca.2012.11.035.

77. Higher serum testosterone levels predict poor prognosis in castration-resistant prostate cancer patients treated with docetaxel / K. Ando, S. Sakamoto, N. Takeshita [et al.] // *The Prostate*. – 2020. – Vol. 80, Iss. 3. – P. 247-255. – DOI 10.1002/pros.23938.

78. Huang, Q. R. Prognostic lncRNAs, miRNAs, and mRNAs form a competing endogenous RNA network in colon cancer / Q. R. Huang, X. B. Pan // *Frontiers in oncology*. – 2019. – Vol. 6, Iss. 9. – P. 712. – DOI 10.3389/fonc.2019.00712.

79. Ignatiadis, M. Liquid biopsy enters the clinic – implementation issues and future challenges / M. Ignatiadis, G. W. Sledge, S. S. Jeffrey // *Nature reviews. Clinical oncology*. – 2021. – Vol. 18, Iss. 5. – P. 297-312. – DOI 10.1038/s41571-020-00457-x.

80. IL-10 c.-592C>A (rs1800872) polymorphism is associated with cervical cancer / A. P. L. Pereira, K. P. Trugilo, N. C. M. Okuyama [et al.] // *Journal of cancer research and clinical oncology*. – 2020. – Vol. 146, Iss. 8. – P. 1971-1978. – DOI 10.1007/s00432-020-03256-0.

81. IL-10 polymorphisms and prostate cancer risk: a meta-analysis / N. Shao, B. Xu, Y. Y. Mi [et al.] // *Prostate cancer and prostatic diseases*. – 2011. – Vol. 14, Iss. 2. – P. 129-135. – DOI 10.1038/pcan.2011.6.

82. IL-10-producing intestinal macrophages prevent excessive antibacterial innate immunity by limiting IL-23 synthesis / P. Krause, V. Morris, J. A. Greenbaum [et al.] // *Nature communications*. – 2015. – Vol. 11, Iss. 6. – P. 7055. – DOI 10.1038/ncomms8055.

83. IL-6 and IL-8 cytokines are associated with elevated prostate-specific antigen levels among patients with adenocarcinoma of the prostate at the Uganda Cancer Institute / P. Katongole, O. J. Sande, S. Nabweyambo [et al.] // *Future oncology*. – 2022. – Vol. 18, Iss. 6. – P. 661-667. – DOI 10.2217/fon-2021-0683.

84. IL-6/IL-10 mRNA expression ratio in tumor tissues predicts prognosis in gastric cancer patients without distant metastasis / L. Zhou, C. Tang, X. Li [et al.] // *Scientific reports*. – 2022. – Vol. 12, Iss. 1. – Article 19427. – DOI 10.1038/s41598-022-24189-3.

85. Immune landscape of human prostate cancer: immune evasion mechanisms and biomarkers for personalized immunotherapy / M. J. Bou-Dargham, L. Sha, Q. A. Sang [et al.] // *BMC cancer*. – 2020. – Vol. 20, Iss. 1. – P. 572. – DOI 10.1186/s12885-020-07058-y.

86. Immune response drives outcomes in prostate cancer: implications for immunotherapy / J. Meng, Y. Zhou, X. Lu [et al.] // *Molecular oncology*. – 2021. – Vol. 15, Iss. 5. – P. 1358-1375. – DOI 10.1002/1878-0261.12887.

87. Influence of testosterone on inflammatory response in testicular cells and expression of transcription factor Foxp3 in T cells / M. Fijak, L. J. Damm, J. P. Wenzel [et al.] // *American journal of reproductive immunology : AJRI*. – 2015. – Vol. 74, Iss. 1. – P. 12 - 25. – DOI 10.1111/aji.12363.

88. Insulin-like growth factors (IGFs), IGF receptors, and IGF-binding proteins in primary cultures of prostate epithelial cells / P. Cohen, D. M. Peehl, G. Lamson [et al.] // *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. – 1991. – Vol. 73, Iss. 2. – P. 401-407. – DOI 10.1210/jcem-73-2-401.

89. Integration of circulating tumor cell and neutrophil-lymphocyte ratio to identify high-risk metastatic castration-resistant prostate cancer patients / W. Chong, Z. Zhang, R. Luo [et al.] // *BMC cancer*. – 2021. – Vol. 21, Iss. 1. – P. 655. – DOI 10.1186/s12885-021-08405-3.

90. Integrative analysis of FOXP1 function reveals a tumor-suppressive effect in prostate cancer / K. Takayama, T. Suzuki, S. Tsutsumi [et al.] // *Molecular endocrinology*. – 2014. – Vol. 28, Iss. 12. – P. 2012-2024. – DOI 10.1210/me.2014-1171.

91. Interleukins in cancer: from biology to therapy / D. Briukhovetska, J. Dörr, S. Endres [et al.] // *Nature reviews. Cancer*. – 2021. – Vol. 21, Iss 8. – P. 481-499. – DOI 10.1038/s41568-021-00363-z.

92. Ionescu, F. Clinical applications of liquid biopsy in prostate cancer: from screening to predictive biomarker / F. Ionescu, J. Zhang, L. Wang // *Cancers*. – 2022. – Vol. 14, Iss. 7. – P. 1728. – DOI 10.3390/cancers14071728.

93. Is tumour volume an independent predictor of outcome after radical prostatectomy for high-risk prostate cancer? / N. Raison, P. Servian, A. Patel [et al.] // *Prostate cancer and prostatic diseases*. – 2023. – Vol. 26, Iss. 2. – P. 282-286. – DOI 10.1038/s41391-021-00468-4.

94. Jain, M. A. Prostate cancer screening / M. A. Jain, S. W. Leslie, A. Sapro // *Statpearls Knowledge Base: Treasure Island (FL)*, 2023. – P. 235.

95. Jiang, L. L. Association between FOXP3 promoter polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis / L. L. Jiang, L. W. Ruan // *Oncology letters*. – 2014. – Vol. 8, Iss. 6. – P. 2795-2799. – DOI 10.3892/ol.2014.2585.

96. Kohaar, I. A rich array of prostate cancer molecular biomarkers: opportunities and challenges / I. Kohaar, G. Petrovics, S. Srivastava // *International journal of*

molecular sciences. – 2019. – Vol. 20, Iss. 8. – P. 1813-1818. – DOI 10.3390/ijms20081813.

97. Lam, E. W. Forkhead box transcription factors in cancer initiation, progression and chemotherapeutic drug response / E. W. Lam, A. R. Gomes // *Frontiers in oncology*. – 2014. – Vol. 29, Iss. 4. – P. 305. – DOI 10.3389/fonc.2014.00305.

98. Lepor, A. The prostate health index: its utility in prostate cancer detection / A. Lepor, W. J. Catalona, S. Loeb // *The Urologic clinics of North America*. – 2016. – Vol. 43, Iss. 1. – P. 1-6. – DOI 10.1016/j.ucl.2015.08.001.

99. Livak, K. J. Analysis of relative gene expression data using Real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method / K. J. Livak, T. D. Schmittgen // *Methods*. – 2001. – Vol. 25, Iss. 4. – P. 402-408. – DOI 10.1006/meth.2001.1262.

100. Loss of FOXP3 and TSC1 accelerates prostate cancer progression through synergistic transcriptional and posttranslational regulation of c-MYC / L. Wu, B. Yi, S. Wei [et al.] // *Cancer research*. – 2019. – Vol. 79, Iss. 7. – P. 1413-1425. – DOI 10.1158/0008-5472.CAN-18-2049.

101. M2 macrophages and regulatory T cells in lethal prostate cancer / A. Erlandsson, J. Carlsson, M. Lundholm [et al.] // *The Prostate*. – 2019. – Vol. 79, Iss. 4. – P. 363-369. – DOI 10.1002/pros.23742.

102. MAT2A localization and its independently prognostic relevance in breast cancer patients / P. Y. Chu, H. J. Wu, S. M. Wang [et al.] // *International journal of molecular sciences*. – 2021. – Vol. 22, Iss. 10. – Article 5382. – DOI 10.3390/ijms22105382.

103. Metastatic colon adenocarcinoma has a significantly elevated expression of IL-10 compared with primary colon adenocarcinoma tumors / M. H. Townsend, A. M. Felsted, S. R. Piccolo [et al.] // *Cancer biology & therapy*. – 2018. – Vol. 19, Iss. 10. – P. 913-920. – DOI 10.1080/15384047.2017.1360453.

104. MicroRNA-23b and microRNA-27b plus flutamide treatment enhances apoptosis rate and decreases CCNG1 expression in a castration-resistant prostate cancer cell line / R. C. Pimenta, N. I. Viana, S. Reis [et al.]. – Текст: электронный // *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and*

Medicine. – 2018. – Vol. 40, Iss. 11. – URL: <https://doi.org/10.1177/1010428318803011> (Дата обращения: 02.10.2024).

105. MicroRNAs as prognostic markers in prostate cancer / I. Suer, E. Guzel, O. F. Karatas [et al.] // *The Prostate*. – 2019. – Vol. 79, Iss. 3. – P. 265-271. – DOI 10.1002/pros.23731.

106. miR-142-3p restricts cAMP production in CD4+CD25- T cells and CD4+CD25+ TREG cells by targeting AC9 mRNA / B. Huang, J. Zhao, Z. Lei [et al.] // *EMBO reports*. – 2009. – Vol. 10, Iss. 2. – P. 180-185. – DOI 10.1038/embor.2008.224.

107. miR-618 inhibits prostate cancer migration and invasion by targeting FOXP2 / X. L. Song, Y. Tang, X. H. Lei [et al.] // *Journal of Cancer*. – 2017. – Vol. 8, Iss. 13. – P. 2501-2510. – DOI 10.7150/jca.17407.

108. Moreno, J. G. Evolution of the liquid biopsy in metastatic prostate cancer / J. K. Moreno, L. G. Gomella // *Urology*. – 2019. – Vol. Vol. 132. – P. 1-9. – DOI 10.1016/j.urology.2019.06.006.

109. Novel technique for MR elastography of the prostate using a modified standard endorectal coil as actuator / G. Thörmer, M. Reiss-Zimmermann, J. Otto [et al.] // *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI*. – 2013. – Vol. 37, Iss. 6. – P. 1480-1485. – DOI 10.1002/jmri.23850.

110. Ouyang, W. IL-10 family cytokines IL-10 and IL-22: from basic science to clinical translation / W. Ouyang, A. O'Garra // *Immunity*. – 2019. – Vol. 50, Iss. 4. – P. 871-891. – DOI 10.1016/j.immuni.2019.03.020.

111. Overexpression of regulatory T cell-related markers (FOXP3, CTLA-4 and GITR) by peripheral blood mononuclear cells from patients with breast cancer / E. Khalife, A. Khodadadi, A. Talaeizadeh [et al.] // *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. – 2018. – Vol. 19, Iss. 11. – P. 3019-3025. – DOI 10.31557/APJCP.2018.19.11.3019.

112. PCA3 long noncoding RNA modulates the expression of key cancer-related genes in LNCaP prostate cancer cells / A. E. Lemos, L. B. Ferreira, N. M. Batoreu [et al.] // *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental*

Biology and Medicine. – 2016. – Vol. 37, Iss. 8. – P. 11339-11348. – DOI 10.1007/s13277-016-5012-3.

113. PCA3 molecular urine test as a predictor of repeat prostate biopsy outcome in men with previous negative biopsies: a prospective multicenter clinical study / M. C. Gittelman, B. Hertzman, J. Bailen [et al.] // *The Journal of urology*. – 2013. – Vol. 190, Iss. 1. – P. 64 - 69. – DOI 10.1016/j.juro.2013.02.018.

114. PCA3: a molecular urine assay for predicting prostate biopsy outcome / I. L. Deras, S. M. Aubin, A. Blase [et al.] // *The Journal of urology*. – 2008. – Vol. 179, Iss. 4. – P. 1587-1592. – DOI 10.1016/j.juro.2007.11.038.

115. Posttranscriptional regulation of IL-10 gene expression through sequences in the 3'-untranslated region / M. J. Powell, S. A. Thompson, Y. Tone [et al.] // *Journal of immunology*. – 2000. – Vol. 165, Iss. 1. – P. 292-296. – DOI 10.4049/jimmunol.165.1.292.

116. Posttranscriptional regulation of interleukin-10 expression by hsa-miR-106a / A. Sharma, M. Kumar, J. Aich [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2009. – Vol. 106, Iss. 14. – P. 5761-5766. – DOI 10.1073/pnas.0808743106.

117. Presence of Foxp3 expression in tumor cells predicts better survival in HER2-overexpressing breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy / S. Ladoire, L. Arnould, G. Mignot [et al.] // *Breast cancer research and treatment*. – 2011. – Vol. 25, Iss. 1. – P. 65-72. – DOI 10.1007/s10549-010-0831-1.

118. Prognostic value of IL-10 expression in tumor tissues of breast cancer patients / Y. Li, H. Yu, S. Jiao [et al.] // *Xi bao yu fen zi mian yi xue za zhi = Chinese journal of cellular and molecular immunology*. – 2014. – Vol. 30, Iss. 5. – P. 517-520.

119. Prognostic value of serum IL-8 and IL-10 in patients with ovarian cancer undergoing chemotherapy / L. Zhang, W. Liu, X. Wang [et al.] // *Oncology letters*. – 2019. – Vol. 17, Iss. 2. – P. 2365-2369. – DOI 10.3892/ol.2018.9842.

120. Prognostic value of testosterone for the castration-resistant prostate cancer patients: a systematic review and meta-analysis / N. Miura, K. Mori, H. Mostafaei [et

al.] // International journal of clinical oncology. – 2020. – Vol. 25, Iss. 11. – P. 1881-1891. – DOI 10.1007/s10147-020-01747-1.

121. Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis / A. M. De Marzo, V. L. Marchi, J. I. Epstein [et al.] // The American journal of pathology. – 1999. – Vol. 155, Iss. 6. – P. 1985-1992. – DOI 10.1016/S0002-9440(10)65517-4.

122. Prostate biopsy-related infection : a systematic review of risk factors, prevention strategies, and management approaches / M. J. Roberts, H. Y. Bennett, P. N. Harris [et al.] // Urology. – 2017. – Vol. 104. – P. 11-21. – DOI 10.1016/j.urology.2016.12.011.

123. Prostate cancer – major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual / M. K. Buyyounouski, P. L. Choyke, J. K. McKenney [et al.] // CA : a cancer journal for clinicians. – 2017. – Vol. 67, Iss. 3. – P. 245 – 253. – DOI 10.3322/caac.21391.

124. Prostate cancer detection with real-time elastography using a bi-plane transducer: comparison with step section radical prostatectomy pathology / Y. Zhu, Y. Chen, T. Qi [et al.] // World journal of urology. – 2014. – Vol. 32, Iss. 2. – P. 329-333. – DOI 10.1007/s00345-012-0922-1.

125. Prostate cancer survivors present long-term, residual systemic immune alterations / K. Balázs, Z. S. Kocsis, P. Ágoston [et al.] // Cancers (Basel) – 2022. – Vol. 14, Iss. 13. – P. 3058. – DOI 10.3390/cancers14133058.

126. Prostate cancer, version 1.2016 / J. L. Mohler, A. J. Armstrong, R. R. Bahnon [et al.] // Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN. – 2016. – Vol. 14, Iss. 1. – P. 19-30. – DOI 10.6004/jnccn.2016.0004.

127. Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate / T. A. Stamey, N. Yang, A. R. Hay [et al.] // The New England journal of medicine. – 1987. – Vol. 317, Iss. 15. – P. 909-916. – DOI 10.1056/NEJM198710083171501.

128. Prostate-specific antigen modulates the expression of genes involved in prostate tumor growth / B. Bindukumar, S. A. Schwartz, M. P. Nair [et al.] //

Neoplasia : an international journal for oncology research. – 2005. – Vol. 7, Iss. 3. – P. 241-252. – DOI 10.1593/neo.04529.

129. Quality of life during treatment with chemohormonal therapy : analysis of E3805 chemohormonal androgen ablation randomized trial in prostate cancer / A. K. Morgans, Y. H. Chen, C. J. Sweeney [et al.] // *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 2018. – Vol. 36, Iss. 11. – P. 1088-1095. – DOI 10.1200/JCO.2017.75.3335.

130. Quantifying the role of PSA screening in the US prostate cancer mortality decline / R. Etzioni, A. Tsodikov, A. Mariotto [et al.] // *Cancer causes & control : CCC*. – 2008. – Vol. 19, Iss. 2. – P. 175-181. – DOI 10.1007/s10552-007-9083-8.

131. Quantitative and qualitative analysis of blood-based liquid biopsies to inform clinical decision-making in prostate cancer / I. Casanova-Salas, A. Athie, P. C. Boutros [et al.] // *European urology*. – 2021. – Vol. 79, Iss. 6. – P. 762-771. – DOI 10.1016/j.eururo.2020.12.037.

132. Radej, S. Prostate infiltration by Treg and Th17 cells as an immune response to propionibacterium acnes infection in the course of benign prostatic hyperplasia and prostate cancer / S. Radej, M. Szewc, R. Maciejewski // *International journal of molecular sciences*. – 2022. – Vol. 23, Iss. 16. – Article 8849. – DOI 10.3390/ijms23168849.

133. Relationships of interleukin-10 with the regulatory T cell ratio and prognosis of cervical cancer patients / B. Wang, H. Wang, P. Li [et al.] // *Clinics*. – 2018. – Vol. 3, Iss. 73. – Article e679. – DOI 10.6061/clinics/2018/e679.

134. Samiea, A. The effect of Interleukin-10 on macrophage activation and prostate cancer cell phenotype: A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of doctor of philosophy the University of British Columbia (Vancouver) / Samiea A. – Vancouver, 2020. – 178 p.

135. Saraiva, M. The regulation of IL-10 production by immune cells / M. Saraiva, A. O'Garra // *Nature reviews. Immunology*. – 2010. – Vol. 10, Iss. 3. – P. 170-181. – DOI 10.1038/nri2711.

136. Serum concentration of interleukin-35 and its association with tumor stages and FOXP3 gene polymorphism in patients with prostate cancer / N. Chatrabnous, A. Ghaderi, A. Ariafar [et al.] // *Cytokine*. – 2019. – Vol. 113. – P. 221-227. – DOI 10.1016/j.cyto.2018.07.006.
137. Serum protein corona abolishes changes in the expression of proinflammatory genes induced by quantum dots in human blood mononuclear cell / D. V. Novikov, S. G. Selivanova, N. V. Krasnogorova [et al.] // *Bulletin of experimental biology and medicine*. – 2020. – Vol. 169. – P. 95-99. – DOI 10.1007/s10517-020-04832-7.
138. Sfanos, K. S. Prostate cancer and inflammation: the evidence / K. S. Sfanos, A. M. De Marzo // *Histopathology*. – 2012. – Vol. 60, Iss. 1. – P. 199-215. – DOI 10.1111/j.1365-2559.2011.04033.x.
139. Shalpour, S. Pas de deux: control of anti-tumor immunity by cancer-associated inflammation / S. Shalpour, M. Karin // *Immunity*. – 2019. – Vol. 51, Iss. 1. – P. 15-26. – DOI 10.1016/j.immuni.2019.06.021.
140. Shear wave elastography for guiding prostate puncture and differential diagnosis of prostatic lesions / J. Wei, X. Yang, C. Wei [et al.] // *Zhonghua nan ke xue = National journal of andrology*. – 2019. – Vol. 25, Iss. 9. – P. 792-796.
141. Shear wave elastography for localization of prostate cancer lesions and assessment of elasticity thresholds: implications for targeted biopsies and active surveillance protocols / K. Boehm, G. Salomon, B. Beyer [et al.] // *The Journal of urology*. – 2015. – Vol. 193, Iss. 3. – P. 794-800. – DOI 10.1016/j.juro.2014.09.100.
142. Shear-wave elastography for detection of prostate cancer: a systematic review and diagnostic meta-analysis / S. Woo, C. H. Suh, S. Y. Kim [et al.] // *AJR. American journal of rentgenology*. – 2017. – Vol. 209, Iss. 3. – P. 806-814.
143. Shive, C. Inflammation, immune senescence, and dysregulated immune regulation in the elderly / C. Shive, P. Pandiyan // *Frontiers in aging*. – 2022. – Vol. 3. – Article 840827. – DOI 10.3389/fragi.2022.840827.

144. Somatic single hits inactivate the X-linked tumor suppressor FOXP3 in the prostate / L. Wang, R. Liu, W. Li [et al.] // *Cancer cell*. – 2009. – Vol. 16, Iss. 4. – P. 336-346. – DOI 10.1016/j.ccr.2009.08.016.
145. Structural characterization of GASDALIE Fc bound to the activating Fc receptor FcγRIIIa / A. A. Ahmed, S. R. Keremane, J. Vielmetter [et al.] // *Journal of Structural Biology*. – 2016. – Vol. 194, Iss. 1. – P. 78-89. – DOI 10.1016/j.jsb.2016.02.001.
146. Sun, X. Y. Testosterone and prostate specific antigen stimulate generation of reactive oxygen species in prostate cancer cells / X. Y. Sun, S. P. Donald, J. M. Phang // *Carcinogenesis*. – 2001. – Vol. 22, Iss. 11. – P. 1775-1780. – DOI 10.1093/carcin/22.11.1775.
147. Szyłberg, Ł. The role of FOXP3 in human cancers / L. Szyłberg, D. Karbownik, A. Marszałek // *Anticancer research*. – 2016. – Vol. 36, Iss. 8. – P. 3789-3794.
148. Testosterone levels and prostate cancer prognosis: systematic review and meta-analysis / M. Claps, F. Petrelli, O. Caffo [et al.] // *Clinical genitourinary cancer*. – 2018. – Vol. 16, Iss. 3. – P. 165-175, e2. – DOI 10.1016/j.clgc.2018.01.005.
149. Testosterone replacement effectively inhibits the development of experimental autoimmune orchitis in rats: evidence for a direct role of testosterone on regulatory T cell expansion / M. Fijak, E. Schneider, J. Klug, J. [et al.] // *The Journal of immunology : official journal of the American Association of Immunologists*. – 2011. – Vol. 186, Iss. 9. – P. 5162-5172. – DOI 10.4049/jimmunol.1001958.
150. The effect of interleukin 10 polymorphisms on breast cancer susceptibility in Han women in Shaanxi Province / M. Li, C. Yue, X. Zuo [et al.] // *PloS one*. – 2020. – Vol. 15, Iss. 5. – Article e0232174. – DOI 10.1371/journal.pone.0232174.
151. The potential of microRNAs as prostate cancer biomarkers / L. Fabris, Y. Ceder, A. M. Chinnaiyan [et al.] // *European urology*. – 2016. – Vol. 70, Iss. 2. – P. 312-322. – DOI 10.1016/j.eururo.2015.12.054.
152. The role of inflammatory cytokines in the pathogenesis of colorectal carcinoma-recent findings and review / J. Borowczak, K. Szczerbowski, M. Maniewski

[et al.]// *Biomedicines*. – 2022. – Vol. 10, Iss. 7. – P. 1670. – DOI 10.3390/biomedicines10071670.

153. The role of regulatory T cells in the pathogenesis and treatment of prostate cancer / V. Karpisheh, S. M. Mousavi, P. Naghavi Sheykholeslami [et al.] // *Life sciences*. – 2021. – Vol. 1, Iss. 284. – P. 119132. – DOI 10.1016/j.lfs.2021.119132.

154. The tumor innate immune microenvironment in prostate cancer: an overview of soluble factors and cellular effectors / M. T. Palano, M. Gallazzi, M. Cucchiara [et al.] // *Exploration of targeted anti-tumor therapy*. – 2022. – Vol. 3, Iss. 5. – P. 694-718. – DOI 10.37349/etat.2022.00108.

155. Tumor volume and prostate specific antigen: implications for early detection and defining a window of curability / R. J. Babaian, P. Troncoso, L. C. Steelhammer [et al.] // *The Journal of urology*. – 1995. – Vol. 154, Iss. 5. – P. 1808-1812. – DOI 10.1016/s0022-5347(01)66790-9.

156. Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer / P. Salama, M. Phillips, F. Grieu [et al.] // *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 2009. – Vol. 27, Iss. 2. – P. 186-192. – DOI 10.1200/JCO.2008.18.7229.

157. Upregulated circular RNA circ-102004 that promotes cell proliferation in prostate cancer / J. Si-Tu, Y. Cai, T. Feng [et al.] // *International journal of biological macromolecules*. – 2019. – Vol. 1, Iss. 122. – P. 1235-1243. – DOI 10.1016/j.ijbiomac.2018.09.076.

158. Urinary PCA3 to predict prostate cancer in a cohort of 1015 patients / V. Vlaeminck-Guillem, M. Devonec, D. Champetier [et al.] // *Progrès en urologie : journal de l'Association française d'urologie et de la Société française d'urologie*. – 2015. – Vol. 25, Iss. 16. – P. 1160-1168. – DOI 10.1016/j.purol.2015.08.005.

159. Validation of a genomic classifier that predicts metastasis following radical prostatectomy in an at risk patient population / R. J. Karnes, E. J. Bergstralh, E. Davicioni [et al.] // *The Journal of urology*. – 2013. – Vol. 190, Iss. 6. – P. 2047-2053. – DOI 10.1016/j.juro.2013.06.017.

160. Volume change of the prostate and seminal vesicles in male hypogonadism after androgen replacement therapy / I. Sasagawa, T. Nakada, T. Kazama [et al.] // International urology and nephrology. – 1990. – Vol. 22, Iss. 3. – P. 279-284. – DOI 10.1007/BF02550407.

161. Wang, X. Changes of Th17/Treg cell and related cytokines in pancreatic cancer patients / X. Wang, L. Wang, Q. Mo // International journal of clinical and experimental pathology. – 2015. – Vol. 8, Iss. 5. – P. 5702-5708.

162. Why and How to Evaluate Chronic Prostatic Inflammation / V. Ficarra, S. Sekulovic, F. Zattoni [et al.] // European urology supplements: official journal of the European Association of Urology. – 2013. – Vol. 12. – P. 110-115. – DOI 10.1016/j.eursup.2013.08.002.

163. Yadav, U. Interleukin-10 (IL-10) gene polymorphisms and prostate cancer susceptibility: evidence from a meta-analysis / U. Yadav, P. Kumar, V. Rai // medRxiv. – 2020. Vol. 12. – P. 1-12. – DOI <https://doi.org/10.1101/2020.11.09.20228825>.

164. Y-box-binding protein 1 (YB-1) and its functions / I. A. Eliseeva, E. R. Kim, S. G. Guryanov [et al.] // Biochemistry (Mosc) – 2011. – Vol. 76, Iss. 13. – P. 1402-1433. – DOI 10.1134/S0006297911130049.