

DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-1-8-19



Клиническая значимость фенотипа иммунных клеток опухолевой стромы рака предстательной железы

П.А. Подлесная, О.В. Ковалева, М.А. Рашидова, Д.В. Самойлова, А.А. Петренко,
В.В. Мочальникова, А.Н. Грачев

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Полина Алексеевна Подлесная polina.pod@yandex.ru

Введение. Рак предстательной железы на сегодняшний день является наиболее часто диагностируемым онкологическим заболеванием среди мужского населения и занимает 5-е место в мире по показателям смертности среди злокачественных новообразований. Известно, что микроокружение опухоли играет большую роль в патогенезе заболевания. Накоплено много данных, свидетельствующих о том, что клетки воспалительного инфильтрата опухоли участвуют в возникновении, прогрессии и ответе на лечение в случаях рака предстательной железы. Однако их роль в контексте прогрессии заболевания еще не определена. В статье представлено исследование фенотипа воспалительного инфильтрата рака предстательной железы и его ассоциации с клинико-морфологическими характеристиками пациентов.

Цель исследования – определение особенностей воспалительного инфильтрата рака предстательной железы и его ассоциации с клинико-морфологическими характеристиками пациентов с данным заболеванием.

Материалы и методы. В исследование были включены образцы опухолей, полученные от 31 пациента с раком предстательной железы. С помощью иммуногистохимического исследования проанализирована экспрессия CD3, CD8, FoxP3, CD68, PU.1, CD204, CD163, IDO1 и PD-L1 (лиганда рецептора программируемой клеточной гибели 1). Для определения взаимосвязи маркеров и клинико-морфологических характеристик пациентов использовались непараметрический критерий Манна–Уитни и точный критерий Фишера. Для анализа корреляций между содержанием клеток различных фенотипов применяли коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Во всех анализах значение $p \leq 0,05$ считалось статистически значимым.

Результаты. В ходе исследования определены особенности стромы рака предстательной железы. Было продемонстрировано, что повышенное содержание CD204+клеток ассоциировано с более старшим возрастом пациентов ($p = 0,0026$), а количество CD163+ и CD8+клеток – с отсутствием метастазов в регионарные лимфатические узлы ($p = 0,0067$ и $p = 0,0069$ соответственно). Показано, что PU.1 может быть использован как общий маркер макрофагов. Также мы выявили достоверные корреляции уровня PU.1 с PD-L1 в строме ($r = 0,421$; $p = 0,018$), IDO1 в строме ($r = 0,557$; $p = 0,001$) и опухолевых клетках ($r = 0,393$; $p = 0,029$), а также CD68 с IDO1 ($r = 0,535$; $p = 0,002$) и CD163 с PD-L1 и IDO1 в строме ($r = 0,399$; $p = 0,026$ и $r = 0,220$; $p = 0,026$ соответственно).

Заключение. Были исследованы характеристики стромы рака предстательной железы. Полученные данные указывают на то, что основными клетками, экспрессирующими PD-L1 и IDO1 в строме опухоли, в случае рака предстательной железы являются макрофаги, инфильтрирующие опухоль. Повышенная экспрессия IDO1 в опухолевой ткани ассоциирована с иммуносупрессорным фенотипом воспалительного инфильтрата. Тот факт, что количество макрофагов прямо коррелирует с количеством Т-лимфоцитов в строме рака предстательной железы, а уровень содержания макрофагов 2-го типа – с цитотоксическими Т-клетками, свидетельствует о взаимодействии механизмов врожденного и приобретенного иммунитета в процессе прогрессии опухоли.

Ключевые слова: рак предстательной железы, микроокружение опухоли, воспалительный инфильтрат, строма, Т-лимфоциты, макрофаги

Для цитирования: Подлесная П.А., Ковалева О.В., Рашидова М.А. и др. Клиническая значимость фенотипа иммунных клеток опухолевой стромы рака предстательной железы. Успехи молекулярной онкологии 2022;9(1):8–19. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-1-8-19.

Clinical significance of the phenotype of immune cells of the tumor stroma of prostate cancer

P.A. Podlesnaya, O.V. Kovaleva, M.A. Rashidova, D.V. Samoilova, A.A. Petrenko, V.V. Mochalnikova, A.N. Gratchev

N.N. Blokhin National Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Contacts: Polina Alekseevna Podlesnaya polina.pod@yandex.ru

Introduction. Prostate cancer is by far the most frequently diagnosed cancer among the male population and ranks fifth in the world in terms of mortality rates among malignant neoplasms. Today it is known that the tumor microenvironment plays an important role in the pathogenesis of the disease. Abundant data has accumulated indicating that cells of the inflammatory infiltrate of the tumor are involved in the onset, progression and response to treatment in cases of prostate cancer. However, their role in the context of disease progression has not yet been determined. In this work, we studied the phenotype of inflammatory infiltrate of prostate cancer and its association with the clinical and morphological characteristics of patients.

The study objective is to determine the features of the inflammatory infiltrate of prostate cancer and its association with the clinical and morphological characteristics of patients with this disease.

Materials and methods. The study included tumor samples obtained from 31 patients with prostate cancer. The expression of CD3, CD8, FoxP3, CD68, PU.1, CD204, CD163, IDO1, PD-L1 (programmed death-ligand 1) was assessed by immunohistochemistry. The relationship between markers and clinical and morphological characteristics was assessed using the nonparametric Mann–Whitney test and Fisher’s exact test. Spearman’s rank correlation coefficient was used to analyze the correlations between contents of cells of different phenotypes. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results. This study describes the features of the stroma of prostate cancer. We have shown that an increased content of CD204+ cells is associated with an older age of patients ($p = 0.0026$), and the number of CD163+ and CD8+ cells with no metastases to regional lymph nodes ($p = 0.0067$ and $p = 0.0069$, respectively). It has been shown that PU.1 can be used as a general marker of macrophages. We also found significant correlations between the level of PU.1 and PD-L1 in the stroma ($r = 0.421$; $p = 0.018$) and IDO1 in the stroma ($r = 0.557$; $p = 0.001$) and in tumor cells ($r = 0.393$; $p = 0.029$), CD68 with IDO1 in the stroma ($r = 0.535$; $p = 0.002$), CD163 with PD-L1 and IDO1 in the stroma ($r = 0.399$; $p = 0.026$ and $r = 0.220$; $p = 0.026$, respectively).

Conclusion. In this work, the characteristics of the stroma of prostate cancer were investigated. Our data indicate that tumor associated macrophages are the main cells expressing PD-L1 and IDO1 in the tumor stroma in the case of prostate cancer. Increased expression of IDO1 in tumor tissue is associated with the immunosuppressive phenotype of the inflammatory infiltrate. The fact that the number of macrophages directly correlates with the number of T-lymphocytes in the prostate stroma, and the number of M2 macrophages with cytotoxic T-cells indicates the interaction of the mechanisms of innate and acquired immunity during the progression of prostate cancer.

Key words: prostate cancer, microenvironment, inflammatory infiltrate, stroma, T-lymphocytes, macrophages

For citation: Podlesnaya P.A., Kovaleva O.V., Rashidova M.A. et al. Clinical significance of the phenotype of immune cells of the tumor stroma of prostate cancer. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2022;9(1): 8–19. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-1-8-19.

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день рак предстательной железы (РПЖ) занимает 5-е место в мире среди причин смертности, связанных с онкологическими заболеваниями, и 1-е место по частоте встречаемости среди злокачественных новообразований у мужчин [1]. Он относится к гормонозависимым формам опухолей, появление и прогрессирование которых связано с активностью рецепторов андрогенов и увеличением концентрации мужских половых гормонов [2]. Наиболее распространенным гистологическим типом опухолей предстательной железы (ПЖ) является аденокарцинома. Другие подтипы встречаются довольно редко и включают в себя уротелиальную, мелкоклеточную, плоскоклеточную и базально-клеточную карциномы.

Развитие РПЖ начинается с формирования интраэпителиальной неоплазии, которая в большинстве случаев служит отправной точкой развития аденокарциномы. Выделяют андрогенозависимую и не зависящую от гормонов формы аденокарциномы ПЖ, при этом последняя относится к наиболее поздним стадиям заболевания [3]. Основными путями прогресси-

рования РПЖ считаются экстракапсулярное расширение, метастазирование в тазовые лимфатические узлы, являющиеся регионарными для данной локализации, а также отдаленное метастазирование в легкие и кости [4]. Кроме того, для РПЖ характерна перинеуральная инвазия. Ее наличие у пациентов после радикальной простатэктомии повышает риск прогрессирования заболевания в 2 раза [5].

Диагностика РПЖ включает в себя определение уровня простатического специфического антигена (ПСА) в сыворотке крови и ультразвуковое исследование. Для подтверждения диагноза проводят биопсию ПЖ, что на сегодняшний день является «золотым стандартом» выявления злокачественных новообразований данной локализации [6]. Пациенты с установленным на основании биопсии диагнозом РПЖ проходят обследование для определения клинической стадии заболевания в соответствии с международной классификацией Tumor, Nodus and Metastasis (TNM) и гистопатологической градацией (степенью дифференцировки) данной опухоли по шкале Глисона. Эта шкала используется исключительно для аденокарциномы

и плоскоклеточной карциномы. Индекс Глисона является суммой степени дифференцировки клеток преобладающего и 2-го по распространенности компонента опухоли. Более высокому значению этого индекса соответствует опухоль большей степени злокачественности, обладающая выраженным метастатическим потенциалом [7]. Поскольку РПЖ относится к гормоночувствительным злокачественным новообразованиям, стандартом лечения этого заболевания является андрогенная депривация. Однако данные литературы свидетельствуют о том, что длительная гормонотерапия зачастую приводит к возникновению фенотипа кастрационно-резистентного РПЖ, отличающегося повышенной степенью злокачественности и ассоциированного с плохим прогнозом [8].

К оперативным способам терапии РПЖ относятся радикальная простатэктомия и брахитерапия (введение в ткань ПЖ радиоактивных зерен ^{125}I , ^{103}Pd или ^{192}Ir). Успех лечения во многом зависит от природы опухолевой ткани. На сегодняшний день известно, что большую роль в патогенезе заболевания играет микроокружение опухоли [9]. Имеется большое количество данных, свидетельствующих о том, что клетки воспалительного инфильтрата опухоли, особенно макрофаги и Т-клетки, участвуют в возникновении, прогрессии и ответе на лечение при РПЖ [10]. Однако роль иммунных клеток, входящих в состав стромы РПЖ, в контексте прогрессии заболевания еще не определена. Известно, что эта опухоль обладает сложным иммуносупрессивным микроокружением и пока плохо реагирует на иммунотерапию [11]. Получение новых данных об особенностях стромы РПЖ поможет повысить терапевтический эффект иммунотерапевтических препаратов у пациентов со злокачественными новообразованиями этой локализации [12].

Цель исследования — изучить особенности воспалительного инфильтрата опухолей РПЖ и его ассоциацию с клинико-морфологическими характеристиками пациентов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы для анализа были получены от пациентов с аденокарциномой ПЖ, перенесших радикальную простатэктомию в Научно-исследовательском институте клинической онкологии им. Н.Н. Трапезникова Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина. Все исследования выполнены в соответствии со стандартами этического комитета организации и Хельсинкской декларации 1964 г., ее последующими изменениями и сопоставимыми нормами этики. В исследование вошел 31 образец аденокарциномы ПЖ, полученный от пациентов 48–72 лет (средний возраст больных — 60 лет). Предоперационный уровень ПСА был в диапазоне от 4,4 нг/мл до 63 нг/мл (среднее значение — 16,7 нг/мл). У всех больных отсутствовали отдаленные метастазы. Материал проходил гистологическую ве-

рификацию в отделе патологической анатомии опухолей человека Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина и охарактеризован в соответствии с TNM-классификацией. Клинико-морфологические характеристики пациентов с РПЖ представлены в табл. 1.

Таблица 1. Клинико-морфологические характеристики пациентов с раком предстательной железы

Table 1. Clinical and morphological characteristics of patients with prostate cancer

Показатель Parameter	Число пациентов, абс. (%) Number of patients, abs. (%)
Стадия: Stage:	
I–II	15 (48)
III–IV	16 (52)
Размер опухоли (T): Tumor size (T):	
T1–2	16 (52)
T3–4	15 (48)
Наличие регионарных метастазов (N): Nodal status (N):	
N0	28 (90)
N+	3 (10)
Степень дифференцировки по шкале Глисона: Differentiation grade on the Gleason scale:	
5–6	24 (77)
7	7 (23)
Возраст, лет: Age, years:	
≤ 60	14 (45)
> 60	17 (55)
Уровень простатического специфического антигена, нг/мл: Prostate specific antigen level, ng/ml:	
≤16,7	22 (71)
>16,7	9 (29)

Иммуногистохимический анализ на срезах опухолевой ткани выполняли по стандартному протоколу. Первичные антитела Ki-67 (клон GM010; «ПраймБиоМед», Россия, Москва), p63 (клон 3A10, «ПраймБиоМед», Россия, Москва), AMACR (клон G8, «ПраймБиоМед», Россия, Москва), CD8 (клон C8/144B, Dako, США), CD3 (polyclonal, Genemed, США), FoxP3 (клон D2W8E, Cell Signaling Technology, США), CD163 (Clone 10D6, BIOCARE Medical, США), CD204 (polyclonal, Sigma-Aldrich, США), CD68 (трансмембранный гликопротеин 1-го типа) (клон GR021, Genemed, США), PU.1 (клон PBM-4G6, «ПраймБиоМед», Россия, Москва), iNOS (синтаза оксида азота) (клон SP126, Sigma-Aldrich, США), IDO1 (индолеамин-пиррол-2,3-диоксигеназа 1) (клон D5j4E, Cell Signaling Technology, США), PD-L1 (клон E1L3N, Cell Signaling

Technology, США) инкубировали в течение 30 мин. Демаскировка антигена проводилась при помощи буфера Tris-EDTA pH 9.0 («ПраймБиоМед», Россия, Москва). Для детекции использовали универсальную двухкомпонентную систему PrimeVision, козы анти-тела к IgG мыши/кролика, пероксидазе хрена (HRP) («ПраймБиоМед», Россия, Москва) согласно инструкции производителя.

Оценку окрашивания выполняли при помощи микроскопа Olympus BX53 ($\times 400$) и программного обеспечения INFINITY ANALYZE (версия 6.2.0) путем прямого подсчета окрашенных клеток в 5 независимых полях зрения.

Для статистического анализа полученных результатов использовали программное обеспечение GraphPad Prism v. 8. Оценку взаимосвязи маркеров и клинико-морфологической характеристики пациентов производили с помощью определения непараметрического критерия Манна–Уитни и точного критерия Фишера. Для анализа корреляций между содержанием клеток различных фенотипов использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Во всех анализах значение $p \leq 0,05$ считалось статистически значимым. На момент проведения исследования все пациенты оставались живы, в связи с чем провести анализ выживаемости не представлялось возможным.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Экспрессия маркеров Т-клеток в строме опухолей рака предстательной железы. Для анализа количества Т-клеток, ассоциированных с опухолью, и их фенотипического состава мы проанализировали экспрессию CD3, CD8, FoxP3 в строме. CD3 использовался как общий маркер Т-клеток, CD8 – в качестве маркера цитотоксических Т-лимфоцитов, а FoxP3 – в качестве маркера регуляторных, иммуносупрессорных Т-клеток. Экспрессия CD3 и CD8 наблюдалась в 100 % исследованных образцов, в то время как экспрессия FoxP3 была обнаружена только в 39 % случаев. Далее мы проанализировали ассоциацию экспрессии исследуемых маркеров с клинико-морфологической характеристикой пациентов. Полученные данные представлены на рис. 1.

В результате исследования было выявлено, что уровень содержания CD8⁺-Т-лимфоцитов выше у пациентов с отсутствием метастазов ($p = 0,0069$), а у пациентов с меньшей степенью дифференцировки опухоли по шкале Глисона наблюдается тенденция к увеличению содержания FoxP3⁺-Т-лимфоцитов в строме опухоли. Общее содержание CD3⁺-Т-клеток значимо выше у больных с более низким значением ПСА.

Экспрессия маркеров макрофагов в строме опухоли РПЖ. Для анализа количества макрофагов, ассоциированных с опухолью, и их фенотипического состава мы использовали несколько маркеров – CD68 (трансмембранный гликопротеин 1-го типа) и PU.1 (транскрипционный фактор) в качестве общих маркеров макро-

фагов. Для идентификации макрофагов 2-го типа (M2) применяли маркер CD204, являющийся сквенджер-рецептором класса А типа 1, участвующим в метаболизме липидов, атерогенезе, подавлении провоспалительного ответа, опосредованного Toll-подобным рецептором 4. Также использовали маркер M2 макрофагов CD163, являющийся сквенджер-рецептором, участвующим в транспорте комплексов гемоглобина, повышении уровня кальция в клетке, синтезе инозитолтрифосфата и секреции интерлейкина 6 и CSF1 (колониестимулирующего фактора 1). Экспрессия данных маркеров наблюдалась в макрофагах стромы в 100 % исследуемых образцов (рис. 2). Следует отметить, что для идентификации макрофагов 1-го типа (M1) мы использовали маркер IDO1 – фермент, участвующий в метаболизме триптофана в строме опухоли. Результаты анализа ассоциации CD68, PU.1, CD204 и CD163 с клинико-морфологической характеристикой пациентов представлены на рис. 2.

Выявлено, что более высокий уровень содержания CD204⁺-макрофагов в строме опухоли ассоциирован с возрастом пациентов ($p = 0,0026$), а содержание CD163⁺ – с отсутствием метастазов ($p = 0,0067$).

Экспрессия PD-L1 и IDO1 в опухолях предстательной железы. Известно, что некоторые стромальные маркеры помимо стромы могут экспрессироваться непосредственно в опухолевых клетках. К таким маркерам относятся, например, IDO1 и PD-L1. Мы провели анализ ассоциации экспрессии данных маркеров с клинико-морфологическими характеристиками пациентов. Для этого образцы были разделены на 2 группы в зависимости от наличия или отсутствия экспрессии данных белков в клетках опухоли или стромы РПЖ. Полученные данные представлены в табл. 2.

Экспрессия PD-L1 наблюдалась у 71 % пациентов, причем в опухолевых клетках она была выявлена в 42 %, а в строме – в 55 % исследуемых образцов. Следует отметить, что одновременная экспрессия этого маркера как в опухолевых, так и в стромальных клетках наблюдалась у 25 % больных. Ассоциация экспрессии PD-L1 с какими-либо клинико-морфологическими характеристиками выявлена не была. Экспрессия IDO1 наблюдалась у 90 % пациентов и также не была ассоциирована с их клинико-морфологическими характеристиками. Экспрессия этого маркера в опухолевой ткани была выявлена у 61 %, а в строме – у 77 % больных. Одновременная экспрессия IDO1 как в строме, так и в опухолевых клетках наблюдалась у 48 % пациентов.

Корреляционный анализ клеточного состава стромы опухолей рака предстательной железы. Далее мы провели корреляционный анализ содержания различных типов иммунных клеток в строме опухоли РПЖ (рис. 3).

Выявлено, что содержание PU.1⁺-макрофагов прямо коррелирует с содержанием CD3⁺-Т-клеток ($r = 0,375$; $p = 0,038$), CD68⁺-макрофагов ($r = 0,537$;

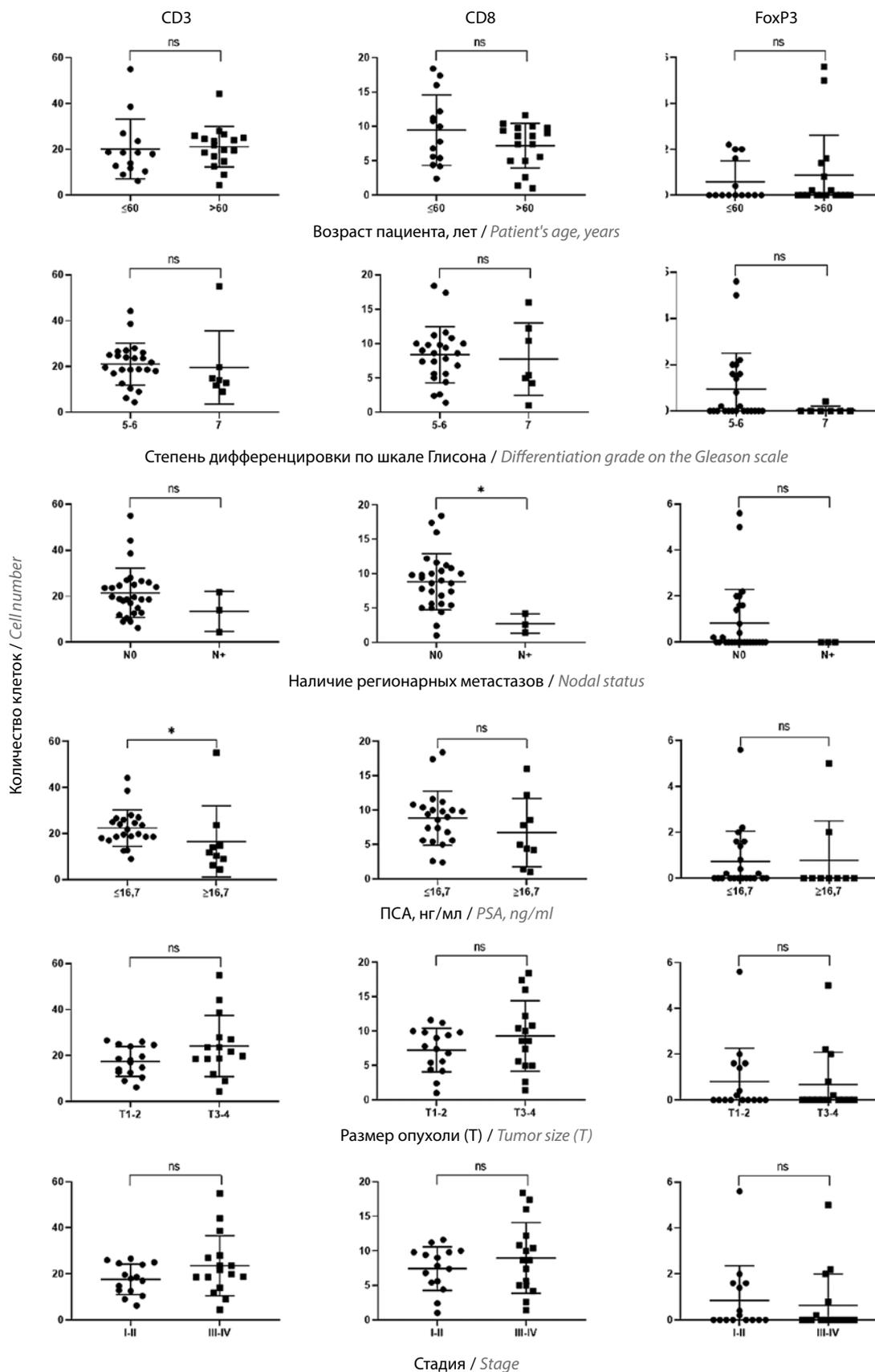


Рис. 1. Анализ ассоциации экспрессии CD3, CD8 и FoxP3 с клинико-морфологическими характеристиками пациентов. ПСА – простатический специфический антиген. * $p < 0,05$ – статистически значимо; ns – статистически незначимо

Fig. 1. Analysis of the association of CD3, CD8, FoxP3 expression with clinical and morphological characteristics of patients. PSA – prostatic specific antigen. * $p < 0.05$ – statistically significant; ns – not statistically significant

Таблица 2. Ассоциация экспрессии PD-L1 и IDO1 с клинико-морфологическими характеристиками пациентами с раком предстательной железы
Table 2. Association of PD-L1 and IDO1 expression with clinical and morphological characteristics of patients with prostate cancer

Параметр Parameter	PD-L1/stroma, n PD-L1/stroma, n			p	PD-L1/опухоль, n PD-L1/tumor, n			p	IDO1/stroma, n IDO1/stroma, n			p	IDO1/опухоль, n IDO1/tumor, n			p
	PD-L1+	PD-L1-			PD-L1+	PD-L1-			IDO1+	IDO1-			IDO1+	IDO1-		
Стадия: Stage: I-II III-IV	7 10	8 6	0,480	5 8	10 8	0,473	12 12	3 4	>0,999	8 11	7 5	0,473				
Наличие регионарных метастазов (N): Nodal status (N): N- N+	15 2	13 1	>0,999	12 1	16 2	>0,999	22 2	6 1	0,545	17 2	11 1	>0,999				
Размер опухоли (T): Tumor size (T): T1-2 T3-4	8 9	8 6	0,722	6 7	10 8	0,722	13 11	3 4	0,685	9 10	7 5	0,716				
Возраст, лет: Age, years: ≤60 >60	6 11	8 6	0,290	7 6	7 11	0,481	10 14	4 3	0,671	8 11	6 6	0,724				
Уровень простатического специфического антигена, нг/мл: Prostate specific antigen level, ng/ml: ≤14 >14	10 7	6 8	0,480	6 7	10 8	0,722	14 10	2 5	0,220	10 9	6 6	>0,999				
Степень дифференцировки по шкале Глисона: Differentiation grade on the Gleason scale: 5-6 7	12 5	12 2	0,412	10 3	14 4	>0,999	20 4	4 3	0,302	15 4	9 3	>0,999				

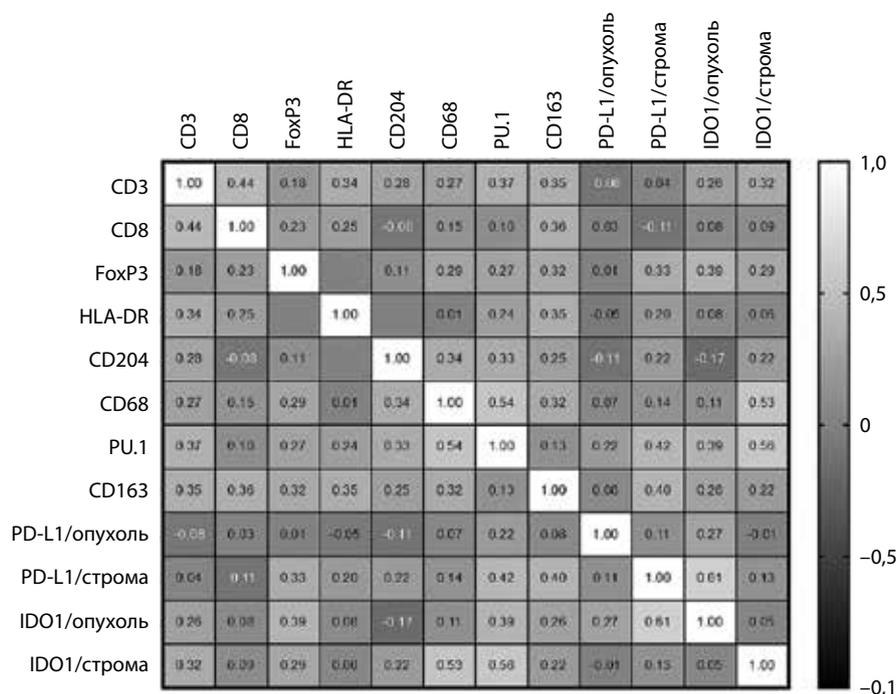


Рис. 3. Корреляционный анализ содержания различных типов клеток в строме опухолей предстательной железы
Fig. 3. Correlation analysis of the abundance of different types of cells in the stroma of prostate cancer

$p = 0,002$) и PD-L1+-клеток в строме ($r = 0,421$; $p = 0,018$) и IDO1 в строме и опухолевых клетках ($r = 0,557$; $p = 0,001$; $r = 0,393$; $p = 0,029$ соответственно). Количество CD68 также ассоциировалось с уровнем IDO1 в строме ($r = 0,535$; $p = 0,002$), а количество CD163+-макрофагов – с уровнем CD8 ($r = 0,358$; $p = 0,048$), PD-L1 ($r = 0,399$; $p = 0,026$) и IDO1 ($r = 0,220$; $p = 0,026$). Интересно, что количество PD-L1+-клеток опухоли прямо коррелировало с количеством IDO1+-опухолевых клеток ($r = 0,610$; $p < 0,001$), а FoxP3+-Т-клеток в строме опухоли также положительно коррелировало с количеством IDO1 в опухолевой ткани ($r = 0,388$; $p = 0,031$). Проведенный корреляционный анализ показал тесную взаимосвязь содержания клеток различного фенотипа и свидетельствует о необходимости проведения комплексного исследования клеток стромы для более полного понимания механизмов развития опухоли.

ОБСУЖДЕНИЕ

Данное исследование посвящено изучению фенотипического разнообразия клеточного состава воспалительного инфильтрата стромы опухолей ПЖ и его ассоциации с клинико-морфологическими характеристиками пациентов. На 1-м этапе работы мы оценили количество Т-клеток различных типов в образцах опухолей. Для оценки качественного и количественного состава Т-клеток в строме были использованы CD3, CD8 и FoxP3. CD3 является селективным маркером Т-клеток, расположенным на внешней поверхности мембраны и стабилизирующим Т-клеточный рецептор (TCR). Основной функцией TCR является

передача сигнала от антигенпрезентирующих клеток (АПК).

Результаты нашего исследования показали, что у пациентов с более низким уровнем ПСА в крови наблюдается большее число Т-лимфоцитов в опухолевом инфильтрате. CD8+-Т-лимфоциты обладают цитотоксическими свойствами. Их высокое содержание в строме опухоли в основном ассоциируется с хорошим прогнозом. Так, в случаях аденокарциномы легкого [13], гепатоцеллюлярной карциномы [14], рака желудка [15], фолликулярной лимфомы выявлена положительная корреляция повышенной концентрации CD8+-Т-клеток в строме опухоли с благоприятным прогнозом пациентов [16]. Малое количество CD8+ при онкологических заболеваниях, напротив, ассоциируется с худшим прогнозом. Анализ данных литературы показал, что нет единого мнения относительно роли CD8 в качестве прогностического маркера для РПЖ. Имеются сведения о том, что повышенная инфильтрация CD8+-Т-лимфоцитов коррелирует с плохим прогнозом пациентов с РПЖ [17, 18]. Также известно, что низкая плотность CD8+ ассоциирована с неудовлетворительным прогнозом больных с этим заболеванием, развитием метастазирования и риском возникновения рецидива [19], а повышенная плотность CD8+Т-лимфоцитов – с лучшим прогнозом [20]. Согласно результатам нашего исследования как и данным литературы, CD8 может служить маркером благоприятного прогноза РПЖ в связи с тем, что высокое содержание CD8+-клеток ассоциировано с отсутствием регионарных метастазов у пациентов. FoxP3 является маркером регуляторных Т-клеток

(Treg). Известно, что этот белок имеет большое значение в дифференцировке и поддержании фенотипа иммуносупрессивных Treg. Согласно данным литературы роль опухоль-инфильтрирующих Treg в инициации и прогрессировании РПЖ до сих пор не определена.

Имеются сведения о том, что повышенная плотность FoxP3+-Т-лимфоцитов в случаях РПЖ ассоциирована с худшим прогнозом и более поздней стадией заболевания [21]. Сообщалось также о том, что в случае РПЖ количество FoxP3+-Т-клеток не коррелировало с исследуемыми параметрами (наличием мутации ERG, возрастом пациента, уровнем ПСА, стадией заболевания, степенью дифференцировки опухоли) [22]. Результаты нашего исследования также не выявили ассоциации FoxP3+-Treg с клинико-морфологическими характеристиками пациентов. Однако была обнаружена прямая корреляция FoxP3+-Т-лимфоцитов в строме опухоли с количеством IDO1+-опухолевых клеток. К. Kolijn и соавт. исследовали особенности эпителиально-мезенхимального перехода клеток РПЖ и пришли к выводу, что для него характерно повышение экспрессии IDO1 в опухолевой ткани, а также переход к иммуносупрессорному фенотипу опухолевого инфильтрата, характеризующегося повышенным содержанием FoxP3+-Treg на фоне снижения количества цитотоксических CD8+-Т-лимфоцитов. Эпителиально-мезенхимальный переход является важным этапом прогрессирования опухоли, способствует инвазии и метастазированию [23].

На сегодняшний день известно, что макрофаги в строме опухоли выполняют противоречивые функции в контексте канцерогенеза. По принципу Th1/Th2 дихотомии иммунного ответа, опосредованного Т-клетками, они также могут дифференцироваться на цитотоксический (M1) и регуляторный (M2) фенотипы [24]. Согласно данным литературы при РПЖ инфильтрация макрофагов в строму, особенно M2, способст-

вует развитию и метастазированию опухоли, а также формированию устойчивости к андрогенной абляции [25, 26].

Ранее мы показали, что PU.1 может быть использован в качестве общего макрофагального маркера для рака почки, пищевода и колоректального рака [27–29]. Результаты данного исследования подтверждают возможность применения PU.1 для выявления макрофагов и в строме РПЖ (рис. 4). Об этом также свидетельствуют данные корреляционного анализа, который выявил сильную прямую связь между содержанием PU.1+- и CD68+-клеток в строме опухоли ($r = 0,537$; $p = 0,002$).

Результаты недавнего метаанализа, посвященного роли макрофагов, ассоциированных с РПЖ, в развитии данного заболевания показали, что более высокая плотность макрофагов, ассоциированных с опухолью (MAO), связана с более низкой общей выживаемостью, более высокой оценкой по шкале Глисона, а также наличием как отдаленных, так и регионарных метастазов [30]. Авторы заключили, что плотность MAO увеличивается по мере прогрессирования РПЖ. Следует отметить, что в данный метаанализ были включены исследования с использованием в качестве маркеров CD68 и CD204.

В недавнем исследовании американских авторов, включавшем 81 пациента с РПЖ, была обнаружена обратная связь между количеством CD68+-MAO в ткани опухоли и клинической стадией, в то время как плотность MAO прямо коррелировала с более высоким индексом Глисона [31]. Также выявлена ассоциация повышенной плотности инфильтрации CD68+-макрофагов в опухолевой массе с более высоким уровнем ПСА [32]. Результаты нашего исследования показали значимую ассоциацию макрофагов CD204+ с возрастом пациентов: плотность CD204 была значимо выше у мужчин старшего возраста. Аналогичная ассоциация данного маркера наблюдалась у пациентов с глиомой

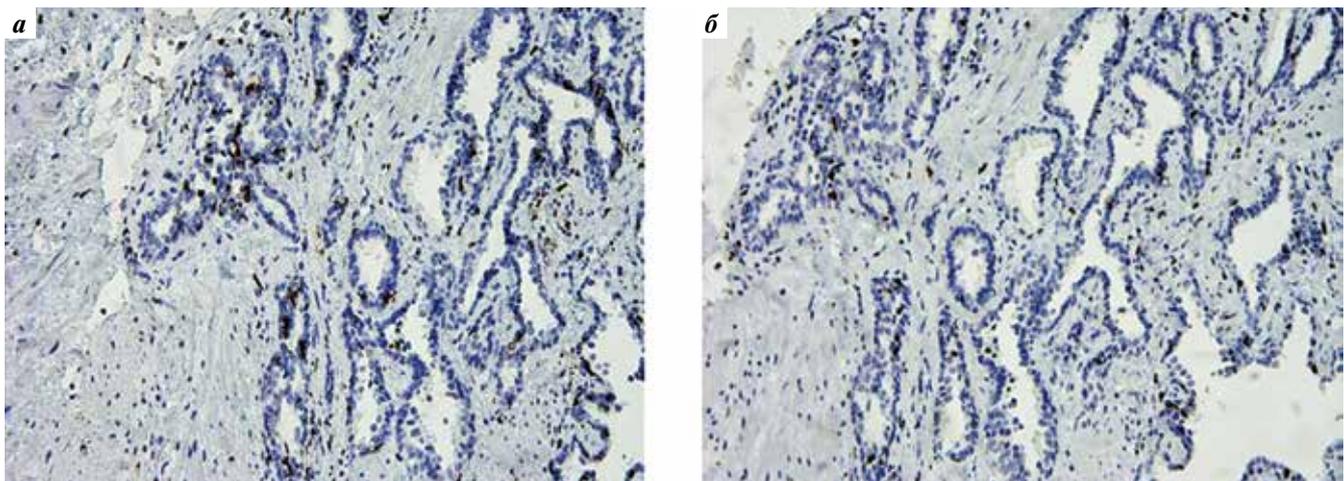


Рис. 4. Иммуногистохимический анализ экспрессии CD68 (а) и PU.1 (б) в образцах рака предстательной железы. $\times 100$
Fig. 4. Immunohistochemical analysis of the expression of CD68 (a) and PU.1 (b) in prostate cancer samples. $\times 100$

[33]. Ассоциация CD204 с возрастом пациентов со злокачественными опухолями других локализаций на сегодняшний день не описана. Согласно данным литературы прогностические маркеры РПЖ, ассоциированные с MAO, еще предстоит определить.

Опубликованы работы, свидетельствующие о том, что повышенная плотность M2, идентифицированных при помощи CD163 в строме РПЖ, ассоциирована с худшим прогнозом [34], экстракапсулярным распространением [25], более высокими показателями по шкале Глисона и частотой метастазирования [34]. Однако результаты нашего исследования показывают, что повышенная плотность CD163 ассоциирована с отсутствием метастазов в регионарные лимфатические узлы. Также мы обнаружили, что количество CD163+-макрофагов прямо коррелировало с количеством цитотоксических CD8+-Т-лимфоцитов и IDO1 в строме опухоли, являющегося маркером M1. Эти результаты согласуются с данными, полученными нами ранее в ходе исследования воспалительного инфильтрата опухолей пищевода [35], и позволяют предположить, что уход опухоли от иммунного надзора развивается при прогрессировании заболевания и отсутствует на его ранних этапах, о чем свидетельствует повышенная плотность цитотоксических макрофагов и Т-лимфоцитов в злокачественных новообразованиях более ранних стадий.

Получено большое количество данных, свидетельствующих о том, что экспрессия IDO1 является маркером плохого прогноза для многих форм злокачественных опухолей [36]. IDO1 – INF γ -индуцируемый фермент метаболизма триптофана, продукты которого оказывают существенное влияние на функционирование иммунной системы. Его гиперэкспрессия приводит к подавлению противоопухолевого иммунного ответа путем супрессии Т-эффекторных клеток и переключения иммунного ответа с Th1 на Th2 [37]. В контексте РПЖ роль IDO1 еще не определена. Этот фермент рассматривается как специфичный маркер заболевания, о чем свидетельствуют повышение его уровня в злокачественных опухолях ПЖ относительно гиперплазии и наличие корреляции с α -метилацилкоэнзим А рацемазой (AMACR) – известным маркером РПЖ [38].

Повышение уровня IDO1 в моче также рекомендуют рассматривать в качестве как прогностического, так и рецидивирующего биомаркера РПЖ [39, 40], а его увеличение в сыворотке крови и строме опухоли ПЖ ассоциируют с более поздней стадией заболевания и отсутствием эффекта от иммунотерапии ингибиторами PD-1 [41]. При анализе влияния экспрессии IDO1 на рост РПЖ на мышиной модели было показа-

но, что повышенный уровень этого маркера в сыворотке крови коррелировал с развитием опухоли, тогда как внутриопухолевая экспрессия не была ассоциирована с течением заболевания [42]. Данные литературы свидетельствуют о необходимости дальнейшего исследования экспрессии IDO1 для определения клинической значимости данного маркера в контексте РПЖ.

Согласно результатам нашего исследования экспрессия IDO1 не ассоциирована с какими-либо клинико-морфологическими характеристиками, однако уровень этого маркера как в строме, так и в опухоли прямо коррелирует с количеством MAO. Как было сказано выше, увеличение количества MAO в строме РПЖ ассоциируется с худшим прогнозом и течением заболевания. Мы также выявили прямую корреляцию уровня экспрессии IDO1 в опухолевых клетках с количеством иммуносупрессорных FoxP3+-Т-лимфоцитов ($p = 0,031$), способствующих прогрессии опухоли.

Наибольшая положительная корреляция наблюдалась между уровнем IDO1 в опухолевых клетках и PD-L1 в строме ($p < 0,001$). Связь лиганда PD-L1 с его рецептором PD-1 на поверхности Т-лимфоцитов вызывает гибель цитотоксических Т-клеток посредством апоптоза или анергии [43]. Иммуноterapia, направленная на подавление связи PD-1/PD-L1, в настоящее время демонстрирует хорошие результаты: наблюдается увеличение общей выживаемости и частоты объективных ответов у пациентов с различными типами опухолей. Однако эффективность иммунотерапии анти-PD-1/PD-L1 в случае РПЖ еще не доказана. Дело в том, что частота и клиническое значение экспрессии PD-1 и PD-L1 при данной патологии мало исследованы. Функциональная роль сигнального пути PD-1/PD-L1 в развитии и прогрессировании РПЖ также требует дальнейшего изучения [44]. Тот факт, что в результате нашего исследования экспрессия PD-L1 стромальными клетками прямо коррелировала с содержанием PU.1 и CD163, позволяет предположить, что в случае РПЖ экспрессия PD-L1 может быть обусловлена макрофагами, входящими в состав опухолевого инфильтрата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что фенотип клеток воспалительного инфильтрата РПЖ достаточно разнообразен и представлен большинством типов иммунных клеток. Выявленные в ходе работы особенности и ассоциации содержания различных типов клеток опухолевой стромы с клиническими характеристиками пациентов расширяют представления о прогрессировании данного заболевания и помогают в поиске новых терапевтических стратегий.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Bahmad H.F., Jalloul M., Azar J. et al. Tumor microenvironment in prostate cancer: toward identification of novel molecular biomarkers for diagnosis, prognosis, and therapy development. *Front Genet* 2021;12:652747. DOI: 10.3389/fgene.2021.652747.
- Watson P.A., Arora V.K., Sawyers C.L. Emerging mechanisms of resistance to androgen receptor inhibitors in prostate cancer. *Nat Rev Cancer* 2015;15(12):701–11. DOI: 10.1038/nrc4016.
- Testa U., Castelli G., Pelosi E. Cellular and molecular mechanisms underlying prostate cancer development: therapeutic implications. *Medicines (Basel)* 2019;6(3):82. DOI: 10.3390/medicines6030082.
- Budnik J., Suri J., Bates J.E. et al. Prognostic significance of sites of visceral metastatic disease in prostate cancer: a population-based study of 12,180 patients. *Clin Genitourin Cancer* 2019;17(4):260–7. DOI: 10.1016/j.clgc.2019.03.020.
- Лаптева Т.О. Патоморфологическая оценка простаты после радикальной простатэктомии. *Вестник урологии* 2019;7(1):74–83. [Lapteva T.O. Pathomorphological evaluation of the prostate after radical prostatectomy. *Vestnik urologii = Bulletin of Urology* 2019;7(1):74–83. (In Russ.)]. DOI: 10.21886/2308-6424-2019-7-1-74-83.
- Welch H.G., Albertsen P.C. Reconsidering prostate cancer mortality – the future of PSA screening. *N Engl J Med* 2020;382(16):1557–63. DOI: 10.1056/NEJMms1914228.
- Nagpal K., Foote D., Liu Y. et al. Development and validation of a deep learning algorithm for improving Gleason scoring of prostate cancer. *NPJ Digit Med* 2019;2:48. DOI: 10.1038/s41746-019-0112-2.
- Lo C.H., Lynch C.C. Multifaceted roles for macrophages in prostate cancer skeletal metastasis. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018;9:247. DOI: 10.3389/fendo.2018.00247.
- Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144(5):646–74. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Sfanos K.S., Yegnasubramanian S., Nelson W.G., De Marzo A.M. The inflammatory microenvironment and microbiome in prostate cancer development. *Nat Rev Urol* 2018;15(1):11–24. DOI: 10.1038/nrurol.2017.167.
- Nair S.S., Weil R., Dovey Z. et al. The Tumor microenvironment and immunotherapy in prostate and bladder cancer. *Urol Clin North Am* 2020;47(4S):e17–54. DOI: 10.1016/j.ucl.2020.10.005.
- Kwon J.T.W., Bryant R.J., Parkes E.E. The tumor microenvironment and immune responses in prostate cancer patients. *Endocr Relat Cancer* 2021;28(8):T95–107. DOI: 10.1530/ERC-21-0149.
- Ye S.L., Li X.Y., Zhao K., Feng T. High expression of CD8 predicts favorable prognosis in patients with lung adenocarcinoma: a cohort study. *Medicine (Baltimore)* 2017;96(15):e6472. DOI: 10.1097/MD.0000000000006472.
- Guo M., Yuan F., Qi F., Sun J. et al. Expression and clinical significance of LAG-3, FGL1, PD-L1 and CD8+T cells in hepatocellular carcinoma using multiplex quantitative analysis. *J Transl Med* 2020;18(1):306. DOI: 10.1186/s12967-020-02469-8.
- Chang W.J., Du Y., Zhao X. et al. Inflammation-related factors predicting prognosis of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2014;20(16):4586–96. DOI: 10.3748/wjg.v20.i16.4586.
- Sugimoto T., Watanabe T. Follicular lymphoma: The role of the tumor microenvironment in prognosis. *J Clin Exp Hematop* 2016;56(1):1–19. DOI: 10.3960/jslr.56.1.
- Petitprez F., Fossati N., Vano Y. et al. PD-L1 expression and CD8⁺ T-cell Infiltrate are associated with clinical progression in patients with node-positive prostate cancer. *Eur Urol Focus* 2019;5(2):192–6. DOI: 10.1016/j.euf.2017.05.013.
- Kaur H.B., Guedes L.B., Lu J. et al. Association of tumor-infiltrating T-cell density with molecular subtype, racial ancestry and clinical outcomes in prostate cancer. *Mod Pathol* 2018;31(10):1539–52. DOI: 10.1038/s41379-018-0083-x.
- Vicier C., Werner L., Huang Y. et al. Immune infiltrate with CD8 low or PDL1 high associated with metastatic prostate cancer after radical prostatectomy (RP). *J Clin Oncol* 2019;37(7):86. DOI: 10.1200/JCO.2019.37.7_suppl.86.
- Yang Y., Attwood K., Bshara W. et al. High intratumoral CD8⁺T-cell infiltration is associated with improved survival in prostate cancer patients undergoing radical prostatectomy. *Prostate* 2021;81(1):20–8. DOI: 10.1002/pros.24068.
- Flammiger A., Weisbach L., Huland H. et al. High tissue density of FOXP3+ T cells is associated with clinical outcome in prostate cancer. *Eur J Cancer* 2013;49(6):1273–9. DOI: 10.1016/j.ejca.2012.11.035.
- Kaczmarczyk-Sekuła K., Gałązka K., Głajcar A. et al. Prostate cancer with different ERG status may show different FOXP3-positive cell numbers. *Pol J Pathol* 2016;67(4):313–7. DOI: 10.5114/pjp.2016.65861.
- Kolijn K., Verhoef E.I., Smid M. et al. Epithelial-mesenchymal transition in human prostate cancer demonstrates enhanced immune evasion marked by IDO1 expression. *Cancer Res* 2018;78(16):4671–9. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-3752.
- Ковалева О.В., Ефремов Г.Д., Михайленко Д.С. и др. Роль макрофагов, ассоциированных с опухолью в патогенезе почечно-клеточного рака. *Онкоурология* 2017;13(1):20–6. [Kovaleva O.V., Efremov G.D., Mikhaylenko D.S., et al. Role of tumor-associated macrophages in renal cell carcinoma pathogenesis. *Onkourologiya = Cancer Urology* 2017;13(1):20–6. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9776-2017-13-1-20-26.
- Lanciotti M., Masieri L., Raspollini M.R. et al. The role of M1 and M2 macrophages in prostate cancer in relation to extracapsular tumor extension and biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Biomed Res Int* 2014;2014:486798. DOI: 10.1155/2014/486798.
- Hu W., Qian Y., Yu F. et al. Alternatively activated macrophages are associated with metastasis and poor prognosis in prostate adenocarcinoma. *Oncol Lett* 2015;10(3):1390–6. DOI: 10.3892/ol.2015.3400.
- Kovaleva O.V., Rashidova M.A., Samoiloa D.V. et al. Immunosuppressive phenotype of esophagus tumors stroma. *Anal Cell Pathol (Amst)* 2020;2020:5424780. DOI: 10.1155/2020/5424780.
- Ковалева О.В., Рашидова М.А., Самойлова Д.В. и др. Иммуносупрессорные особенности фенотипа стромы опухолей почки различных гистологических типов. *Онкоурология* 2020;16(2):29–35. [Kovaleva O.V., Rashidova M.A., Samoiloa D.V. et al. Immunosuppressive peculiarities of stromal cells of various kidney tumor types. *Onkourologiya = Cancer Urology* 2020;16(2):29–35. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9776-2020-16-2-29-35.
- Ковалева О.В., Грачев А.Н., Подлесная П.А. и др. PU.1 – ядерный фактор иммунокомпетентных клеток стромы опухоли при колоректальном раке. *Клиническая и экспериментальная морфология* 2021;10(2):32–9. [Kovaleva O.V., Gratchev A.N., Podlesnaya P.A. et al. PU.1 is a nuclear factor of immunocompetent cells of tumor stroma in colorectal cancer. *Klinicheskaya i eksperimental'naya morfologiya = Clinical and Experimental Morphology*

- 2021;10(2):32–39. (In Russ.)]. DOI: 10.31088/CEM2021.10.2.32–39.
30. Cao J., Liu J., Xu R. et al. Prognostic role of tumour-associated macrophages and macrophage scavenger receptor 1 in prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 2017;8(47):83261–9. DOI: 10.18632/oncotarget.18743.
31. Shimura S., Yang G., Ebara S. et al. Reduced infiltration of tumor-associated macrophages in human prostate cancer: association with cancer progression. *Cancer Res* 2000;60(20):5857–61.
32. Nonomura N., Takayama H., Nakayama M. et al. Infiltration of tumour-associated macrophages in prostate biopsy specimens is predictive of disease progression after hormonal therapy for prostate cancer. *BJU Int* 2011;107(12):1918–22. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2010.09804.x.
33. Yuan Y., Zhao Q., Zhao S. et al. Characterization of transcriptome profile and clinical features of a novel immunotherapy target CD204 in diffuse glioma. *Cancer Med* 2019;8(8):3811–21. DOI: 10.1002/cam4.2312.
34. Erlandsson A., Carlsson J., Lundholm M. et al. M2 macrophages and regulatory T cells in lethal prostate cancer. *Prostate* 2019;79(4):363–9. DOI: 10.1002/pros.23742.
35. Ковалева О.В., Рашидова М.А., Самойлова Д.В. и др. Прогностическая значимость экспрессии CD204 и IDO1 в опухолях пищевода. *Успехи молекулярной онкологии* 2021;8(2):40–6. [Kovaleva O.V., Rashidova M.A., Samoilova D.V. et al. Prognostic significance of CD204 and IDO1 expression in esophageal tumors. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2021;8(2):40–6. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/2313-805X-2021-8-2-40-46.
36. Zhai L., Ladomersky E., Lenzen A. et al. IDO1 in cancer: a Gemini of immune checkpoints. *Cell Mol Immunol* 2018;15(5):447–57. DOI: 10.1038/cmi.2017.143.
37. Munn D.H., Mellor A.L. Indoleamine 2,3-dioxygenase and metabolic control of immune responses. *Trends Immunol* 2013;34(3):137–43. DOI: 10.1016/j.it.2012.10.001.
38. Feder-Mengus C., Wyler S., Hudolin T. et al. High expression of indoleamine 2,3-dioxygenase gene in prostate cancer. *Eur J Cancer* 2008;44(15):2266–75. DOI: 10.1016/j.ejca.2008.05.023.
39. Thüring M., Knuchel R., Picchetta L. et al. The prognostic value of indoleamine-2,3-dioxygenase gene expression in urine of prostate cancer patients undergoing radical prostatectomy as first treatment of choice. *Front Immunol* 2020;11:1244. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01244.
40. Banzola I., Mengus C., Wyler S. et al. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase induced by IFN- γ and TNF- α as potential biomarker of prostate cancer progression. *Front Immunol* 2018;9:1051. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01051.
41. Zahm C.D., Johnson L.E., McNeel D.G. Increased indoleamine 2,3-dioxygenase activity and expression in prostate cancer following targeted immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2019;68(10):1661–9. DOI: 10.1007/s00262-019-02394-w.
42. Källberg E., Wikström P., Bergh A. et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity influence tumor growth in the TRAMP prostate cancer model. *Prostate* 2010;70(13):1461–70. DOI: 10.1002/pros.21181.
43. Barber D.L., Wherry E.J., Masopust D. et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 2006;439(7077):682–7. DOI: 10.1038/nature04444.
44. Sharma M., Yang Z., Miyamoto H. Immunohistochemistry of immune checkpoint markers PD-1 and PD-L1 in prostate cancer. *Medicine (Baltimore)* 2019;98(38):e17257. DOI: 10.1097/MD.00000000000017257.

Вклад авторов

П.А. Подлесная: анализ данных литературы, получение экспериментальных данных, статистическая обработка данных, написание текста статьи;

О.В. Ковалева: формирование концепции исследования, статистическая обработка данных, написание текста статьи;

М.А. Рашидова, Д.В. Самойлова, А.А. Петренко: получение экспериментальных данных;

В.В. Мочальникова: подбор материала для исследования, получение экспериментальных данных;

А.Н. Грачев: формирование концепции исследования, написание текста статьи.

Authors' contribution

P.A. Podlesnaya: analysis of literature data, obtaining experimental data, statistical data processing, article writing;

O.V. Kovaleva: developing the research design, statistical data processing, article writing;

M.A. Rashidova, D.V. Samoilova, A.A. Petrenko: obtaining experimental data;

V.V. Mochalnikova: selection of material for research, obtaining experimental data;

A.N. Gratchev: developing the research design; article writing.

ORCID авторов / ORCID of authors

П.А. Подлесная / P.A. Podlesnaya: <https://orcid.org/0000-0003-2312-5546>

О.В. Ковалева / O.V. Kovaleva: <https://orcid.org/0000-0001-6132-9924>

М.А. Рашидова / M.A. Rashidova: <https://orcid.org/0000-0002-3267-4232>

Д.В. Самойлова / D.V. Samoilova: <https://orcid.org/0000-0001-5639-0835>

А.А. Петренко / A.A. Petrenko: <https://orcid.org/0000-0001-6951-3996>

В.В. Мочальникова / V.V. Mochalnikova: <https://orcid.org/0000-0001-5275-7134>

А.Н. Грачев / A.N. Gratchev: <https://orcid.org/0000-0003-2137-1866>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-29-09069).

Financing. The study was performed with the support of Russian Foundation for Basic Research (grant No. 18-29-09069).

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики. Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Compliance with patient rights and principles of bioethics. All patients gave written informed consent to participate in the study.

Статья поступила: 11.10.2021. **Принята к публикации:** 18.01.2022.

Article submitted: 11.10.2021. **Accepted for publication:** 18.01.2022.