

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
ДОНЕЦКОЙ НАРОДНОЙ РЕСПУБЛИКИ
ГОСУДАРСТВЕННАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ВЫСШЕГО
ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ «ДОНЕЦКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ М. ГОРЬКОГО»

На правах рукописи

КРИВОБОК АЛЕКСАНДР АЛЕКСАНДРОВИЧ

УДК 616.65-006-032.2-037-079.4

**ПАТОГЕНЕЗ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ
И ПРОГНОЗ ТЕЧЕНИЯ ОПУХОЛЕВЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ
ПРЕДСТАТЕЛЬНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

14.03.03 – патологическая физиология
14.01.23 – урология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Донецк 2022

Работа выполнена в Государственной образовательной организации высшего профессионального образования «Донецкий национальный медицинский университет имени М. Горького» (ГОО ВПО ДОННМУ ИМ. М. ГОРЬКОГО), г. Донецк

Научные руководители: доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом координации научных исследований и прогнозирования Республиканский травматологический центр Министерства Здравоохранения Донецкой Народной Республики, г. Донецк, **Золотухин Сергей Евгеньевич**

кандидат медицинских наук, заведующий кафедрой урологии ГОО ВПО ДОННМУ ИМ. М. ГОРЬКОГО **Малинин Юрий Юрьевич**

Официальные оппоненты: **Енгенов Никос Михайлович**, доктор медицинских наук, доцент, Донецкое клиническое территориальное медицинское объединение Министерства Здравоохранения Донецкой Народной Республики, г. Донецк, заведующий хирургическим отделением № 2

Пепенин Владимир Разумникович, доктор медицинских наук, профессор кафедры госпитальной хирургии, урологии и онкологии Государственного учреждения Луганской Народной Республики «ЛУГАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ СВЯТИТЕЛЯ ЛУКИ»

Ведущая организация: **Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В. К. Гусака Министерства Здравоохранения Донецкой Народной Республики, г. Донецк**

Защита состоится «21» февраля 2023 года в 12:00 на заседании Диссертационного совета Д 01.022.05 при ГОО ВПО ДОННМУ ИМ. М. ГОРЬКОГО по адресу: 283003, г. Донецк, пр-т Ильича, 16. Тел. / факс: (062) 344 41 51, 344 41 51, e-mail: spec-sovet-01-022-05@dnmu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГОО ВПО ДОННМУ ИМ. М. ГОРЬКОГО по адресу: 283003, г. Донецк, пр. Ильича, 16.

Автореферат разослан «_____» января 2023 года

Ученый секретарь
Диссертационного совета Д 01.022.05
д. мед. н., доцент

А.И. Кравченко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Доброкачественная гиперплазия (ДГПЖ) и рак предстательной железы (РПЖ) в возрасте старше 50 лет поражают практически все мужское население планеты. РПЖ по распространенности в странах Европы и США стоит наравне с раком легкого (Аполихин О.И. и соавт., 2013; Франк Г.А., 2018; Montironi R. et al., 2022). Во всем мире число больных данной патологией ежегодно растет, причем каждые 10 лет оно удваивается, а летальность при РПЖ составляет 9% среди всех онкологических заболеваний (Жариков Г.М., 2012; Herstein A. et al., 2020). Столь широкое распространение РПЖ определяет актуальность поиска методик, повышающих эффективность их ранней диагностики, прогнозирования течения и индивидуальных программ комплексной терапии.

Введение в клиническую практику иммунологического определения уровня простатспецифического антигена (ПСА), биохимических исследований крови, в частности, определение общего тестостерона, гистологических методик с оценкой степени тканевой атипии, многочисленных инструментальных методов обследования (в первую очередь ультразвукового и рентгенологического) значительно расширило возможности ранней диагностики и дифференциальной диагностики объемных заболеваний предстательной железы (Колесников Г.П. и соавт., 2007; Коссов Ф.А. и соавт., 2017; Морозов С.П. и соавт., 2011). Несмотря на ощутимый прогресс, точность диагностики в настоящее время не превышает 45% (Пушкарь Д.Ю. и соавт., 2014; Cuvillier O. et al., 2011), а с точностью диагностики коррелирует эффективность лечения. Пожилой и старческий возраст, а также наличие тяжелых коморбидных заболеваний увеличивает риск осложнений, связанных с оперативным лечением и ограничивает использование радикальной простатэктомии (Тимофеева А.В. и соавт., 2015; Hittelman A.V. et al., 2021). Возникновению и развитию опухолевого заболевания предстательной железы, особенно злокачественного характера, также способствует неэффективное регулирование клетками иммунной системы процессов апоптоза и пролиферации. Более того, стандартные методы лечения больных с онкологическими заболеваниями предстательной железы (гормональная терапия, лучевая терапия, химиотерапия) сами по себе усугубляют имеющиеся иммунные нарушения у пациентов и могут снижать ожидаемую эффективность лечения и их выживаемость.

Следует отметить, что клиническое значение выраженности иммунологических нарушений, сопровождающих рост и распространение опухоли в предстательной железе, изучено недостаточно, а прогностические критерии комплексной оценки тяжести состояния больных, особенно при злокачественном течении заболевания, нуждаются в дальнейшем совершенствовании.

Степень разработанности проблемы. Снижение функциональной активности иммунологического статуса пациентов проявляется на ранних стадиях опухоли предстательной железы и усиливается по мере

прогрессирования процесса (Журавлев О.В., 2013; Володин Н.Н. и соавт., 2020). При злокачественном течении заболевания ведущими изменениями иммунологических показателей будут: снижение антигензависимой активности Т-лимфоцитов, уменьшение функциональной активности естественных клеток-киллеров (Лубенников А.е. и соавт., 2008; Мельников В.Л. и соавт., 2015). На более поздних стадиях заболевания происходит активация гуморального звена иммунитета, что может быть обусловлено прорастанием опухоли в соседние ткани и появлением метастазов (Ефремов Г.Д., 2011; Bradford T.J. et al., 2006). Следовательно, количественные изменения активированных Т-лимфоцитов и циркулирующих иммунных комплексов могут отражать начало экстракапсулярного роста опухоли предстательной железы. Поэтому при обследовании пациентов с подозрением на первичную опухоль предстательной железы современными учеными рекомендуется исследовать функциональную активность компонентов иммунной системы и комплиментарность их работы относительно друг друга (Попов С.В. и соавт., 2018; Davidsson S. et al., 2022). В настоящее время иммунологические критерии, а также методики прогнозирования типа и тяжести течения объемных заболеваний предстательной железы не разработаны. Появление таких методик позволит повысить точность диагностики онкологической патологии, обеспечить индивидуальный подход к выбору средств и методов консервативного и оперативного лечения больных, а осуществлять контроль эффективности лечения.

Цель исследования – установить роль иммунологических нарушений в патогенезе опухолевых заболеваний предстательной железы и на основе наиболее информативных показателей, характеризующих эти нарушения, разработать методы прогнозирования типа опухоли и тяжести состояния больных.

Задачи исследования

1. Уточнить механизмы нарушений иммунитета при ДГПЖ и противоопухолевой иммунологической толерантности у пациентов с РПЖ. Установить роль ИЛ-1 β , ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ10 и ФНО- α в механизмах противоопухолевой защиты и стимуляции опухолевой пролиферации у больных с опухолевыми заболеваниями предстательной железы.
2. Установить особенности иммунологической реактивности у больных с ДГПЖ и РПЖ для разработки метода прогнозирования типа и тяжести опухолевого процесса.
3. Разработать метод прогнозирования типа и тяжести опухолевого процесса предстательной железы при РПЖ на основе комплексного учета лабораторных и инструментальных данных.
4. Разработать метод прогнозирования метастазирования и степени дифференцировки опухолевой ткани при РПЖ на основании лабораторно-инструментальных показателей у пациентов.

Объект исследования: патогенез ДГПЖ, высоко- и низкоагрессивных форм РПЖ у больных.

Предмет исследования: патогенетическая значимость иммунологических,

морфологических, гистологических (шкала Глисона), биохимических (тестостерон, ПСА) признаков ДГПЖ и РПЖ, их связь с характером опухолевого процесса и тяжестью состояния больных; прогнозирование типа и тяжести опухолевого процесса и вероятности метастазирования после консервативного и оперативного лечения РПЖ.

Научная новизна

Уточнен механизм нарушений иммунитета у пациентов с ДГПЖ, противоопухолевой иммунологической толерантности и стимуляции опухолевой пролиферации у пациентов с РПЖ. Получены результаты, свидетельствующие о важной роли субпопуляций регуляторных Т-клеток CD4⁺, CD8⁺, а также нормальных киллеров (NK клеток) в контроле опухолевого роста. Выявлено нарушение механизмов реализации цитотоксической функции лимфоцитов и патогенетическое значение ИЛ-1β, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ10 и ФНО-α при РПЖ. Показано, что в процессе озлокачествления опухолевой ткани важное значение имеет снижение потенциала цитотоксичности лимфоцитов.

Приведена патогенетическая оценка связи иммунофенотипа лимфоцитов периферической крови больных ДГПЖ и РПЖ с уровнем андрогенов, ПСА, гистологической картиной опухолевой ткани, показателями трансректального ультразвукового исследования (ТРУЗИ).

Выявлены наиболее информативные показатели, отражающие нарушения в иммунной и гормональной системе, в гистологической структуре ткани, характерные для разных типов злокачественности опухолевых заболеваний предстательной железы и тяжести состояния больных.

Разработаны на основе комплексного учета лабораторных и инструментальных данных метод прогнозирования типа и тяжести опухолевого процесса предстательной железы, а также метод прогнозирования метастазирования и степени дифференцировки опухолевой ткани у пациентов.

Теоретическое и практическое значение полученных результатов

У пациентов с ДГПЖ уточнен механизм нарушений иммунитета. В этом механизме гиперплазированной клеткой запускается каскад иммунных реакций с участием NK-клеток, цитотоксических Т-лимфоцитов и макрофагов. Указанные иммуноциты способны активировать В-лимфоциты с последующей их дифференцировкой в плазмочитарные клетки, а также обеспечивать синтез специфических иммуноглобулинов. Данные гуморальные факторы иммунитета обладают способностью подавлять разрастание ткани предстательной железы. При РПЖ такой механизм противоопухолевого иммунитета нарушается за счет развития противоопухолевой иммунологической толерантности, при которой угнетаются синтез и функции цитотоксических Т-лимфоцитов, NK-клеток и макрофагов. Происходит также прямое и/или опосредованное подавление активности В-лимфоцитов и снижение синтеза гуморальных факторов иммунной защиты. Указанные нарушения приводят к прогрессии роста опухолевой ткани в предстательной железе.

Установлена роль цитокинов в формировании противоопухолевого иммунитета и развитии противоопухолевой иммунологической толерантности. Выявлено, что ИЛ-4 и ФНО-α усиливают противоопухолевую цитотоксичность

и подавляют размножение опухолевых клеток. ИЛ-1 β , ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10 и ФНО- α активируют Т-лимфоциты, НК-клетки, производство и дифференцировку В-лимфоцитов и продукцию антител. ИЛ-1 β и ИЛ-6 также способны стимулировать опухолевую пролиферацию, а ИЛ-1 β , ИЛ-4, ИЛ-8, ИЛ-10 и ФНО- α – угнетать противоопухолевый иммунитет. Угнетение противоопухолевого иммунитета проявляется в подавлении миело- и лимфопоэза, активности Т-лимфоцитов, в стимулировании апоптоза нейтрофилов с высокой цитотоксической активностью.

Непосредственное значение для клинической практики имеют разработанный метод прогнозирования типа и тяжести опухолевого процесса предстательной железы, а также метод прогнозирования метастазирования и степени дифференцировки опухолевой ткани у пациентов. Высокая достоверность прогнозирования этих методов обеспечивает более точную степень диагностики и дифференциальной диагностики РПЖ и персонифицирует выбор оптимального лечения.

Материалы диссертационной работы внедрены в практику урологической службы Донецкого клинического территориального медицинского объединения Министерства здравоохранения Донецкой Народной Республики, а также в педагогический процесс кафедр патологической физиологии им. Н.Н. Транквилитати и урологии Государственной образовательной организации высшего профессионального образования «Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького».

Методология и методы исследования. Работа выполнена при использовании материала клиники урологии Государственной образовательной организации высшего профессионального образования «Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького». Исследование построено на классических принципах выполнения НИР, основанных на фундаментальных и современных представлениях патологической физиологии и урологии. В работе были использованы современные клинические, лабораторные, инструментальные, аналитико-описательные и математико-статистические методы исследований. Методология исследования включала в себя анализ литературы по проблемам иммунологических нарушений у больных с опухолевыми заболеваниями предстательной железы, постановку цели и задач работы, разработку дизайна и протокола исследования, сбор, обработку и обобщение материала, формулировку выводов и практических рекомендаций. При разработке метода прогнозирования типа и тяжести опухолевого процесса предстательной железы и метода прогнозирования метастазирования и степени дифференцировки опухолевой ткани у пациентов использовался корреляционно-регрессионный анализ. Оценка значимости показателей осуществлялась по методу Вальда. Расчеты проводили на компьютере с использованием пакета программ для Microsoft Excel Professional for Windows 7.

Положения, выносимые на защиту

1. Субпопуляции регуляторных Т-клеток CD4⁺, CD8⁺, НК клеток, а также цитокины ИЛ-1 β , ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ10 и ФНО- α в контроле роста

опухолевой ткани в предстательной железе имеют важное патогенетическое значение.

2. С повышением степени злокачественности тканей РПЖ и, соответственно, тяжести состояния больных, усугубляются нарушения на уровне клеточного и гуморального иммунитета. В максимальной степени они выражены у пациентов с метастатическим РПЖ (T₃₋₄M_{1a-c}). Наибольшее значение в этом процессе имеет снижение потенциала цитотоксичности лимфоцитов.

3. Наличие различий в иммунологических показателях, а также в показателях, отражающих структуру и функцию предстательной железы, у больных с ДГПЖ и РПЖ дает основание для разработки методов прогнозирования типа и тяжести опухолевого процесса, степени дифференцировки опухолевой ткани и ее способности к метастазированию.

4. Метод прогнозирования типа и тяжести опухолевого процесса предстательной железы, а так же метод прогнозирования метастазирования и степени дифференцировки опухолевой ткани при РПЖ могут применяться в клинической практике для повышения точности диагностики и дифференциальной диагностики объемных заболеваний предстательной железы и персонализации выбора оптимального лечения.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов, изложенных в диссертационной работе, обусловлена достаточным объемом репрезентативного материала, использования для анализа современных средств и методов исследования, соответствующим целям и задачам работы, выбором актуальных методов статистического анализа полученных данных.

Положения, изложенные в диссертации, базируются на полученных данных исследований и соответствуют материалу, представленному в публикациях.

Личный вклад соискателя. Диссертация является самостоятельным научным исследованием автора. Диссертантом персонально проанализирована научная литература по исследуемой проблеме и проведен патентный поиск. В соответствии с поставленной руководителями диссертации целью работы для ее достижения соискателем сформулированы задачи и составлен план исследований. Диссертант самостоятельно курировал больных с ДГПЖ и РПЖ, проводил у них дополнительные исследования (ТРУЗИ, определение биохимических показателей и показателей иммунного статуса), разработал метод прогнозирования типа и тяжести опухолевого процесса предстательной железы, а также метод прогнозирования метастазирования и степени дифференцировки опухолевой ткани. Автор лично выполнил статистическую обработку и осуществил внедрение результатов в практику. Им также самостоятельно написаны разделы диссертации и автореферат. Диссертантом в работе не были использованы результаты и идеи соавторов публикаций.

Апробация результатов диссертации. Диссертационная работа апробирована на совместном заседании кафедры патологической физиологии им.п. Н.Н. Транквилимати и кафедры урологии Государственной

образовательной организации высшего профессионального образования «Донецкий национальный медицинский университет им. М.Горького». Основные положения диссертации были представлены на Международном медицинском форуме Донбасса «Наука побеждать... болезнь» 11-12 ноября 2021 года.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 12 научных работ, в том числе: семь статей – в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК, пять тезисов – в материалах конференций и форумов

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 118 страницах машинописного текста, состоит из вступления, обзора литературы, главы материалов и методов исследований, трёх глав описания результатов исследований, обобщения и анализа полученных результатов, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений, списка использованных источников литературы, который содержит наименований 166 (120 кириллицей и 46 латиницей). Диссертация иллюстрирована 16 рисунками и 6 таблицами.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования. Материалом для настоящего исследования явились клинико-морфологические данные 90 человек. Из них 16 пациентов в стадии $T_{1a-c} - T_{2a-c}M_0$, 17 – в стадии $T_{3a-b}M_0$, 28 – в стадии T_4M_0 и 29 – в стадии $T_{3-4}M_{1a-c}$. Все больные находились на лечении в клинике урологии Государственной образовательной организации высшего профессионального образования «Донецкий Национальный медицинский университет им. М. Горького» с 2011 по 2021 гг. В исследование включены пациенты, о которых имелись сведения о продолжительности жизни или причинах смерти до 01.10.2021 г.

Для сравнения клинико-лабораторных (физических, физиологических, биохимических и иммунологических) и инструментальных показателей создана первая контрольная группа из практически здоровых мужчин ($n = 20$) и вторая контрольная группа пациентов с ДГПЖ ($n = 36$).

Для больных РПЖ в стадии $T_{1a-c} - T_{2a-c}M_0$, – $63,7 \pm 5,7$, в стадии $T_{3a-b}M_0$ – $64,5 \pm 6,3$, в стадии T_4M_0 – $63,9 \pm 5,8$, в стадии $T_{3a-b-4}M_{1a-c}$ – $65,6 \pm 6,0$ лет. Средний возраст людей первой контрольной группы составил $54,4 \pm 5,6$ лет, а второй контрольной группы – $58,8 \pm 4,9$ лет. У большинства больных РПЖ в представленных группах был пожилой и старческий возраст, практически у всех из них имелись различные сопутствующие заболевания, которые во многом определяли тяжесть общего состояния, клиническую картину и развитие осложнений. В связи с этим нами произведена оценка общего состояния онкологического больного (Performance status). Она осуществлялась по индексу Карновского (0-100%) и шкале ECOG (0-4 балла). Выявлено, что по шкале Карновского все группы больных были сходными и каждый пациент имел нарушения на уровне 60 – 100%. Иными словами, большая часть больных являлась физически активными, способными к самообслуживанию, а некоторые продолжали

еще и активную трудовую деятельность.

Все исследования у пациентов были выполнены при поступлении в клинику и в последующие 1-2 дня пребывания в стационаре. Они включали в себя данные анамнеза, догоспитального обследования, лабораторно-инструментальных обследований в условиях стационара.

Обследование всех пациентов, включенных в исследование, начиналось с опроса, детализации анамнеза заболевания и анамнеза жизни, физикального обследования. Все больные были осмотрены терапевтом и такими смежными специалистами как кардиолог, эндокринолог, пульмонолог, ангиохирург.

Лабораторная диагностика включала в себя общие анализы крови и мочи, биохимический и иммунологический анализ крови, коагулограмму, исследование антител на HBs-ag, HCVat, реакцию Вассермана, антитела к вирусу иммунодефицита человека. Также в обязательный комплекс обследования перед хирургическим лечением входили электрокардиография и рентгенография органов грудной клетки

В качестве основных методов исследования предстательной железы применяли: пальцевое ректальное исследование, трансабдоминальное и трансректальное ультразвуковое исследование с использованием аппаратов «Aloka» SSD-2000 (Япония) и «Siemens» SL-450 (Германия). С помощью ТРУЗИ определяли объем предстательной железы. При оценке структуры предстательной железы обращали внимание на выявление признаков, подозрительных на наличие опухолевой ткани. К ним относили гипоехогенные участки в периферической и транзиторной зонах предстательной железы, изоэхогенные объёмные образования, распространяющиеся на капсулу железы, в парапростатическую клетчатку, семенные пузырьки, мочевой пузырь и прямую кишку. Для выявления метастазов в легких, костях поясничного отдела позвоночника и костей таза применяли рентгенографию с использованием компьютерного томографа «Siemens» (Германия). После подписания информированного согласия производили 24-точечную пункционную биопсию предстательной железы (трансректальным методом).

У больных РПЖ гистологическое исследование тканей предстательной железы осуществляли путем парафиновой проводки биоптатов с дальнейшей окраской срезов гематоксилин-эозином и их визуализацию при помощи оптической системы Optiphot-II фирмы Niko (Япония).

Из биохимических методов в сыворотке крови определяли уровень ПСА (общий и свободный) и общую концентрацию тестостерона (Камышников В.С. и соавт., 2020). Показатели общего и свободного ПСА определяли на автоматизированном анализаторе Cobas Cor с использованием тест-систем компании Roche (Швейцария). Концентрацию тестостерона определяли иммуноферментным методом с применением коммерческих тест-систем Алькор-Био (Санкт-Петербург). Подсчет основных субпопуляций лимфоцитов произведен на лазерном проточном цитофлюориметре «Beckman Coulter EPIC CSXL» с помощью меченых антител «Immunotec» (Франция) с выявлением поверхностных маркеров лимфоцитов CD3⁺, CD4⁺(хелперы), CD8⁺ (цитотоксические Т-лимфоциты), CD19⁺ (В-лимфоциты), CD56⁺, CD16⁺

(естественные киллеры), CD3⁺-HLA-DR, (Т-активные лимфоциты), CD25⁺ (В-активные лимфоциты). Концентрацию иммунных клеток определяли в мкл (Володин Н.Н. и соавт., 2020).

Для изучения неспецифической иммунологической защиты организма применяли методику оценки фагоцитарного звена иммунной системы. В работе определяли поглотительную способность фагоцитирующих нейтрофильных гранулоцитов крови: фагоцитарное число (ФА) – долю активно фагоцитирующих нейтрофилов, выраженную в %; фагоцитарное число (ФЧ) – среднее число частиц, поглощенных одним фагоцитирующим нейтрофилом (Фришень Я.Б., 2017). Количество фагоцитирующих нейтрофилов рассчитывали в 1 мкл периферической крови с учетом абсолютного числа лейкоцитов и доли сегментоядерных нейтрофилов. В качестве тест-системы при оценке способности фагоцитов генерировать кислородные радикалы для борьбы с инфекционными агентами использовали краситель нитросиний тетразолий (НСТ-тест) (Нагоев Б.С., 1985). Концентрацию сывороточных иммуноглобулинов IgA, IgM, IgG, IgE определяли методом иммунопреципитации в агаровом геле (Володин Н.Н. и соавт., 2020). Концентрацию цитокинов в сыворотке крови пациентов и группы контроля определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих наборов ЗАО «Вектор Бест» в диапазоне концентраций: для ИЛ-1 β , ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- α – 5-250 пг/мл; ИЛ-6 – 5,6-300 пг/мл; ИЛ-10 – 0-500 пг/мл (Орадова А.Ш. и соавт., 2017).

Математическая обработка полученных результатов проводилась с использованием пакетов программ Microsoft Excel 2010, STATISTICA 10 (StatSoft Inc., USA), онлайн-калькулятора (<http://gen-exp.ru/calculatoror.php>). Для построения прогностической модели использована технология многофакторной логистической регрессии с пошаговым включением независимых переменных из программного пакета GLZ (Statistica 10, StatSoft, Inc. США) (Сергиенко В.И. и соавт., 2006).

Результаты исследования и их обсуждение. Работа состояла из нескольких этапов исследования. На первом этапе установлены особенности нарушения иммунологической реактивности у больных с РПЖ для осуществления разработки метода прогнозирования типа опухолевой ткани и тяжести состояния пациентов. Получен материал, подтверждающий наличие иммунологических расстройств и нарушений противоопухолевой иммунологической защиты организма. Результаты исследований свидетельствуют о важной роли субпопуляций регуляторных Т-клеток, CD4⁺, CD8⁺, а также НК клеток в контроле роста опухолевых клеток. Выявлено нарушение механизмов реализации цитотоксической функции лимфоцитов при РПЖ. Показано, что в процессе повышения степени злокачественности опухолевой ткани важное значение имеет снижение потенциала цитотоксичности лимфоцитов.

Таблица 1 – Показатели клеточного иммунитета в группах контроля и у пациентов с раком предстательной железы, $M \pm m$

Показатели, ед (референсная норма)	Контроль 1 (n=20)	Контроль 2 ДГПЖ (n=36)	РПЖ			
			Локализованные формы T _{1a-c} – T _{2a-c} M ₀ (n=16)	Местно-распространённые формы		Метастатический рак T ₃₋₄ M _{1a-c} (n=29)
				T _{3a-b} M ₀ (n=17)	T ₄ M ₀ (n=28)	
Лейкоциты, 10 ⁹ /л (4,0-8,0)	6,2±0,35	6,4±0,43	5,9±0,41	4,2±0,26 ^{1,2,3}	4,0±0,29 ^{1,2,3}	4,4±0,31 ^{1,2,3}
CD3 ⁺ лимфоциты, 10 ⁹ /л (1,02-1,41)	1,25±0,12	0,84±0,05 ¹	0,76±0,04 ¹	0,72±0,04 ¹	0,66±0,03 ^{1,2,3}	0,57±0,03 ^{1,2,3,4}
CD4 ⁺ лимфоциты, 10 ⁹ /л (0,67-0,92)	0,70±0,05	0,51±0,04 ¹	0,38±0,09 ^{1,2}	0,37±0,03	0,21±0,02 ^{1,2,3,4}	0,15±0,02 _{1,2,3,4,5}
CD8 ⁺ лимфоциты, 10 ⁹ /л (0,28-0,52)	0,34±0,05	0,20±0,02 ¹	0,29±0,02 ²	0,22±0,02 ¹	0,22±0,03 ¹	0,23±0,02 ¹
ИРИ, ед (1,5-2,6)	2,0±0,21	2,6±0,18 ¹	1,3±0,14 ^{1,2}	1,7±0,16 ²	0,95±0,07 ^{1,2,4}	0,65±0,04 ^{1,2,3,5}
CD19 ⁺ лимфоциты, 10 ⁹ /л (0,12-0,21)	0,21±0,01	0,18±0,008	0,16±0,008 ¹	0,11±0,009 ^{1,2}	0,09±0,008 ^{1,2,3}	0,08±0,007 ^{1,2,3}
CD56 ⁺ CD16 ⁺ лимфоциты, 10 ⁹ /л (0,19-0,21)	0,25±0,01	0,15±0,006 ¹	0,21±0,09	0,16±0,006 ^{1,3}	0,27±0,03 ^{2,4}	0,29±0,01 ^{2,3,4}
CD25 ⁺ лимфоциты, 10 ⁹ /л (0-1,5)	0,54±0,03	0,49±0,02	0,38±0,03 ^{1,2}	0,41±0,03 ¹	0,38±0,03 ^{1,2}	0,30±0,03 ^{1,2,3,4}
HLA-DR, 10 ⁹ /л (0,07-0,16)	0,09±0,005	0,06±0,0061	0,07±0,004	0,09±0,003 ²	0,13±0,002 ^{1,2,3}	0,18±0,002 _{1,2,3,4,5}
ФА, % (нейтрофилов) (40-90)	69,9±4,6	60,5±3,8	58,7±4,2	62,5±4,3	60,9±4,4	55,7±4,2 ^{1,4}
ФЧ, ед (4-9)	6,4±0,4	4,4±0,3 ¹	4,5±0,3 ¹	3,9±0,2 ¹	3,6±0,3 ^{1,3}	3,0±0,2 ^{1,2,3,4}
НСТ-тест (спонтанный), (40-50)	42,8±2,4	52,1±2,9 ¹	45,9±2,2	46,5±2,7	40,2±2,0 ²	35,8±1,8 ^{1,2,3,4}

Примечание: ¹⁾ – обозначена достоверность различий показателей по сравнению с группой контроля ($p < 0,05$);

²⁾ – обозначена достоверность различий показателей по сравнению с группой ДГПЖ ($p < 0,05$);

³⁾ – обозначена достоверность различий показателей по сравнению с группой локализованных форм РПЖ ($p < 0,05$);

⁴⁾ – обозначена достоверность различий показателей по сравнению с группой местно-распространенной формы T_{3a-b} M₀ РПЖ ($p < 0,05$);

⁵⁾ – обозначена достоверность различий показателей по сравнению с группой местно-распространенной формы T₄ M₀ РПЖ ($p < 0,05$).

У пациентов с локализованными формами РПЖ иммунологические показатели относительно значений, присущих больным ДГПЖ, изменялись более существенно (таблица 1 и 2). В частности, у этих больных число CD4⁺лимфоцитов снижалось на 25,5% ($p < 0,05$), CD8⁺лимфоцитов, наоборот, повышалось на 45,0% ($p < 0,05$), а CD25⁺лимфоцитов уменьшалось на 22,4% ($p < 0,05$). Активность фагоцитарного звена клеточного иммунитета не изменялась, а гуморального изменялась, но незначительно. В частности, уменьшались на 27,6% ($p < 0,05$)- только значения IgA и ИЛ-10 – на 22,6% ($p < 0,05$), а ИЛ-1β, наоборот, увеличивались на 41,4% ($p < 0,05$). С ростом злокачественности тканей РПЖ и, соответственно, тяжести состояния больных, усугублялись нарушения на уровне клеточного и гуморального иммунитета. В

наибольшей степени они были выражены у пациентов с метастатическим РПЖ ($T_{3-4}M_{1a-c}$).

По сравнению с показателями больных ДГПЖ количество лейкоцитов на этой стадии снижалось на 31,3% ($p<0,05$), в том числе $CD4^+$ лимфоцитов – на 70,6% ($p<0,01$), $CD19^+$ лимфоцитов – на 55,5% ($p<0,05$), а $CD25^+$ лимфоцитов – на 38,8% ($p<0,05$). При этом активность Т-лимфоцитов и число $CD56^+$ $CD16^+$ лимфоцитов увеличивалось в 3,0 раза ($p<0,01$) и на 93,3% ($p<0,05$).

Показатели гуморального иммунитета представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Показатели гуморального иммунитета в группах контроля и у пациентов с раком предстательной железы, $M \pm m$

Показатели, ед (референсная норма)	Контроль 1 (n=20)	Контроль 2 ДГПЖ (n=36)	РПЖ			
			Локализован ные формы $T_{1a-c} - T_{2a-c}M_0$ (n=16)	Местно- распространённые формы		Метастатич еский рак $T_{3-4} M_{1a-c}$ (n=29)
				$T_{3a-b}M_0$ (n=17)	T_4M_0 (n=28)	
ЦИК, оп.ед (0-60)	57,4±5,1	92,2±7,6 ¹	105,5±9,2 ¹	98,9±8,6 ¹	97,3±8,5 ¹	110,4±9,4 ¹
IgA, г/л (1,26-2,5)	1,8±0,15	2,21±0,19 ¹	1,6±0,11 ²	2,8±0,24 ^{1,2,3}	1,6±0,18 ^{2,4}	3,05±0,25 ^{1,2,3,5}
IgM, г/л (0,65-1,64)	1,3±0,08	1,5±0,10	1,1±0,08	1,2±0,07	1,2±0,07	1,2±0,07
IgG, г/л (7,4-15,8)	11,5±0,88	14,2±0,9 ¹	13,5±0,77	13,1±0,8	11,6±0,8	7,2±0,7 ^{1,2,3,4,5}
ИЛ-1β, пг/мл (0-78)	15,2±0,95	14,3±1,1	20,2±1,6 ^{1,2}	39,3±2,0 ^{1,2,3}	44,7±3,3 ^{1,2,3}	59,4±4,7 ^{1,2,3,4,5}
ИЛ-4, пг/мл (0-50)	9,9±0,7	3,3±0,2 ¹	3,5±0,22 ¹	4,2±0,3 ^{1,2}	7,6±0,6 ^{2,3,4}	10,5±0,9 ^{2,3,4,5}
ИЛ-6, пг/мл (0-70)	16,3±1,4	23,3±2,0 ¹	22,5±2,3 ¹	39,6±3,4 ^{1,2,3}	50,8±4,8 ^{1,2,3,4}	94,2±7,4 ^{1,2,3,4,5}
ИЛ-8, пг/мл (10-50)	18,9±0,8	32,7±2,2 ¹	35,4±2,0 ¹	37,7±3,0 ¹	59,9±4,7 ^{1,2,3,4}	66,3±5,0 ^{1,2,3,4}
ИЛ-10, пг/мл (10-18)	15,4±1,6	26,5±2,3 ¹	20,5±1,9 ^{1,2}	30,0±2,6 ^{1,3}	44,6±3,9 ^{1,2,3,4}	50,5±4,2
ФНО-α, пг/мл (10-32)	27,3±3,2	45,5±4,0 ¹	49,7±4,2 ¹	50,4±5,0	63,4±5,1 ^{1,2,3,4}	96,7±6,4 ^{1,2,3,4,5}

Примечание: см. таблицу 1.

Из показателей гуморального иммунитета возрастала на 38,0% ($p<0,05$) концентрация IgA, но величина цитокинов возрастала в разы: ИЛ-1β - в 4,0 ($p<0,01$), ИЛ-4 – в 3,2 ($p<0,05$), ИЛ-6 – в 4,0 ($p<0,01$), ИЛ-8 - в 2,0 ($p<0,05$), ИЛ10 – в 1,9 ($p<0,05$), а ФНО-α – в 2,1 ($p<0,05$) раза. При этом концентрация IgG у пациентов снижалась на 49,3% ($p<0,05$).

На основании полученных данных у пациентов с ДГПЖ и РПЖ можно уточнить механизм противоопухолевого иммунитета. В этом механизме стимулируемые опухолевой клеткой мутантные пептиды запускают каскад иммунных реакций. В реакции включаются нормальные киллеры (НК-клетки, $CD56^+$ $CD16^+$), цитотоксические Т-лимфоциты (HLA-DR клетки) и Т-хелперы ($CD4^+$ - клетки), а также макрофаги (у них НСТ-тест повышается). Все указанные иммуноциты способны активировать (В-клетки). Активированные В-лимфоциты ($CD25^+$) через плазмоцитарные клетки продуцируют специфические иммуноглобулины (\uparrow IgA, IgG), а НК-клетки выделяют перфорины. Иммуноглобулины и перфорины обладают способностью уничтожать опухолевые клетки в предстательной железе.

При РПЖ механизм противоопухолевого иммунитета нарушается за счет формирования противоопухолевой иммунологической толерантности. На рисунке 1 показаны функциональные элементы этого механизма. Нарушение опухолевой экспрессии мутантных пептидов приводит к угнетению синтеза и

функции цитотоксических Т-лимфоцитов, в том числе Т-хелперов ($CD4^+$), НК-клеток ($CD56^+ CD16^+$) и фагоцитов (\downarrow ФА, \downarrow ФЧ, \downarrow НСТ-тест), происходит прямое или опосредованное упомянутыми иммуноцитами подавление активности В-лимфоцитов ($CD25^+$). Снижение активности клеточных и гуморальных факторов иммунной защиты и приводит к противоопухолевой иммунологической толерантности и прогрессии опухолевого роста у больных РПЖ.

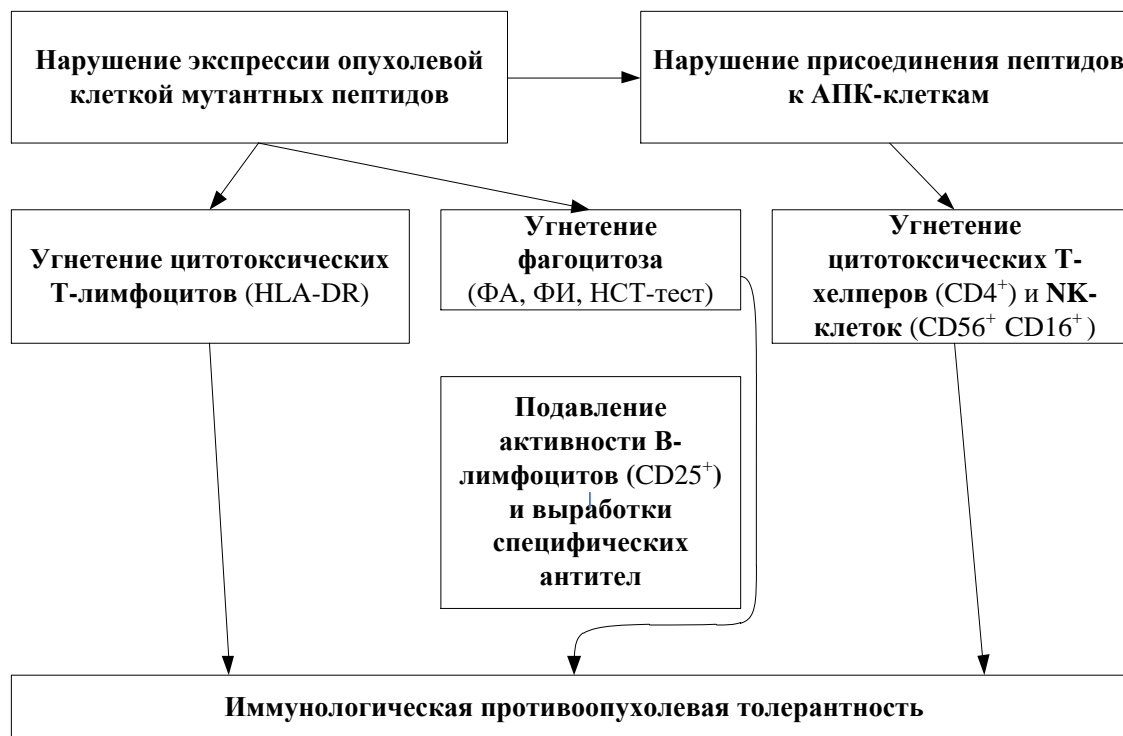


Рисунок 1 – Механизм развития противоопухолевой иммунологической толерантности у пациентов с раком предстательной железы

Более детального изучения в генезе опухолевых заболеваний предстательной железы заслуживают цитокины. Ими, как известно, являются биологически активные вещества пептидной природы, которые образуются иммунными и эндотелиальными клетками (Варюшина Е.А., 2012; Фришень Я.Б., 2017). Они участвуют в регуляции процессов иммунного ответа, гемопоэза, ангиогенеза и хемотаксиса лейкоцитов (Мельников В.Л. и соавт., 2015), а биологическое действие цитокинов на клетки реализуется через взаимодействие со специфическими рецепторами клеточных мембран (Камышников В.С., 2020). Спектры действия известных на сегодняшний день цитокинов в различной степени обладают комплиментарностью и взаимозаменяемостью, во многих случаях имеет место синергизм (Орадова А.Ш. и соавт., 2017).

Проведенные исследования показали, что у больных с РПЖ по мере роста степени злокачественности опухолевого процесса наблюдается только количественный рост концентраций изученных цитокинов. Антагонистических взаимодействий между про- и противовоспалительными цитокинами у больных ДГПЖ и РПЖ не выявлено.

На рисунке 2 представлена роль цитокинов в противоопухолевой защите у больных с опухолевыми заболеваниями предстательной железы.



Рисунок 2 – Роль цитокинов в противоопухолевой защите у больных с раком предстательной железы

Как видно из рисунка 2 на клетки опухоли влияют ИЛ-4 и ФНО-α и усиливают цитотоксичность, что подтверждается данными современной литературы. Они подавляют размножение опухолевых клеток, усиливают апоптоз, цитолиз, тормозят ангиогенез и способствуют образованию антигенов гистосовместимости II класса на поверхности клеточных мембран опухолевых клеток для усиления иммунного ответа (Лубенников А.Е. и соавт., 2008; Хайдуков С.В. и соавт., 2009). В активации противоопухолевого иммунитета участвуют ИЛ-1β, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10 и ФНО-α. Указанные цитокины активируют Т-лимфоциты, НК-клетки, производство и дифференцировку В-лимфоцитов, продукцию антител и оказывают гемостимулирующее действие (Попов С.В. и соавт., 2018; Davidsson S. et al., 2013).

На рисунке 3 представлен механизм угнетения противоопухолевого иммунитета и стимуляция опухолевой пролиферации у больных с опухолевыми заболеваниями предстательной железы. Как видно из рисунка 3, опухолевую пролиферацию стимулируют ИЛ-6 и ИЛ-1, а угнетают противоопухолевый иммунитет ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-10 и ФНО-α. Стимуляция опухолевой пролиферации проявляется в усилении экспрессии рецепторов к ИЛ-6 на опухолевых клетках, в нарушении образования на их поверхности антигенов гистосовместимости II класса (Телетаева Г.М., 2007). Угнетение противоопухолевого иммунитета проявляется в подавлении эритро-, миело- и лимфопоэза, активности Т-лимфоцитов, макрофагов и моноцитов, в

стимуляции апоптоза нейтрофилов с высокой цитотоксической активностью (Торопова Н.Е. и соавт., 2007; Goldring S.R. et al., 2020).

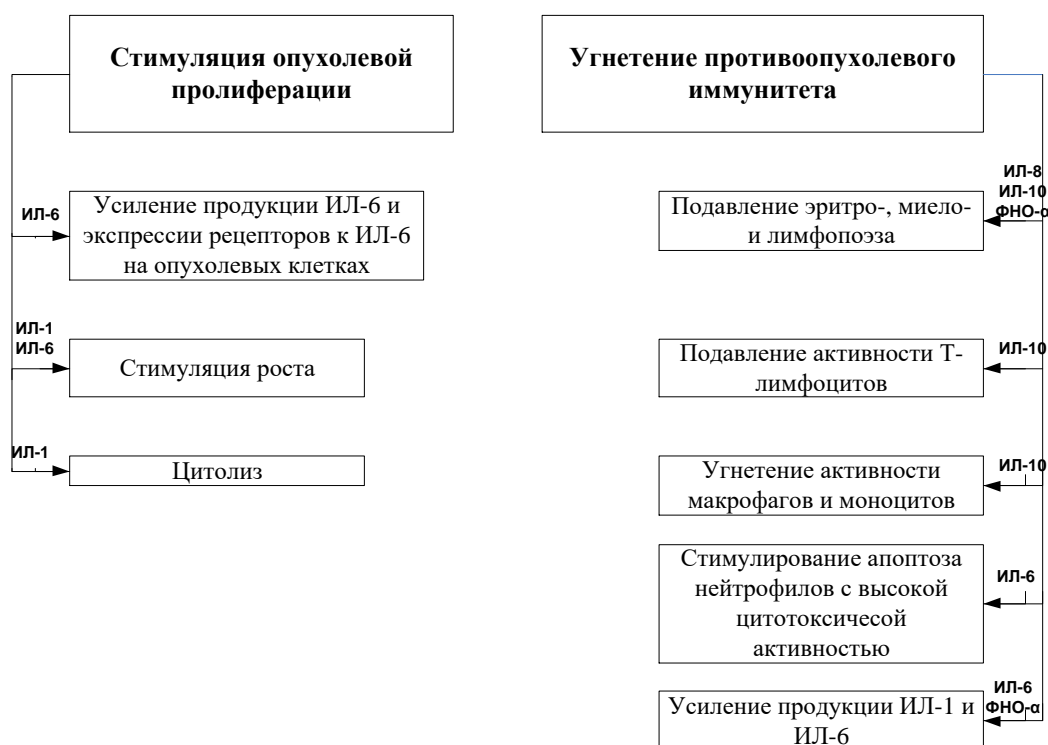


Рисунок 3 – Роль цитокинов в угнетении противоопухолевого иммунитета и стимуляции опухолевой пролиферации у больных с раком предстательной железы

Рост злокачественности опухоли приводит также к увеличению в сыворотке крови концентрации общего ПСА и уменьшению отношения свободной и общей его фракций. Так, среднее значение величины общего ПСА у больных ДГПЖ составило $4,26 \pm 2,5$, а у больных метастатическим РПЖ – $20,5 \pm 7,1$ нг/мл. У больных РПЖ отмечено практически двукратное уменьшение отношения свободной и общей фракций ПСА ($p < 0,001$) в сравнении с ДГПЖ. Концентрация тестостерона в сыворотке крови снижалась. Максимальный уровень снижения тестостерона отмечался при местно-распространенных формах РПЖ.

Приведена патогенетическая оценка связи иммунофенотипа лимфоцитов периферической крови больных ДГПЖ и РПЖ с уровнем андрогенов, ПСА, гистологической картиной опухолевой ткани, показателями ТРУЗИ. Все выявленные нарушения иммунной системы, гистологической картины ткани предстательной железы, уровня в крови тестостерона и ПСА отражали степень злокачественности опухолевого процесса предстательной железы и тяжесть состояния больных. В связи с этим на следующем этапе исследования нами предпринята попытка разработки методов прогноза типа и тяжести опухолевого процесса предстательной железы.

При разработке этих методов прогнозирования исследованы 20 показателей, определяемых в ходе стандартного обследования. Референтный

анализ с помощью статистических программ «Statistica 10» позволил выявить и отобрать пять наиболее информативных признаков. Такими параметрами явились следующие: концентрация общего ПСА и коэффициент его отношения к количеству свободного, уровень общего тестостерона, объем предстательной железы, степень дифференцировки опухолевой ткани по шкале Глисона.

При разработке метода прогнозирования типа опухолевых заболеваний предстательной железы и их тяжести был использован корреляционно-регрессионный анализ. В этом анализе за объект прогноза приняты следующие числовые обозначения параметра «Y»:

1 – человек здоров и у него нет опухолевого процесса в предстательной железе;

2 – имеется ДГПЖ;

3 – имеется локализованная форма РПЖ ($T_{1a-c}-T_{2a-c}M_0$);

4 – есть местно-распространенная форма РПЖ ($T_{3a-b}M_0$);

5 – есть местно-распространенная форма РПЖ (T_4M_0);

6 – есть метастатический РПЖ ($T_{3-4}M_{1a-c}$).

В последующем значения параметра «Y» будут являться прогностическими критериями типа и степени опухолевого процесса, которые позволят осуществлять выбор индивидуальной схемы лечения для пациентов с РПЖ.

При построении регрессионного уравнения учтены следующие показатели: общая концентрация ПСА в сыворотке крови (в нг/мл); коэффициент ПСА_{своб.}/ПСА_{общ.}; концентрация общего тестостерона в сыворотке крови (в нг/мл); объем предстательной железы (в см³); степень дифференцировки опухолевой ткани ($G_0=0$; $G_1=2-6$; $G_2=7$; $G_3=8$; $G_4=9-10$ – соответствие баллам по шкале Глисона), показавшие наибольшую корреляционную связь с искомым параметром «Y». В результате корреляционно-регрессионного анализа получено следующее прогностическое уравнение:

$$Y = 0,05 * Z_1 - 7,75 * Z_2 - 0,02 * Z_3 + 0,005 * Z_4 + 0,61 * Z_5 + 2,59 \quad (R=0,79) \quad (1),$$

где: Y – значения объекта прогноза (от 1 до 6);

Z_1 – концентрация в сыворотке крови ПСА_{общ.} (нг/мл);

Z_2 – коэффициент ПСА_{своб.}/ПСА_{общ.};

Z_3 – концентрация в сыворотке крови общего тестостерона (нг/мл);

Z_4 – объем предстательной железы (см³);

Z_5 – степень дифференцировки опухоли предстательной железы по шкале Глисона (за «1» – принята величина G_0 ; за «2» – G_1 ; за «3» – G_2 ; за «4» – G_3 ; за «5» – G_4).

Для прогнозирования результата необходимо в формулу 1 подставить соответствующие значения Z_1 – Z_5 и произвести расчет. В том случае, если какой-то параметр не определяли необходимо значения Z_i принять равными «0» (это касается случаев, когда не проводят биопсию предстательной железы и нет данных гистологического исследования).

Для проверки точности предложенного метода прогнозирования типа и

тяжести заболевания проведен анализ 20 историй болезни больных РПЖ (Т₁-Т₄). У больных производился расчет значений прогноза по параметрам лабораторных и инструментальных методов, имеющих отношение к прогностическому уравнению 1. Результаты исследования показали, что в 90% случаев (18 человек) реальный диагноз совпал с прогнозируемым. Такая точность достаточна для применения разработанного метода на практике.

На втором этапе при разработке метода прогнозирования метастазирования и степени дифференцировки опухолевой ткани на основании Лабораторно-инструментальных показателей у пациентов исследование было продолжено. В начале был разработан метод прогнозирования возникновения метастазов на основании балльной оценки их значимости у больных с РПЖ. Потом – метод прогноза степени дифференцировки опухоли РПЖ.

Выделены 15 признаков, в той или иной степени влияющих на конечный прогнозируемый результат (в соответствии с вычисляемой по методу Вальда (Гублер Е.В., 1978, Шамраев С.Н. и соавт., 2019) величиной ДП_i). Таким результатом был факт возникновения (или исключения) наличия метастазов у больных с опухолью предстательной железы (величина ДП_i различалась по знаку «+» или «-»). В состав выявленных признаков вошли:

1. Объем предстательной железы в см³;
2. Концентрация в крoи ПСА_{общ.} в нг/мл;
3. Концентрация в крoви ПСА_{своб.} в нг/мл;
4. Степень дифференцировки опухоли в баллах по шкале Глисона (за «1» – принята величина G₀; за «2» – G₁; за «3» – G₂; за «4» – G₃; за «5» – G₄);
5. Общее количество лимфоцитов с маркером CD3⁺ (Т – лимфоцитов) в 10⁹/л;
6. Величина иммунорегуляторного индекса (ИРИ) в условных единицах;
7. Количество лимфоцитов с маркером CD19⁺ (В – лимфоцитов) в 10⁹/л;
8. Количество лимфоцитов с маркером CD3⁺ HLA-DR (Т – активных лимфоцитов) в 10⁹/л;
9. Концентрация циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в ед.;
10. Концентрация ИЛ-1β в пг/мл;
11. Концентрация ИЛ-4 в пг/мл;
12. Концентрация ИЛ-6 в пг/мл;
13. Концентрация ИЛ-8 в пг/мл;
14. Концентрация ИЛ-10 в пг/мл;
15. Концентрация ФНО α- в пг/мл.

На практике для прогнозирования факта метастазирования РПЖ необходимо сравнить значения показателей больного с табличными величинами и определить по этой таблице значимость оцениваемого признака в баллах (ДП_i). Затем надо все полученные показатели просуммировать. Желательно, чтобы при расчете были учтены как можно больше ДП_i (в идеале – все). Если величина суммы всех ДП_i будет больше/равно 20, то, согласно метода Вальда, делается заключение, что у данного пациента с вероятностью 95% может иметь место метастазирование РПЖ. Если величина этой суммы будет ≤ – 20, то у данного пациента с вероятностью 95% такое

метастазирование исключается.

При разработке прогноза степени дифференцировки опухолевой ткани за объект прогноза (Y) была принята величина степени гистологической дифференцировки по шкале Глисона. Выполнен корреляционно-регрессионный анализ и получены два регрессионных уравнения (2–3). В этих уравнениях аргументами являлись значения иммунологических показателей.

$$Y = 6,94 - 2,33 \cdot X_1 - 0,32 \cdot X_2 - 12,9 \cdot X_3 \quad (R=0,72) \quad (2)$$

$$Y = 2,29 - 1,17 \cdot X_1 - 0,16 \cdot X_2 - 6,45 \cdot X_3 + 0,04 \cdot X_4 + 0,54 \cdot X_5 + 0,009 \cdot X_6 + 0,03 \cdot X_7, \quad (R=0,96) \quad (3),$$

где: Y – величина степени гистологической дифференцировки опухоли G₀-G₄ (за «1» обозначена величина G₀, за «2» – G₁, за «3» – G₂, за «4» – G₃, за «5» – G₄);

X₁ – общее количество в крови Т-лимфоцитов (без коэффициента «10⁹»);

X₂ – значения ИРИ, ед.;

X₃ – общее количество в крови В-лимфоцитов (без коэффициента «10⁹»);

X₄ – концентрация в крови ИЛ-1β, пг/мл;

X₅ – концентрация в крови ИЛ-4, пг/мл;

X₆ – концентрация в крови ИЛ-6, пг/мл;

X₇ – концентрация в крови ИЛ-8, пг/мл.

Как видно из величин коэффициентов множественной корреляции, уравнение 2 – более простое, но менее точное, а уравнение 3 – более сложное, но и точнее.

Проверка предложенного метода прогнозирования степени гистологической дифференцировки опухолевой ткани по уравнению 3 у больных РПЖ на независимой выборке историй болезни двадцати мужчин показала 95%-ю точность метода.

ВЫВОДЫ

В диссертационной работе решена актуальная научная проблема – установлена роль иммунологических нарушений в патогенезе опухолевых заболеваний предстательной железы и использованы наиболее информативные показатели, характеризующие эти нарушения, для прогнозирования типа и тяжести РПЖ.

1. При ДППЖ количество Т-лимфоцитов относительно нормы снижается на 32,8% (p<0,05), CD4⁺лимфоцитов – 27,1% (p<0,05), CD8⁺лимфоцитов – на 41,1% (p<0,05), CD56⁺CD16⁺лимфоцитов – на 40,0% (p<0,05). Активность Т- и В-лимфоцитов у этих больных не изменяется. Из показателей фагоцитоза на 31,3% (p<0,05) уменьшается только величина ФЧ. Концентрация IgA у этих больных увеличивается на 22,8% (p<0,05), а IgG – на 23,5% (p<0,05). Умеренно повышается на 42,9% (p<0,05) уровень ИЛ-6, на 73,0% (p<0,05) – ИЛ-8, на 72,0% (p<0,01) ИЛ-10 и на 66,7% (p<0,05) - ФНО-α.
2. У пациентов с локализованными формами РПЖ иммунологические показатели относительно значений, присущих больным ДППЖ, изменяются более существенно. В частности, у этих больных число CD4⁺лимфоцитов

снижается на 25,5% ($p < 0,05$), CD8⁺лимфоцитов, наоборот, повышается на 45,0% ($p < 0,05$), а CD25⁺лимфоцитов уменьшается на 22,4% ($p < 0,05$). Активность фагоцитарного звена клеточного иммунитета не изменяется, а гуморального изменяется незначительно. В частности, уменьшаются на 27,6% ($p < 0,05$) только значения IgA и на 22,6% ($p < 0,05$) ИЛ-10, а ИЛ-1 β , наоборот, увеличиваются на 41,4% ($p < 0,05$).

3. С ростом степени злокачественности тканей при РПЖ и, соответственно, тяжести состояния больных, усугубляются нарушения на уровне клеточного и гуморального иммунитета. В наибольшей степени они выражены у пациентов с метастатическим РПЖ (T₃₋₄M_{1a-c}). По сравнению с показателями больных ДГПЖ количество лейкоцитов у пациентов с метастатическим РПЖ снижается на 31,3% ($p < 0,05$), в том числе CD4⁺лимфоцитов – на 70,6% ($p < 0,01$), CD19⁺лимфоцитов – на 55,5% ($p < 0,05$), а CD25⁺лимфоцитов – на 38,8% ($p < 0,05$). При этом активность Т-лимфоцитов и число CD56⁺CD16⁺лимфоцитов увеличивается в 3,0 раза ($p < 0,01$) и на 93,3% ($p < 0,05$). Из показателей гуморального иммунитета возрастает на 38,0% ($p < 0,05$) концентрация IgA, но величина цитокинов увеличивается больше: ИЛ-1 β - в 4,0 ($p < 0,01$), ИЛ-4 – в 3,2 ($p < 0,05$), ИЛ-6 – в 4,0 ($p < 0,01$), ИЛ-8 - в 2,0 ($p < 0,05$), ИЛ-10 – в 1,9 ($p < 0,05$), а ФНО- α – в 2,1 ($p < 0,05$) раза. При этом концентрация IgG у пациентов снижается на 49,3% ($p < 0,05$).
4. Уточнены механизмы нарушений иммунитета у пациентов с ДГПЖ, а также противоопухолевого иммунитета и противоопухолевой иммунологической толерантности у пациентов с РПЖ. Установлена роль ИЛ-1 β , ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ10 и ФНО- α в механизмах противоопухолевой защиты и стимуляции опухолевой пролиферации.
5. Наличие различий в иммунологических показателях, а также в показателях, отражающих структуру и функцию предстательной железы, у больных с объемными заболеваниями простаты дает основание для последующей разработки методов прогнозирования тяжести опухолевого процесса, степени дифференцировки опухолевой ткани и ее способности к метастазированию.
6. Метод прогнозирования типа гистологических изменений предстательной железы (ДГПЖ, РПЖ) и их тяжести (в том числе при РПЖ значений T_{1a-c}-T_{2a-c}M₀, T_{3a-b} M₀, T₄M₀, T₄M_{1a-c}) основан на комплексном учете пяти признаков. Среди них: общая концентрация в сыворотке крови ПСА, коэффициент ПСА_{своб.}/ПСА_{общ.}, концентрация в сыворотке крови общего тестостерона, объем предстательной железы и степень дифференцировки клеток опухолевой ткани по Глиссону. Метод реализуется путем внесения значений указанных признаков в уравнение и выполнения расчетов. В результате вычислений получают числовой показатель, величина которого позволяет предположить отсутствие или наличие злокачественности при увеличении предстательной железы у обследуемого пациента.
7. Метод прогнозирования способности РПЖ к метастазированию основан на использовании балльной оценки информативности ряда лабораторно-инструментальных показателей. Среди них объем предстательной железы, концентрация в крови ПСА_{общ.} и ПСА_{своб.}, степень дифференцировки

опухолевогой ткани по Глисону, общее количество лимфоцитов с маркером CD3⁺, величина ИРИ, число лимфоцитов с маркером CD19⁺ и CD3⁺ HLA-DR, концентрация ЦИК и цитокинов - ИЛ-1 β , ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10 и ФНО α . Прогнозирование осуществляется путем суммирования баллов диагностических показателей. При величине суммы этих показателей больше/ равно «+ 20» или меньше/равно «- 20» делается заключение о вероятности метастазирования или его исключения.

8. Метод прогнозирования степени дифференцировки клеток опухолевой ткани предстательной железы базируется на решении уравнения, полученного с помощью корреляционно-регрессионного анализа. В этом методе за объект прогноза принята величина степени гистологической дифференцировки опухолевой ткани G₀-G₄, а в качестве аргументов уравнения – наиболее информативные показатели клеточного и гуморального иммунитета. Среди них общее количество лимфоцитов с маркером CD3⁺ и CD19⁺, величина ИРИ, а также концентрация - ИЛ-1 β , ИЛ-4, ИЛ-6 и ИЛ-8.
9. Точность прогнозирования, установленная на независимой выборке историй болезни двадцати мужчин, по всем методам составляет 90 - 95%. Такая точность позволяет рекомендовать использование предложенных методов в клинической практике для оценки тяжести состояния больных с опухолевыми заболеваниями предстательной железы и выбора методов их оптимального лечения.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Диагностика опухолевых заболеваний предстательной железы должна быть комплексной и включать в себя не только клиническое и лабораторно-инструментальное (в том числе УЗИ, рентгенологическое, гистологическое и биохимическое с определением ПСА) исследование, но и иммунологическое (количественные и качественные показатели клеточного и гуморального звена иммунитета).

2. Прогнозирование типа объемного образования и тяжести течения РПЖ возможно при комплексном учёте пяти признаков, отражающих ее структурно-функциональное состояние. Среди них – общая концентрация в сыворотке крови ПСА, коэффициент ПСА_{своб.}/ПСА_{общ.}, концентрация в сыворотке крови тестостерона, объем предстательной железы и степень дифференцировки клеток опухолевой ткани по шкале Глисона.

3. Прогнозирование способности опухоли предстательной железы к метастазированию возможно при учёте суммарной балльной оценки упомянутых выше показателей и данных иммунологического статуса пациента. Из показателей иммунологического статуса учитываются: число лимфоцитов с маркером CD3⁺, величина иммуно-регуляторного индекса, количество лимфоцитов с маркером CD19⁺, CD3⁺ HLA-DR, концентрация циркулирующих иммунных комплексов и цитокинов (ИЛ1 β , ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10 и ФНО- α).

4. Прогнозирование степени дифференцировки РПЖ возможно при учёте числа лимфоцитов с маркером CD3⁺ и CD19⁺, величины ИРИ, а также

концентрации ИЛ1 β , ИЛ-4, ИЛ-6 и ИЛ-8.

5. Все указанные возможности прогнозирования целесообразно реализовать в клинической практике с помощью предложенных нами методов прогнозирования типа заболевания, тяжести течения заболевания и способности РПЖ к метастазированию, прогнозирования степени дифференцировки опухолевой ткани.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК:

1. Малинин Ю.Ю. Прогнозирование типа и тяжести опухолевых заболеваний предстательной железы на основании иммунологических показателей // Ю.Ю. Малинин, **А.А. Кривобок**, С.Е. Золотухин // Вестник неотложной и восстановительной хирургии. – 2022. – Т. 7. – №3. – С. 22 – 29.
2. Малинин Ю.Ю. Прогнозирование риска метастазирования рака предстательной железы и степени дифференцировки опухоли у пациентов / Ю.Ю. Малинин, **А.А. Кривобок**, С.Е. Золотухин // Вестник неотложной и восстановительной хирургии. – 2022. – Т. 7. – №3. – С. 37 – 44.
3. Малинин Ю.Ю. Изменение показателей клеточного и гуморального иммунитета и прогнозирования на их основе типа и тяжести опухолевых заболеваний предстательной железы/ Ю.Ю. Малинин, **А.А. Кривобок**, С.Е. Золотухин и др. // Морфологический альманах им. В.Г. Ковешникова. – 2022. – Т. 20. – №3. – С. 28 – 36.
4. Малинин Ю.Ю. Значение иммунологических нарушений в патогенезе и диагностике опухолевых заболеваний предстательной железы / Ю.Ю. Малинин, **А.А. Кривобок**, С.Е. Золотухин и др. // Травматология, ортопедия и военная медицина. – 2022. – №3. – С.19 – 29.
5. Малинин Ю.Ю. Метод прогнозирования степени дифференцировки опухолевой ткани и метастазирования на основании клиничко-лабораторных показателей у пациентов с раком предстательной железы / Ю.Ю. Малинин, **А.А. Кривобок**, Н.Н. Шпаченко, Т.М. Чирах // Травматология, ортопедия и военная медицина. – 2022. – №2. – С. 30 – 36.
6. Кривобок А.А. Значение иммунного статуса при диагностике, лечении и прогнозировании течения опухолей предстательной железы / **А.А. Кривобок**, С.Е. Золотухин, Ю.Ю. Малинин // Университетская клиника – 2022. – №1. – С.53 – 57.
7. Малинин Ю.Ю. Прогностическая оценка тяжести опухолевых заболеваний предстательной железы / Ю.Ю. Малинин, **А.А. Кривобок**, С.Е. Золотухин // Травматология, ортопедия и военная медицина. – 2021. – №4. – С. 33 – 38.

Материалы съездов и конференций:

8. Кривобок, А.А. Влияние иммунного статуса пациента на прогнозирование течения рака предстательной железы. Материалы Международного медицинского форума Донбасса «Наука побеждать... болезнь» 11-12 ноября 2021 года/ А.А. Кривобок, Т.М. Мурадов.//Университетская клиника,

- приложение 2. – 2021. – С.263.
9. Кривобок, А.А. Методы прогнозирования развития рака предстательной железы. Материалы Международного медицинского форума Донбасса «Наука побеждать... болезнь» 11-12 ноября 2021 года/ А.А. Кривобок, В.А. Середич//Университетская клиника, приложение 2. – 2021. – С.264.
 10. Кривобок, А.А. Иммуноterapia при опухолях предстательной железы. Материалы Международного медицинского форума Донбасса «Наука побеждать... болезнь» 11-12 ноября 2021 года/ А.А. Кривобок, С.Ю. Фролова//Университетская клиника, приложение 2. – 2021. – С.265.
 11. Кривобок, А.А. Изучение тактики выбора лечения пациентов с аденомой предстательной железы и хроническим простатитом. / А.А. Кривобок, Т.М. Мурадов, Д.Г. Кравец // VIII Международный молодежный научный медицинский форум «Белые цветы», посвященный 120-летию Студенческого научного общества имени Ирины Андреевны Студенцовой: Сборник статей по итогам конференции. Казань, 14 – 16 апреля 2021 г. – Казань, 2021. — С.1172–1173.
 12. Кривобок А.А. Роль чувствительности рецепторов андрогенов в лечении местнораспространённого рака предстательной железы./ А.А. Кривобок, В.С. Егоров // Материалы 80-го Медицинского Конгресса «Актуальные проблемы теоретической и клинической медицины» г. Донецк, 2018 г. – Донецк, 2018. – С.386.

АННОТАЦИЯ

Кривобок А. А. Патогенез иммунологических нарушений и прогноз течения опухолевых заболеваний предстательной железы. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.03 – патологическая физиология, 14.01.23 – урология. Государственная образовательная организация высшего профессионального образования «Донецкий национальный медицинский университет имени М. Горького» Министерства здравоохранения Донецкой Народной Республики, Донецк, 2022. Диссертация посвящена решению актуальной научной задачи – установления роли иммунологических нарушений в патогенезе опухолевых заболеваний предстательной железы и использования наиболее информативных показателей, характеризующих эти нарушения, для прогнозирования типа и тяжести рака предстательной железы (РПЖ).

Материалом для настоящего исследования явились клинимо-морфологические данные 90 человек. Из них 16 пациентов в стадии $T_{1a-c} - T_{2a-c}M_0$, 17 – в стадии $T_{3a-b}M_0$, 28 – в стадии T_4M_0 и 29 – метастатический рак ($T_{3-4}M_{1a-c}$). Для больных РПЖ в стадии $T_{1a-c} - T_{2a-c}M_0$, – $63,7 \pm 5,7$, $T_{3a-b}M_0$ – $64,5 \pm 6,3$, T_4M_0 – $63,9 \pm 5,8$, $T_{3-4}M_{1a-c}$ – $65,6 \pm 6,0$ лет.

Для сравнения лабораторно-инструментальных показателей создана первая контрольная группа из практически здоровых мужчин ($n = 20$) и вторая контрольная группа пациентов с доброкачественной гиперплазией предстательной железы (ДГПЖ) ($n = 36$). Средний возраст людей первой

контрольной группы составил $54,4 \pm 5,6$ лет, а второй - $58,8 \pm 4,9$ лет.

Все исследования у пациентов были выполнены при поступлении в клинику и в последующие 1-2 дня пребывания в стационаре. Они включали в себя данные анамнеза, догоспитального обследования, лабораторно-инструментальных обследований в условиях стационара.

В качестве основных методов исследования предстательной железы применяли: пальцевое ректальное, трансабдоминальное и трансректальное ультразвуковое исследование с использованием аппаратов «Aloka» SSD-2000 (Япония) и «Siemens» SL-450 (Германия). С помощью транс ректального ультразвукового исследования определяли объем предстательной железы. У больных РПЖ гистологическое исследование осуществляли путем парафиновой проводки биоптатов с дальнейшей окраской срезов гематоксилин-эозином и их визуализацию при помощи оптической системы Optiphot-II фирмы Niko (Япония). Из биохимических методов в сыворотке крови определяли уровень общего и свободного простат-специфического антигена ПСА и общую концентрацию тестостерона. Подсчет основных субпопуляций лимфоцитов произведен на лазерном проточном цитофлуориметре «Beckman Coulter EPIX CSXL» с помощью меченых антител «Immunotec» (Франция) с выявлением поверхностных маркеров лимфоцитов CD3⁺, CD4⁺(хелперы), CD8⁺ (цитотоксические Т-лимфоциты), CD19⁺ (В-лимфоциты), CD56⁺, CD16⁺ (естественные киллеры), CD3⁺-HLA-DR, (Т-активные лимфоциты), CD25⁺ (В-активные лимфоциты). Концентрацию иммунных клеток определяли в мкл.

Для изучения неспецифической иммунологической защиты организма применяли методику оценки фагоцитарного звена иммунной системы. Концентрацию сывороточных иммуноглобулинов IgA, IgM, IgG, IgE определяли методом иммунопреципитации в агаровом геле. Концентрацию цитокинов в сыворотке крови пациентов и группы контроля определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих наборов ЗАО «Вектор Бест» в диапазоне концентраций: для ИЛ-1 β , ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- α – 5-250 пг/мл; ИЛ-6 – 5,6-300 пг/мл; ИЛ-10 – 0-500 пг/мл.

В работе уточнены механизмы нарушений иммунитета у пациентов с ДГПЖ и противоопухолевой иммунологической толерантности у пациентов с РПЖ. Установлена роль ИЛ-1 β , ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ10 и ФНО- α в механизмах противоопухолевой защиты и стимуляции опухолевой пролиферации у больных с опухолевыми заболеваниями предстательной железы. Выявлены особенности иммунологической реактивности у больных с опухолевыми заболеваниями предстательной железы для разработки метода прогнозирования типа и тяжести опухолевого процесса.

Приведена патогенетическая оценка связи иммунофенотипа лимфоцитов периферической крови больных ДГПЖ и РПЖ с уровнем андрогенов, ПСА, гистологической картиной опухолевой ткани предстательной железы, показателями трансректального ультразвукового исследования.

Выявлены наиболее информативные показатели, отражающие нарушения в иммунной и гормональной системе, в гистологической структуре ткани

предстательной железы, характерные для разной степени злокачественности опухолевой ткани и тяжести состояния больных.

Разработаны метод прогнозирования типа и тяжести опухолевого процесса предстательной железы на основе комплексного учета лабораторных и инструментальных данных, методы прогнозирования метастазирования и степени дифференцировки опухолевой ткани на основании лабораторно-инструментальных показателей у пациентов.

Ключевые слова: доброкачественная гиперплазия предстательной железы, рак предстательной железы, иммунологические нарушения, методы прогнозирования.

ANNOTATION

Krivobok A. A. Pathogenesis of immunological disorders and prognosis of the course of tumor diseases of the prostate. – The Manuscript.

Dissertation for the degree of candidate of medical sciences on the specialty 14.03.03 – pathological physiology, 14.01.23 – urology. State educational institution of higher professional education «M. Gorky Donetsk National Medical University», the Ministry of Health care of Donetsk People's Republic, Donetsk, 2022.

The dissertation is devoted to solving an urgent scientific problem - establishing the role of immunological disorders in the pathogenesis of tumor diseases of the prostate gland and using the most informative indicators characterizing these disorders to predict the type and severity of prostate cancer (PCa).

The material for this study was the clinical and morphological data of 90 people. Among them 16 patients had $T_{1a-c} - T_{2a-c}M_0$ stage, 17 patients had $T_{3a-b}M_0$ stage, 28 patients had T_4M_0 stage, and 29 patients had metastatic cancer ($T_{3-4}M_{1a-c}$). For patients with BPH in $T_{1a-c} - T_{2a-c}M_0$ stage, 63.7 ± 5.7 , $T_{3a-b}M_0 - 64.5 \pm 6.3$, $T_4M_0 - 63.9 \pm 5.8$, $T_{3-4}M_{1a-c} - 65.6 \pm 6.0$ years.

To compare laboratory and instrumental parameters, the first control group of practically healthy men ($n = 20$) and the second control group of patients with benign prostatic hyperplasia (BPH) ($n = 36$) were created. The average age of people in the first control group was 54.4 ± 5.6 years, and the second - 58.8 ± 4.9 years.

All investigations in patients were performed on admission to the clinic and during the following 1-2 days of stay in the hospital. They included data of anamnesis, pre-hospital examination, laboratory-instrumental examination under hospital conditions.

As the main methods of prostate examination we used finger rectal, transabdominal and transrectal ultrasound, using "Aloka" SSD-2000 (Japan) and "Siemens" SL-450 (Germany) devices. The volume of the prostate gland was determined by transrectal ultrasound examination. In patients with BPH histological examination was carried out by paraffin-embedded biopsy specimens with further staining of sections with hematoxylin-eosin and their visualization by means of Optiphot-II optical system made by Niko (Japan). Among biochemical methods we determined the level of total and free prostate-specific antigen PSA and the total concentration of testosterone in blood serum. The main lymphocyte subpopulations

were counted on a Beckman Coulter EPIC CSXL laser flow cytofluorimeter using labeled antibodies from Immunotec (France), with detection of CD3⁺ lymphocyte surface markers, CD4⁺ (helper), CD8⁺ (cytotoxic T-lymphocytes), CD19⁺ (B-lymphocytes), CD56⁺, CD16⁺ (natural killer), CD3⁺-HLA-DR, (T-active lymphocytes), CD25⁺ (B-active lymphocytes). The concentration of immune cells was determined in μl .

To study nonspecific immunological protection of the organism we used a technique to evaluate phagocytic component of the immune system. Concentration of serum immunoglobulins IgA, IgM, IgG, IgE was determined by immunoprecipitation in agar gel. The concentration of cytokines in the serum of patients and controls was determined by enzyme immunoassay (ELISA) using commercial kits from Vector Best in the following concentration ranges: for IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, TNF- α - 5–250 pg/ml; IL-6 - 5.6–300 pg/ml; IL-10 - 0—500 pg/ml.

The paper clarified the mechanisms of immune disorders in patients with BPH and antitumor immunological tolerance in patients with prostate cancer. The role of IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- α in the mechanisms of antitumor protection and stimulation of tumor proliferation in patients with prostate tumor diseases was established. We have revealed the peculiarities of immunological reactivity in patients with tumor diseases of the prostate in order to develop a method of prognostication of the type and severity of the tumor process.

Pathogenetic evaluation of the relation of immunophenotype of the peripheral blood lymphocytes of BPH and BPH patients with the level of androgens, PSA, histological picture of the prostate tumor tissue and the indices of transrectal ultrasound investigation has been carried out.

The most informative indexes, which reflect the disturbances in the immune and hormonal system, in the histological structure of the prostate tissue, characteristic for different degrees of malignancy of the tumor tissue and severity of the patients' state were revealed.

We have developed a method of prognostication of the type and severity of the prostate tumor process on the basis of the complex accounting of the laboratory and instrumental data; methods of predicting the metastasis and the degree of differentiation of the tumor tissue on the basis of the laboratory and instrumental indices in patients.

Key words: benign prostatic hyperplasia, prostate cancer, immunological disorders, methods of prognosis.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ДГПЖ	– доброкачественная гипертрофия предстательной железы	CD	– маркер лимфоцитов
ДП	– диагностические показатели	CD3 ⁺	– Т-лимфоциты.
ИЛ	– интерлейкины	CD3 ⁺ CD4 ⁺	– Т-хелперы.
ИРИ	– иммуно-регуляторный индекс	CD3 ⁺ CD8 ⁺	– цитотоксические Т-лимфоциты
ИФА	– иммуно-ферментный анализ	CD3 ⁺ , CD19 ⁺	– В-лимфоциты.
ЛФ	– локализованные формы рака	CD3 ⁺ -HLA-DR	– активированные Т-

предстательной железы	лимфоциты.
МР – метастатический рак предстательной железы	CD25 – В-лимфоциты с рецептором ИЛ-2 (активированные)
МРФ – местно-распространенные формы рака предстательной железы	CD45R0+ – клетки памяти, регуляторные Т-лимфоциты
НИР – научно-исследовательская работа	CD56 ⁺ CD16 ⁺ – Т-киллеры
НСТ-тест – нитросиний тетразолиевый тест	CD95+ – мембранный белок I типа, рецептор фактора некроза опухоли
ОМ – онкомаркеры	IPSS – международная система суммарной оценки симптомов болезней предстательной железы
ПЖ – предстательная железа	FoxP3 – специфический маркер регуляторных Т-клеток
ПРИ – пальцевое ректальное исследование	Ki-67 – антиген ракового процесса, индекс пролиферации опухоли
ПСА – простат-специфический антиген	PCa3 – антиген при раке предстательной железы
РПЖ – рак предстательной железы	РНИ – интегральный показатель здоровья предстательной железы
РПЭ – радикальная простатэктомия	TNM – универсальная международная классификация онкологических заболеваний
РТЛ – регуляторные Т-лимфоциты	Ig – иммуноглобулины
ТРУЗИ – трансуретральное ультразвуковое исследование	NK – натуральные киллеры
УЗИ – ультразвуковое исследование	
ФНО- α – фактор некроза опухоли альфа	
ФА – фагоцитарная активность лейкоцитов	
ФЧ – фагоцитарное число лейкоцитов	
Bcl – белок, регулирующий апоптоз опухолевых клеток	