

Особенности гипоксиязависимого механизма регуляции неоангиогенеза и апоптоза у больных локализованным раком предстательной железы и с ранним рецидивированием

О.И. Кит¹, Ф.С. Бова², А.Ю. Максимов¹

¹ФГБУ «Ростовский научно-исследовательский онкологический институт» Минздрава России;
Россия, 344037 Ростов-на-Дону, 14-я линия, 63;

²Центр урологии, нефрологии и гемодиализа ГБУ Ростовской области «Областная больница № 2»;
Россия, 344029 Ростов-на-Дону, ул. 1-й Конной Армии, 33

Контакты: Филипп Сергеевич Бова alald@inbox.ru

Цель исследования — изучение экспрессии генов, ответственных за гипоксиязависимый контроль транскрипции, неоангиогенез, а также апоптоз в опухолевой ткани предстательной железы, у больных локализованным раком предстательной железы (РПЖ) с биохимическими рецидивами (БР) и без рецидивов после радикальной простатэктомии (РПЭ).

Материалы и методы. В основную группу были включены 56 пациентов с локализованным РПЖ, у которых в течение 2 лет после РПЭ выявлен БР. Группу сравнения составили 60 больных локализованным РПЖ, у которых рецидив не наблюдался. В контрольную группу были объединены 55 пациентов, у которых операционные биоптаты предстательной железы взяты в пределах здоровых тканей при удалении доброкачественной гиперплазии предстательной железы. Определение уровня экспрессии генов BAX, BCL2, VEGFA, HIF1α в ткани опухоли проводили методом полимеразной цепной реакции в реальном времени.

Результаты. У больных локализованным РПЖ после РПЭ развитие БР ассоциировано с повышением экспрессии генов BCL2, VEGFA и HIF1α и снижением экспрессии гена BAX. У больных локализованным РПЖ и с ранним рецидивированием в ткани опухоли, вероятно, через гипоксиязависимый фактор, усиливающий транскрипционные процессы в опухолевых клетках, активируется неоангиогенез, сопряженный с угнетением апоптоза опухолевых клеток за счет усиления экспрессии антиапоптотического гена BCL2.

Заключение. Определение экспрессии генов BAX, BCL2, VEGFA и HIF1α в ткани опухоли при локализованном РПЖ позволяет дополнительно оценить риск прогрессирования заболевания после хирургического лечения.

Ключевые слова: рак предстательной железы, биохимический рецидив, гипоксиязависимый фактор, ангиогенез, апоптоз, экспрессия генов

Для цитирования: Кит О.И., Бова Ф.С., Максимов А.Ю. Особенности гипоксиязависимого механизма регуляции неоангиогенеза и апоптоза у больных локализованным раком предстательной железы и с ранним рецидивированием. Онкоурология 2018;14(3):37–42.

DOI: 10.17650/1726-9776-2018-14-3-37-42

Hypoxia-dependant mechanisms of regulating neoangiogenesis and apoptosis in patients with early recurrent localized prostate cancer

O.I. Kit¹, F.S. Bova², A.Yu. Maksimov¹

¹Rostov Research Institute of Oncology, Ministry of Health of Russia; 63 14th Liniya, Rostov-on-Don 344037, Russia;

²Rostov Center of Urology, Nephrology, and Hemodialysis, Regional Hospital No. 2;

33 1st Konnoy Armii St., Rostov-on-Don 344029, Russia

Objective. Examination of the expression of genes responsible for hypoxia-dependent control of transcription, neoangiogenesis, and apoptosis in tumor tissue of the prostate, in patients with localized prostate cancer (PC) with biochemical recurrence (BR) and without recurrences after radical prostatectomy (RPE).

Materials and methods. The main group included 56 patients with localized PC who had been diagnosed with BR within two years after RP. 60 patients with localized PC who did not relapse had a comparative group. 55 patients in whom operative biopsy specimens of the prostate gland were taken within healthy tissues with the removal of benign prostatic hyperplasia were combined into a control group. Determination of the expression level of the BAX, BCL2, VEGFA and HIF1α genes in tumor tissue was performed by real-time polymerase chain reaction.

Results. In patients with localized PC after RPE, development of BR is associated with an increase in the expression of BCL2, VEGFA and HIF1α genes and a decrease in the expression of the BAX gene. In patients with localized PC and early recurrence of tumor tissue through a hypoxia-dependent factor that enhances transcritical processes in tumor cells, neoangiogenesis is activated, which is associated with inhibition of apoptosis of tumor cells by enhancing the expression of the antiapoptotic gene BCL2.

Conclusion. Determination of the expression of BAX, BCL2, VEGFA and HIF1α genes in tumor tissue with localized PC allows further assessment of the risk of disease progression after surgical treatment.

Key words: prostate cancer, biochemical relapse, hypoxia-dependent factor, angiogenesis, apoptosis, gene expression

For citation: Kit O.I., Bova F.S., Maksimov A.Yu. Hypoxia-dependant mechanisms of regulating neoangiogenesis and apoptosis in patients with early recurrent localized prostate cancer. *Onkourologiya = Cancer Urology* 2018;14(3):37–42.

Введение

Для формирования заключения о прогрессивном либо индолентном течении рака предстательной железы (РПЖ) в настоящее время используют динамичное определение простатического специфического антигена (ПСА) в сыворотке крови [1]. Разработаны четкие критерии диагностики биохимического рецидива (БР) заболевания по результатам лабораторного мониторинга. Однако ключевой проблемой в онкоурологии, требующей внимания, остается разработка точного и минимально инвазивного прогностического теста в отношении выделения пациентов в начале наблюдения и лечения с высоким риском к раннему рецидивированию онкологического заболевания [2]. РПЖ имеет сложный патогенез, опирающийся на комплекс гормональных, генетических, молекулярных и гистологических изменений [3]. Одни факторы способствуют развитию онкологического процесса, другие, в большей мере, отвечают за дальнейшее распространение раковых клеток в организме либо за рецидив заболевания [4].

Изучение экспрессии генов в опухолевой ткани предстательной железы (ПЖ) способствует выявлению генетических сигнатур, использующихся для формирования заключения о течении заболевания (латентное или агрессивное), его прогрессировании, метастатическом потенциале опухоли наряду с важными клиническими характеристиками болезни [5, 6]. G. Novelli и соавт. при разработке специального гибридного микрочипа предложили использовать мониторинг экспрессии 190 генов в андрогензависимых и андрогеннезависимых клетках ПЖ [7]. Авторы показали высокую значимость предложенного метода для решения вопроса о прогнозе развития РПЖ. В другом исследовании выявлено, что группы больных РПЖ с разными сроками выживаемости (<300 дней и >900 дней) различались по выраженности экспрессии генов в мононуклеарной фракции венозной крови с диагностической эффективностью 92 % [8].

Как известно, апоптоз относится к ключевым процессам, способствующим местному ограничению опухоли, а неоангиогенез ввиду усиления кровоснабжения за счет новообразования сосудов и повышения их проницаемости обеспечивает ее дальнейший рост и прогрессирование [9]. Гипоксиязависимые пути контроля транскрипции в опухолевой клетке, а также апоптоза, неоангиогенеза в ткани могут влиять на рост и распространение опухоли у больных РПЖ. Гипоксия

оказалась самым мощным VEGF-индуцирующим стимулом для всех типов клеток. Гипоксияиндуцибельный фактор 1 α (hypoxia-inducible factor 1 alpha, HIF1 α) участвует в активируемых в условиях гипоксии транскрипционных механизмах, влияющих на интенсивность пролиферации раковых клеток, повышенную экспрессию протеина VEGF в опухоли [10]. Сопоставление выраженности экспрессии генов *HIF1 α* , *VEGFA*, *BAX* и *BCL2* в операционных биоптатах опухолевой ткани ПЖ с последующим течением болезни способно расширить информацию о предикторных возможностях методов генетического анализа для прогноза заболевания. Изучение экспрессии гена *HIF1 α* , определяющего синтез и функции одноименного протеина, регулирующего после транслокации из цитоплазмы в ядро интенсивность транскрипционных процессов, синтез ростового фактора для сосудов *VEGFA*, может расширить спектр механизмов, модулирующих воздействие на течение онкологического заболевания.

Цель исследования — изучение экспрессии генов, ответственных за гипоксиязависимый контроль транскрипции, неоангиогенез, а также апоптоз в опухолевой ткани ПЖ, у больных локализованным РПЖ с БР и без рецидивов после радикальной простатэктомии (РПЭ).

Материалы и методы

Работа выполнена в отделении онкоурологии Ростовского научно-исследовательского онкологического института, Центре урологии, нефрологии и гемодиализа Областной больницы № 2 в период с 2015 по 2018 г. Исследование было одобрено Локальным независимым этическим комитетом Ростовского научно-исследовательского онкологического института.

Всем пациентам в сыворотке крови исходно и каждые 3 мес после РПЭ определяли содержание ПСА путем иммуноферментного анализа на фотометре Multiscan-P2 (Thermo Fisher Scientific Inc., Финляндия). Основанием для заключения о наличии БР было превышение концентрации ПСА в крови >0,2 нг/мл в 3 последовательных измерениях, проведенных с интервалом 2 нед и более.

В основную группу были включены 56 пациентов с локализованным РПЖ, у которых в течение 2 лет после РПЭ выявлен БР. Группу сравнения составили 60 больных локализованным РПЖ, у которых рецидив не наблюдался. В контрольную группу были

объединены 55 пациентов, у которых операционные биоптаты ПЖ взяты в пределах здоровых тканей при удалении доброкачественной гиперплазии ПЖ.

Возраст больных находился в пределах от 57 до 74 лет, составив в среднем в основной группе $66,7 \pm 2,1$ года, в группе сравнения $62,4 \pm 2,5$ года, в контрольной группе $63,1 \pm 2,4$ года. Распределение больных основной группы в зависимости от клинической стадии РПЖ было следующим: cT1c – 5,3 % ($n = 3$), cT2a – 8,9 % ($n = 5$), cT2b – 37,5 % ($n = 21$), cT2c – 48,2 % ($n = 27$). Высокая степень гистопатологической дифференцировки (сумма баллов по шкале Глисона (индекс Глисона) ≤ 6) встречалась у 6 (10,7 %) больных основной группы, умеренная (индекс Глисона 7) – у 45 (80,4 %) и низкая (индекс Глисона 8–10) – у 5 (8,9 %).

В группе сравнения распределение стадий РПЖ было следующим: cT1c – 5 % ($n = 3$), cT2a – 5 % ($n = 3$), cT2b – 35 % ($n = 21$), cT2c – 55 % ($n = 33$). Высокая степень гистопатологической дифференцировки (индекс Глисона ≤ 6) встречалась у 8 (7,1 %) больных, умеренная (индекс Глисона 7) – у 48 (91,6 %) и низкая (индекс Глисона 8–10) – у 4 (1,3 %).

При микроскопическом исследовании фиксированных образцов ткани кусочков ПЖ, взятых при операции, отмечали гистологический тип опухоли, степень гистопатологической дифференцировки. У всех больных основной группы и группы сравнения гистологический тип опухоли ПЖ был представлен аденокарциномой.

В зависимости от риска развития рецидива РПЖ все 116 пациентов основной группы и группы сравнения после операции были разделены на 4 подгруппы: очень низкого ($n = 4$), низкого ($n = 10$), промежуточного ($n = 93$) и высокого риска ($n = 9$) согласно общепринятой классификации A.V. D'Amico и соавт. [11].

Операционные биоптаты ПЖ для генетического анализа замораживали в жидком азоте (температура -80°C) и в течение 1 ч доставляли в лабораторию. Из полученных образцов ткани ПЖ готовили препараты толщиной 8 мкм, и ввиду существования гетерогенности опухоли (мультифокальность, внутриочаговая и межочаговая гетерогенность) патологоанатом после окраски гематоксилином контролировал, соответствует ли фрагмент опухоли наибольшему индексу Глисона.

Фрагменты ткани помещали в пробирку с 350 мкл буфера набора для лизиса клеток и связывания общей РНК RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия), включая 1 % β -меркаптоэтанол. Экстракцию, выделение и элюирование общей РНК проводили согласно инструкции фирмы-производителя. Концентрацию полученной РНК измеряли с помощью набора Quant-iTTM RNA Assay Kit (Invitrogen, США) на флуориметре QubitTM (Invitrogen, США).

Для получения комплементарной ДНК (кДНК) 1 мкг РНК подвергали обратной транскрипции

с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) с обратной транскрипцией и набора реагентов с обратной транскриптазой Omniscript Reverse Transcriptase Kit (Qiagen, Германия) и использованием 10 μM р (dN) 8 рандомных гексамерных праймеров (TIB MOLBIOL, Германия). Перед транскрипцией РНК денатурировали в течение 5 мин при температуре 65°C с последующим охлаждением на льду. Обратная транскриптаза Omniscript была инактивирована при нагреве реакционной смеси в течение 5 мин при температуре 93°C . До анализа ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) кДНК хранили при температуре -20°C . Перед использованием в качестве ПЦР-матрицы кДНК разводили в соотношении 1:5.

При проведении ПЦР-РВ для анализа экспрессии генов *BAX*, *BCL2*, *VEGFA* и *HIF1 α* использовали систему ABI Prism (Applied Biosystems, США), включающую готовые праймеры и зонды TaqMan. Зонды TaqMan были мечеными флуоресцентным красителем FAM 5'-(6-карбоксифлуоресцеин) с гасителем красителя TAMRA (6-карбокситетраметилродамин) на тимидиновой основе вблизи 3'-конца. Реакционная смесь содержала: ПЦР-буфер (200 мМ Трис-НСl (рН 8,4), 500 мМ KCl), 4,5 мМ MgCl₂, 1 мМ dNTP, 0,5 U платиновой Taq ДНК-полимеразы (Invitrogen, Германия), 0,2 мкМ каждого праймера, 120 нМ специфического зонда TaqMan и 1 мкМ 6-карбокси-Х-родамина (Molecular Probes, Нидерланды). В качестве матрицы для ПЦР использовали 2 мкл предварительно разбавленной кДНК в конечном объеме 25 мкл. Условия цикла были следующими: первичная денатурация 94°C – 3 мин; 45 циклов: 94°C – 20 с; отжиг и элонгация праймера при температуре, специфичной для каждого гена, – 30 с. При определении экспрессии каждого гена ПЦР-РВ проводили трехкратно.

В качестве референсного использовали ген *HPRT1* (Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1) (NM_000194, GenBank). Для него применяли готовые праймеры фирмы Roche Applied Science (Германия) системы LightCycler-h-HPRT 1811.97 (Housekeeping Gene Set).

Для проведения ПЦР-РВ использовали термоциклер Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad, США), специализированное программное обеспечение Bio-Rad CFX Manager v.2.1. Количественную оценку экспрессии генов рассчитывали по методу $2^{-\Delta\text{Ct}}$ [12] как разность значений пороговых циклов реакции (Ct) для исследуемого и референсного генов. Относительный уровень экспрессии определяли как отношение медиан рассчитываемых показателей для каждого гена в основной группе и группе сравнения при РПЖ к аналогичному показателю в контрольной группе, а также между основной группой и группой сравнения (кратность увеличения или уменьшения экспрессии гена одной группы по отношению к другой).

Статистическую обработку результатов выполняли с помощью программы Statistica 10.0 (StatSoft, США). В работе использовали метод описательной статистики, корреляционный анализ.

Результаты и обсуждение

В исследовании была изучена экспрессия 4 генов. Ген *VEGFA* кодирует синтез сосудистого эндотелиального фактора роста (vascular endothelial growth factor, VEGF) типа A, ген *HIF1α* – α-субъединицы протеина гипоксияиндуцибельного фактора 1. Антиапоптозный ген *BCL2* контролирует синтез BCL2-протеина (B-cell lymphoma 2), проапоптозный ген *BAX* отвечает за синтез ассоциированного с BCL2 белка X.

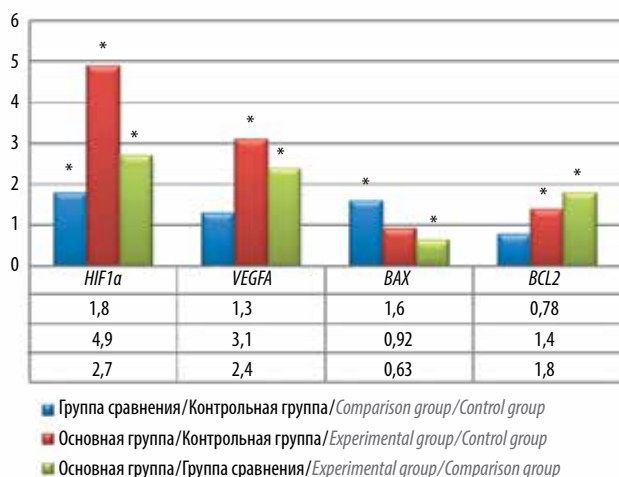
В основной группе по сравнению с контрольной обнаружено выраженное ($>1,5$) и статистически значимое повышение экспрессии гена *HIF1α* в 4,9 раза ($p < 0,001$) и гена *VEGFA* в 3,1 раза ($p < 0,001$) (см. рисунок). В группе сравнения по отношению к контрольной группе экспрессия гена *HIF1α* была выше в меньшей мере (в 1,8 раза; $p < 0,05$), а для гена *VEGFA*, контролирующего неоангиогенез, отмечалась лишь недостоверная тенденция к повышению ($p = 0,17$). При сравнительном анализе уровней экспрессии генов в опухолевых образцах ткани в основной группе по сравнению с группой сравнения установлено повышение ($p < 0,05$) относительного показателя как для гена *HIF1α* (в 2,7 раза), так и для гена *VEGFA* (в 2,4 раза).

Следовательно, у пациентов с локализованным РПЖ при раннем рецидивировании исходно в опухолевых образцах ткани установлен более высокий

уровень экспрессии генов *HIF1α* и *VEGFA*. *VEGFA* имеет ведущее значение для активации неоангиогенеза и роста опухолей при РПЖ в условиях гипоксии тканей [13]. Одним из основных доказательств данного факта может служить работа К. Eisermann и соавт. [14], в которой сделано заключение о том, что VEGF-зависимый ангиогенез при РПЖ активируется снижением кислорода в ткани и повышением чувствительности рецепторов к андрогенам. Классическая модель регуляции ангиогенеза в РПЖ также, как в любой другой опухоли, предполагает существование паракринной системы, в которой VEGF вырабатывается опухолевыми клетками, а рецепторы к фактору расположены на эндотелиоцитах сосудов. Причем выраженность экспрессии белка VEGF коррелирует с экспрессией антигена Ki-67 и индексом пролиферации опухолевых клеток [15], т. е. VEGF кроме основной функции регуляции неоангиогенеза при РПЖ выступает как аутокринный и паракринный регулятор пролиферации опухолевых клеток аденокарциномы. Продукция белка VEGF раковыми клетками при РПЖ индуцируется различными внешними и внутренними факторами, среди которых гипоксия является ведущей [16, 17]. Об одностороннем усилении экспрессии *HIF1* и *VEGF* в клетках РПЖ свидетельствовало наличие тесной и прямой корреляционной связи: коэффициент корреляции уровней экспрессии *HIF1* и *VEGF* 0,64 ($p < 0,001$). Следовательно, ангиогенез в опухолевой ткани ПЖ косвенно активируется в том числе вследствие усиления экспрессии гена *HIF1α*, отвечающего за синтез гипоксияиндуцибельного фактора транскрипции.

В основной группе по сравнению с контрольной имело место повышение экспрессии антиапоптотического гена *BCL2* в опухолевой ткани в 1,4 раза ($p < 0,05$) (см. рисунок). При сравнительном анализе экспрессии гена *BCL2* в основной группе по сравнению с группой сравнения установлены повышение относительного показателя в 1,8 раза ($p < 0,05$) и снижение аналогичной величины для проапоптотического гена *BAX* на 37 % ($p < 0,05$). В группе сравнения по отношению к контрольной группе экспрессия гена *BAX* была выше в 1,6 раза ($p < 0,05$), а для антиапоптотического гена *BCL2* отмечалась недостоверная тенденция к снижению ($p = 0,09$). Таким образом, у пациентов с локализованным РПЖ при отсутствии БР после РПЭ повышение экспрессии гена *BAX* способствовало активации процессов апоптоза. У пациентов с локализованным РПЖ при последующем рецидивировании в опухолевых образцах наблюдалось угнетение апоптоза за счет повышения экспрессии гена *BCL2*.

Активацию антиапоптозного механизма в опухолевой ткани у больных основной группы можно объяснить тем, что усиленная экспрессия белка VEGF не только стимулирует пролиферацию опухолевых



Изменение уровней экспрессии генов *HIF1α*, *VEGFA*, *BAX* и *BCL2* в ткани предстательной железы в основной группе и группе сравнения к соответствующим показателям контрольной группы и между собой (кратность увеличения или уменьшения экспрессии гена по отношению к аналогичному показателю контроля). *Достоверные различия между группами при $p < 0,05$

Changes in the expression of *HIF1α*, *VEGFA*, *BAX*, and *BCL2* in prostate tissue in the experimental and comparison groups (fold changes compared to the control group). *Significant differences between the groups at $p < 0,05$

клеток, но и подавляет апоптоз, индуцируя экспрессию *BCL2* [18]. В нашей работе установлена статистически значимая корреляция с уровнем экспрессии генов *VEGF* и *BCL2* (коэффициент корреляции 0,57; $p < 0,001$). В то же время существуют работы, указывающие, что *BCL2* усиливает стимулирующее действие гипоксии на синтез *VEGF* в клетках аденокарциномы ПЖ [19]. В опытах *in vivo* *BCL2*-трансфицированные клетки образовывали опухоли с большей степенью васкуляризации и большей экспрессией *VEGF*, чем исходные клетки [20]. В работе была установлена прямая статистически значимая корреляционная связь с экспрессией генов *BCL2* и *HIF1α* (коэффициент корреляции 0,52; $p < 0,01$). Таким образом, *VEGF*, способствующий выживаемости эндотелиальных клеток, являлся косвенным антиапоптотическим фактором для опухолевых клеток. В свою очередь, усиленная экспрессия *BCL2* способствовала усилению интеграции между транскрипционным фактором, активиру-

емым при гипоксии, и фактором роста сосудов. У больных локализованным РПЖ и с ранним рецидивированием в ткани опухоли, вероятно, через гипоксиязависимый фактор, усиливающий транскрипционные процессы в опухолевых клетках, активируется неоангиогенез, сопряженный с угнетением апоптоза опухолевых клеток за счет усиления экспрессии антиапоптотического гена *BCL2*.

Заключение

У больных локализованным РПЖ после РПЭ развитие БР ассоциировано с повышением экспрессии генов *HIF1α*, *VEGFA* и *BCL2* и снижением экспрессии гена *BAX*.

Определение экспрессии генов *HIF1α*, *VEGFA*, *BAX* и *BCL2* в ткани опухоли при локализованном РПЖ позволяет дополнительно оценить риск прогрессирования заболевания после хирургического лечения.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Сергеева Н.С., Скачкова Т.Е., Маршутина Н.В. и др. Клиническая значимость ПСА-ассоциированных тестов в диагностике и стадировании рака предстательной железы. *Онкология* 2018;(1):55–67. [Sergeeva N.S., Skachkova T.E., Marshutina N.V. et al. Clinical significance of PSA-associated tests in the diagnosis and staging of prostate cancer. *Onkologiya = Oncology* 2018;(1):55–67. (In Russ.)].
2. Гулиев Ф.А. Прединдикторы биохимического прогрессирования рака предстательной железы. *Казанский медицинский журнал* 2017;98(6):890–4. [Guliev F.A. Predictors of biochemical progression of prostate cancer. *Kazanskiy medicinskiy zhurnal = Kazan Medical Journal* 2017;98(6):890–4. (In Russ.)].
3. Coleman W.B. Molecular pathogenesis of prostate cancer. In: *Molecular Pathology*. 2nd Edn. The molecular basis of human disease. Eds.: W.B. Coleman, G. Tsongalis Elsevier Inc., 2018. Pp. 555–568. DOI: 10.1016/B978-0-12-802761-5.00025-0.
4. Bethel C.R., De Marzo A.M., Nelson W.G. Molecular pathogenesis of prostate cancer: somatic, epigenetic, and genetic alterations. In: *Molecular pathology. The molecular basis of human disease*. Eds. W.B. Coleman, G. Tsongalis. Elsevier Inc., 2009. Pp. 489–500. DOI: 10.1016/B978-0-12-374419-7.00024-X.
5. Коган М.И., Чибичян М.Б., Водолажский Д.И. Изменение экспрессии генетических локусов в мононуклеарной фракции периферической крови больных раком предстательной железы. *Клиническая онкология* 2012;(5):59–60. [Kogan M.I., Chibichjan M.B., Vodolazhskiy D.I. Change in the expression of genetic loci in the mononuclear fraction of peripheral blood of patients with prostate cancer. *Klinicheskaya onkologiya = Clinical Oncology* 2012;(5):59–60. (In Russ.)].
6. Толкач Ю.В., Рева С.А., Носов А.К. и др. Клиническая значимость генетической характеристики рака предстательной железы: обзор литературы. *Онкоурология* 2015;(2):99–106. DOI: 10.17650/1726-9776-2015-11-2-99-106. [Tolkach Yu.V., Reva S.A., Nosov A.K. et al. Clinical significance of genetic characterization of prostate cancer: a review of literature. *Onkourologiya = Oncourology* 2015;(2):99–106. (In Russ.)].
7. Novelli G., Ciccacci C., Borgiani P. et al. Genetic tests and genomic biomarkers: regulation, qualification and validation. *Clin Cases Miner Bone Metab* 2008;5(2):149–54. PMID: 22460999.
8. Komatsu N., Matsueda S., Tashiro K. et al. Gene expression profiles in peripheral blood As a biomarker in cancer patients receiving Peptide vaccination. *Cancer* 2012;118(12):3208–21. DOI: 10.1002/cncr.26636. PMID: 22071976.
9. Гориловский Л.М., Зингеренко М.Б. Роль апоптоза в патогенезе рака предстательной железы. *Клиническая геронтология* 2007;(11):34–7. [Gorilovskiy L.M., Zingerenko M.B. The role of apoptosis in the pathogenesis of prostate cancer. *Klinicheskaya gerontologiya = Clinical Gerontology* 2007;(11):34–7. (In Russ.)].
10. Tong D., Liu Q., Liu G. et al. The HIF/PHF8/AR axis promotes prostate cancer progression. *Oncogenesis* 2016;5(12):e283. DOI: 10.1038/ONCSIS.2016.74. PMID: 27991916.
11. D'Amico A.V., Whittington R., Malkowicz S.B. et al. Combined modality staging of prostate carcinoma and its utility in predicting pathologic stage and postoperative prostate specific antigen failure. *Urology* 1997;49(3A Suppl):23–30. PMID: 9123732.
12. Livak K., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 2001;25(4):402–8. DOI: 10.1006/meth.2001.1262. PMID: 11846609.
13. Черняев В.А. VEGF и рак предстательной железы. *ПМЖ. Онкология* 2012;(1):17–9. [Chernyaev V.A. VEGF and prostate cancer. *RMZh. Onkologiya = RMJ. Oncology* 2012;(1):17–9. (In Russ.)].
14. Eisermann K., Fraizer G. The androgen receptor and VEGF: mechanisms of androgen-regulated angiogenesis in prostate cancer. *Cancers (Basel)* 2017;9(4):E32. DOI: 10.3390/cancers9040032. PMID: 28394264.
15. Ma T., Yang S., Jing H. et al. Apparent diffusion coefficients in prostate cancer: correlation with molecular markers Ki-67, HIF-1α and VEGF. *NMR in Biomedicine* 2018;31(3). DOI: 10.1002/nbm.3884. PMID: 29315957.
16. Ranasinghe W.K., Sengupta S., Williams S. et al. The effects of nonspecific HIF1α inhibitors on development of castrate resistance and metastases in prostate cancer. *Cancer Med* 2014;3(2):245–51.

- DOI: 10.1002/cam4.189.
PMID: 24464861.
17. Stewart G.D., Ross J.A., McLaren D.B. et al. The relevance of a hypoxic tumour microenvironment in prostate cancer. *BJU Int* 2010;105(1):8–13.
DOI: 10.1111/j.1464-410X.2009.08921.x.
PMID: 19889065.
 18. Sakai Y., Goodison S., Cao W. et al. VEGF induces expression of Bcl-2 and multiple signaling factors in microvascular endothelial cells in a prostate cancer model. *World J Urol* 2009;27(5):659–66. DOI: 10.1007/s00345-009-0422-0. PMID: 19495772.
 19. Anvari K., Toussi M.S., Kalantari M. et al. Expression of Bcl-2 and Bax in advanced or metastatic prostate carcinoma. *Urol J* 2012;9(1):381–8. PMID: 22395836.
 20. Renner W., Langsenlehner U., Krenn-Pilko S. et al. BCL2 genotypes and prostate cancer survival. *Strahlenther Onkol* 2017;193(6):466–71.
DOI: 10.1007/s00066-017-1126-9.
PMID: 28396899.

Вклад авторов

О.И. Кит: разработка дизайна исследования;
Ф.С. Бова: обзор публикаций по теме статьи, получение данных для анализа, анализ полученных данных, написание текста рукописи;
А.Ю. Максимов: статистический анализ полученных данных, корректировка текста рукописи.

Authors' contributions

O.I. Kit: developing the research design;
F.S. Bova: reviewing of publications of the article's theme, obtaining data for analysis, analysis of the obtained data, article writing;
A.Yu. Maksimov: statistical analysis of the obtained data, correction of the text of the article.

ORCID авторов/ORCID of authors

О.И. Кит/O.I. Kit: <https://orcid.org/0000-0003-3061-6108>
Ф.С. Бова/F.S. Bova: <https://orcid.org/0000-0003-2782-3288>
А.Ю. Максимов/A.Yu. Maksimov: <https://orcid.org/0000-0002-1397-837X>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Информированное согласие. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Informed consent. All patients gave written informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 17.04.2018. Принята к публикации: 02.07.2018.

Article received: 17.04.2018. Accepted for publication: 02.07.2018.